

# ПРОБЛЕМЫ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Научно-практический журнал  
Выходит четыре раза в год  
Основан в 1968 году

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

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

**Выпуск 3**

**2017**

**САРАТОВ**

## ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

В.В.Кутырев, докт. мед. наук, академик РАН (Саратов)

## 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)  
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)

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

С.А.Бугоркова, докт. мед. наук (Саратов)  
Д.В.Викторов, докт. биол. наук (Волгоград)  
О.И.Гулий, докт. биол. наук (Саратов)  
Г.А.Ерошенко, докт. биол. наук (Саратов)  
И.В.Жарникова, докт. биол. наук (Ставрополь)  
Л.В.Карпунина, докт. биол. наук (Саратов)  
В.Б.Локтев, докт. биол. наук, профессор (Кольцово)  
О.В.Малецкая, докт. мед. наук, профессор (Ставрополь)  
А.Н.Микеров, докт. биол. наук (Саратов)  
Н.И.Микшис, докт. мед. наук (Саратов)  
Н.В.Попов, докт. биол. наук, профессор (Саратов)  
Ю.А.Попов, докт. биол. наук, профессор (Саратов)  
Л.В.Саяпина, докт. мед. наук (Москва)  
Н.И.Смирнова, докт. биол. наук, профессор (Саратов)  
В.П.Топорков, докт. мед. наук, профессор (Саратов)  
И.Г.Шемякин, докт. биол. наук, профессор (Оболенск)  
С.А.Щербакова, докт. биол. наук (Саратов)  
Т.Н.Щуковская, докт. мед. наук, профессор (Саратов)

## Ответственный секретарь

Т.Б.Караваева

Тел. (845-2) 51-82-22. Факс (845-2) 51-52-12

E-mail: jour@microbe.ru

© Федеральное казенное учреждение здравоохранения  
«Российский научно-исследовательский противочумный  
институт «Микроб», 2017

2017, Issue 3

## Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]

Scientific and Practical Journal  
Issued quarterly. Founded in 1968

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

### Editor-in-Chief

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

### Editorial 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)  
*Ginsburg 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)  
*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 Board

*Bugorkova S.A.*, Doctor of Medical Science (Saratov)  
*Victorov D.V.*, Doctor of Biological Science (Volgograd)  
*Guliy O.I.*, Doctor of Biological Science (Saratov)  
*Eroshenko G.A.*, Doctor of Biological Science (Saratov)  
*Zharnikova I.V.*, Doctor of Biological Science (Stavropol)  
*Karpunina L.V.*, Doctor of Biological Science (Saratov)  
*Loktev V.B.*, Doctor of Biological Science, Professor (Koltsovo)  
*Maletskaya O.V.*, Doctor of Medical Science, Professor (Stavropol)  
*Mikero A.N.*, Doctor of Biological Science (Saratov)  
*Mikshis N.I.*, Doctor of Medical Science (Saratov)  
*Popov N.V.*, Doctor of Biological Science, Professor (Saratov)  
*Popov Yu. A.*, Doctor of Biological Science, Professor (Saratov)  
*Sayapina L.V.*, Doctor of Medical Science (Moscow)  
*Smirnova N.I.*, Doctor of Biological Science, Professor (Saratov)  
*Toporkov V.P.*, Doctor of Medical Science, Professor (Saratov)  
*Shemyakin I.G.*, Doctor of Biological Science, Professor (Obolensk)  
*Shcherbakova S.A.*, Doctor of Biological Science (Saratov)  
*Shchukovskaya T.N.*, Doctor of Medical Science, Professor (Saratov)

### 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. 3. 1–112

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

Подписано в печать 22.09.17. Формат 60×88 1/8. Бумага мелованная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 13,72. Гарнитура Таймс. Заказ 996  
Журнал отпечатан в типографии ООО «ИППОЛит-XXI век». 410012, Саратов, Б. Казачья, 79/85

Смоленский В.Ю., Удовиченко С.К., Топорков В.П., Кутырев В.В. О рисках возникновения чрезвычайных ситуаций в области биологической безопасности международного значения и их предикторах..... 5

### Эпидемиология

Водопьянов А.С., Баташев В.В., Водопьянов С.О., Титова С.В., Пичурин Н.Л., Олейников И.П., Самородова А.В., Кругликов В.Д., Веркина Л.М. Разработка методики пространственного анализа для выявления «территорий риска» при реализации внешних угроз санитарно-эпидемиологическому благополучию..... 12

Кузнецов А.А., Голосовский С.М., Матросов А.Н., Поршаков А.М., Лопатин А.А. Перспективы стандартизации и систематизации пунктов эпизоотологического обследования территорий природных очагов чумы..... 16

Омельченко Н.Д., Иванова И.А., Беспалова И.А., Филиппенко А.В. Иммуномодуляторы и специфическая профилактика инфекционных болезней..... 21

Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Писцов М.Н., Рубцов В.В., Суровяткин А.В., Петров А.А., Казанцев А.В., Бережной А.М., Зверев А.Ю., Маноскин А.В., Кротков В.Т., Кутаев Д.А., Максимов В.А., Кузнецов С.Л., Вахнов Е.Ю., Тимофеев М.А., Мовсесянц А.А., Борисевич С.В. Эпидемиологическая обстановка и вопросы идентификации вируса бешенства среди людей на территории Российской Федерации в период 2002–2015 гг. .... 27

Подладчикова О.Н. Современные представления о молекулярных механизмах патогенеза чумы..... 33

### Микробиология

Базанова Л.П., Токмакова Е.Г., Воронова Г.А., Балахонov С.В., Иннокентьева Т.И. Особенности взаимоотношений блохи *Citellophilus tesquorum altaicus* (Ioff, 1936) и *Yersinia pestis* с различным плазмидным составом..... 41

Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Зюзина В.П., Кретенчук О.Ф., Яговкин М.Э. Изучение диагностических возможностей моноклональных антител, специфичных к мембранному белку возбудителя холеры, в иммуноферментном анализе..... 45

Король Е.В., Меринова Л.К., Шубникова Е.В., Меринова О.А., Сенина Т.В., Плеханова Н.Г. Выживаемость *Burkholderia pseudomallei* в клетках ресничной инфузории *Tetrahymena pyriformis*: влияние микроорганизма на инцистирующую активность тетрахимен..... 49

Крицкий А.А., Челдышова Н.Б., Тучков И.В., Смирнова Н.И. Разработка алгоритма определения уровня экспрессии генов *ctxA* и *toxR* *Vibrio cholerae* методом ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени..... 53

Кузнецова И.В., Ковалев Д.А., Евченко Ю.М., Шакирова Л.И., Швецова Н.М., Пономаренко Д.Г., Писаренко С.В., Жиров А.М., Лукина А.А., Куличенко А.Н. Изучение генетического разнообразия штаммов бруцелл, выделенных в Северо-Кавказском федеральном округе..... 58

Smolensky V.Yu., Udovichenko S.K., Toporkov V.P., Kutyrev V.V. Regarding the Risks of Occurrence of Emergency Situations in the Sphere of Biological Safety of International Concern and Their Predictors..... 5

### Epidemiology

Vodopianov A.S., Batashev V.V., Vodopianov S.O., Titova S.V., Pichurina N.L., Oleinikov I.P., Samorodova A.V., Kruglikov V.D., Verkina L.M. Development of Spatial Analysis Techniques for Identification of “Risk Areas” in Case of External Threats Realization as regards Sanitary and Epidemiological Welfare..... 12

Kuznetsov A.A., Golosovsky S.M., Matrosov A.N., Porshakov A.M., Lopatin A.A. Prospects of Standardization and Systematization of the Points for Epizootiological Surveillance of Natural Plague Foci..... 16

Omel'chenko N.D., Ivanova I.A., Bepalova I.A., Filippenko A.V. Immunomodulators and Specific Prophylaxis of Infectious Diseases..... 21

Onishchenko G.G., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakschina N.D., Pistsov M.N., Rubtsov V.V., Surovyatkin A.V., Petrov A.A., Kazantsev A.V., Berezhnoy A.M., Zverev A.Yu., Manoshkin A.V., Krotkov V.T., Kutaev D.A., Maksimov V.A., Kuznetsov S.L., Vakhnov E.Yu., Timofeev M.A., Movsesyants A.A., Borisevich S.V. Epidemiological situation on and Problems of Identification of Rabies Virus in Humans in the Territory of the Russian Federation During the Period of 2002–2015..... 27

Podladchikova O.N. Modern Views on Molecular Mechanisms of Plague Pathogenesis..... 33

### Microbiology

Bazanova L.P., Tokmakova E.G., Voronova G.A., Balakhonov S.V., Innokent'eva T.I. Peculiarities of Interaction between *Citellophilus tesquorum altaicus* (Ioff, 1936) Flea and *Yersinia pestis* with Various Plasmid Composition..... 41

Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Zyuzina V.P., Kretenchuk O.F., Yagovkin M.E. The Study of Diagnostic Potential of Monoclonal Antibodies Specific to the Membrane Protein of Cholera Agent in Enzyme-Linked Immunoassay..... 45

Korol' E.V., Merinova L.K., Shubnikova E.V., Merinova O.A., Senina T.V., Plekhanova N.G. Survival of *Burkholderia pseudomallei* in cells of *Tetrahymena pyriformis* Ciliate Infusorian: Effect on Tetrahymena Encystment Activity..... 49

Kritsky A.A., Cheldyshova N.B., Tuchkov I.V., Smirnova N.I. Development of the Algorithm for Identification of the Level of *Vibrio cholerae ctxA* and *toxR* Gene Expression Using RT-PCR with Real-Time Hybridization-Fluorescent Registration of Results..... 53

Kuznetsova I.V., Kovalev D.A., Evchenko Yu.M., Shakirova L.I., Shvetsova N.M., Ponomarenko D.G., Pisarenko S.V., Zhironov A.M., Lukina A.A., Kulichenko A.N. The Study of Genetic Diversity of Brucella Strains Isolated in the North Caucasian Federal District..... 58

Малюкова Т.А., Тихомирова Л.А., Попов Ю.А. Использование информационных технологий при подготовке специалистов для работ с патогенными биологическими агентами ..... 63

Марченко В.Ю., Суслопаров И.М., Сапронова Н.Ю., Гончарова Н.И., Колосова Н.П., Евсеенко В.А., Святченко С.В., Пьянкова О.Г., Зиятдинов В.Б., Лиманская О.С., Джамбинов С.Д., Шендо Г.Л., Михеев В.Н., Максюттов Р.А., Рыжиков А.Б. Анализ штаммов вируса гриппа H5N8, вызвавших вспышки в России в 2016–2017 гг. .... 68

Новицкая И.В., Прохвятилова Е.В., Топорков А.В., Викторов Д.В., Кулаков М.Я., Савина Е.В., Пушкарь В.Г., Белицкая Л.И., Осина Н.А., Касьян Ж.А., Шульгина И.В., Лобовикова О.А. Диагностические возможности эритроцитарного иммуноглобулинового диагностикума для выявления и идентификации возбудителей особо опасных (глубоких) микозов ..... 75

Растунцева Е.В., Тихомирова Л.А., Сазанова Е.В. Пути снижения рисков инфицирования при обучении работе с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности) .... 80

Соколова Е.П., Зюзина В.П., Демидова Г.В., Подладчикова О.Н., Рыкова В.А., Тынянова В.И. Роль резидентных плазмид рMT1, рCD1 и рPCP1 *Yersinia pestis* в образовании экстрацеллюлярной формы липополисахарида ..... 85

### Биотехнология, иммунология

Кравцов А.Л., Ключева С.Н., Щуковская Т.Н., Бугоркова С.А. Эффект иммуномодуляторов и противотуберкулезной вакцинации на апоптоз и лизис спленоцитов, взаимодействующих *in vitro* с тулярином ..... 90

Кудрявцева О.М., Щуковская Т.Н., Микшис Н.И., Ключева С.Н., Бугоркова С.А., Санджиев Д.Н., Конусева С.В., Савченко С.П., Хасыкова Б.А., Щербаклова С.А. Выявление ассоциаций генов HLA II класса главного комплекса гистосовместимости с особенностями иммунного ответа у лиц, вакцинированных живой чумной вакциной в Республике Калмыкия ..... 95

Овчинникова М.В., Комиссаров А.В., Абрамова Е.Г., Киреев М.Н., Ульянов А.Ю., Бибииков Д.Н., Исляева М.Н., Никифоров А.К. Разработка лекарственной формы готового препарата противохолерного иммуноэнтеросорбента ..... 100

Степанов А.В., Осина Н.А., Майоров Н.В. Оптимизация технологической схемы производства препаратов для генной диагностики особо опасных инфекционных болезней методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов ..... 105

### Информация

Мемориал, посвященный участникам ликвидации последствий Спитакского землетрясения 7 декабря 1988 г. .... 110

### Памяти коллеги

Памяти Нонны Михайловны Остроумовой ..... 112

Malyukova T.A., Tikhomirova L.A., Popov Yu.A. Application of Information Technologies in Vocational Training for Work with Pathogenic Biological Agents

Marchenko V.Yu., Susloparov I.M., Saproнова N.Yu., Goncharova N.I., Kolosova N.P., Evseenko V.A., Svyatchenko S.V., P'yankova O.G., Ziatdinov V.B., Limanskaya O.S., Dzhambinov S.D., Shendo G.L., Mikheev V.N., Maksyutov R.A., Ryzhikov A.B. Characterization of Avian Influenza H5N8 Virus Strains That Caused the Outbreaks in the Russian Federation in 2016–2017

Novitskaya I.V., Prokhvatilova E.V., Toporkov A.V., Viktorov D.V., Kulakov M.Ya., Savina E.V., Pushkar' V.G., Belitskaya L.I., Osina N.A., Kas'yan Zh.A., Shul'gina I.V., Lobovikova O.A. Diagnostic Potential of the Erythrocytic Immunoglobulin Diagnosticum for Indication and Identification of the Causative Agents of Particularly Dangerous (Deep) Mycoses

Rastuntseva E.V., Tikhomirova L.A., Sazanova E.V. Ways to Reduce the Risks of Infection While Training for Work with Microorganisms of the I–II Groups of Pathogenicity (Hazard)

Sokolova E.P., Zyuzina V.P., Demidova G.V., Podladchikova O.N., Rykova V.A., Tynyanova V.I. The Role of *Yersinia pestis* Resident Plasmids pMT1, pCD1, and pPCP1 in the Production of Lipopolysaccharide Extracellular Form

### Biotechnology, Immunology

Kravtsov A.L., Klyueva S.N., Shchukovskaya T.N., Bugorkova S.A. Effect of Immunomodulators and Anti-Tularemia Vaccination on Apoptosis and Lysis of Splenocytes Interacting with Tulyarin *in vitro*

Kudryavtseva O.M., Shchukovskaya T.N., Mikshis N.I., Klyueva S.N., Bugorkova S.A., Sandzhiev D.N., Konusheva S.V., Savchenko S.P., Khasykova, B.A. Shcherbakova S.A. Identification of HLA II Class Gene Associations of the Main Histocompatibility Complex with Peculiarities of Immune Response in Persons Vaccinated with Live Plague Vaccine in the Republic of Kalmykia

Ovchinnikova M.V., Komissarov A.V., Abramova E.G., Kireev M.N., Ul'yanov A.Yu., Bibikov D.N., Islyayeva M.N., Nikiforov A.K. Development of Pharmaceutical Dosage Form of Anti-Cholera Immune-Enterosorbent

Stepanov A.V., Osina N.A., Mayorov N.V. Optimization of the Technological Scheme for the Production of Preparations for Gene Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases Using Polymerase Chain Reaction with Hybridization-Fluorescent Registration of Results

### Information

A monument sacred to the memory of those who participated in the relief of the consequences of Spitak earthquake on December 7, 1988

### Revering the Memory of the Colleague

Of blessed memory of Nonna M. Ostroumova

В.Ю.Смоленский<sup>1</sup>, С.К.Удовиченко<sup>2</sup>, В.П.Топорков<sup>2</sup>, В.В.Кутырев<sup>2</sup>

## О РИСКАХ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ЧРЕЗВЫЧАЙНЫХ СИТУАЦИЙ В ОБЛАСТИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ МЕЖДУНАРОДНОГО ЗНАЧЕНИЯ И ИХ ПРЕДИКТОРАХ

<sup>1</sup>Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва; <sup>2</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

В статье проведен анализ актуальной эпидемиологической конъюнктуры с точки зрения определения рисков возникновения чрезвычайной ситуации в области биологической безопасности, отличающейся от чрезвычайной ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия признаками последствий, соизмеримых по качеству и масштабам с угрозами национальной и международной безопасности. По параметрам чрезвычайной ситуации в области биологической безопасности охарактеризована эпидемия лихорадки Эбола в странах Западной Африки в 2013–2016 гг. Признаки чрезвычайной ситуации биологической безопасности наиболее отчетливо прогнозируются в следующих случаях: возникновение пандемии гриппа нового подтипа (Международные медико-санитарные правила, 2005 г.); интенсификация негативных для общественного здоровья тенденций при распространении лихорадки Зика; массовые сбои в области обеспечения биологической безопасности при работе с патогенными биологическими агентами; прогнозируемые, трудно контролируемые последствия возникновения и распространения инфекционных болезней, вызванных микроорганизмами с синтетическим геномом; возникновение эпидемических событий в условиях массовых международных мероприятий; целенаправленная трактовка чрезвычайной ситуации с помощью инструмента ММСП (2005 г.) как последствия нарушения Конвенции о запрете биологического и токсинного оружия и основания для вмешательства во внутренние дела стран-нарушителей с социально-экономическими, геополитическими последствиями и ущербом для национальной безопасности.

*Ключевые слова:* биологическая безопасность, чрезвычайная ситуация санитарно-эпидемиологического характера международного значения, чрезвычайная ситуация в области биологической безопасности, риск возникновения чрезвычайной ситуации, актуальные инфекционные болезни, патогенные биологические агенты, микроорганизмы с синтетическим геномом, Международные медико-санитарные правила (2005).

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

V.Yu.Smolensky<sup>1</sup>, S.K.Udovichenko<sup>2</sup>, V.P.Toporkov<sup>2</sup>, V.V.Kutyrev<sup>2</sup>

## Regarding the Risks of Occurrence of Emergency Situations in the Sphere of Biological Safety of International Concern and Their Predictors

<sup>1</sup>Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation; <sup>2</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

The paper presents the analysis of the current epidemiological situation from the viewpoint of identification of risks of emergency situation onset in the sphere of biological safety, which differs from the emergency situation of sanitary-epidemiological welfare in the character of after-effects that are comparable in the quality and the scale to the threats to national and international security. In reference to the parameters of emergency situation in the sphere of biological safety, epidemic of Ebola fever in West Africa countries (2013–2016) has been described. Biosafety emergency situation is most likely to be predicted in the following cases: occurrence of the flu pandemic of the novel subtype (International Health Regulations, 2005); intensification of unfavorable for public health tendencies against the background of Zika fever transmission; large-scale failures in the provision of biological safety when working with pathogenic biological agents; foreseeable, hard to control consequences of onset and transmission of infectious diseases caused by microorganisms with synthetic genome; occurrence of epidemic events during international mass meetings; justified interpretation of emergency situation, applying IHR (2005), as an after-effect of violation of the Convention on the Prohibition of Biological and Toxin Weapons (CBTW) and the grounds for intervention into the internal affairs of offending countries with social-economic, geo-political aftermaths and damage to the national security.

*Key words:* biological safety, emergency situation of sanitary-epidemiological character of international concern, emergency situation in the sphere of biological safety, risk of emergency situation occurrence, relevant infectious diseases, pathogenic biological agents, microorganisms with synthetic genome, International Health Regulations (2005).

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

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

*Citation:* Smolensky V.Yu., Udovichenko S.K., Toporkov V.P., Kutyrev V.V. Regarding the Risks of Occurrence of Emergency Situations in the Sphere of Biological Safety of International Concern and Their Predictors. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:5–11. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-5-11

При определении современной концепции биологической безопасности (ББ), включающей вариант широкой ее трактовки, и в спектре разработанной понятийной базы определено такое понятие как чрезвычайная ситуация (ЧС) в области биологической безопасности (биологического характера), отличающимися признаками которой являются наличие разрушительных эпидемиологических, социально-

вычаянная ситуация (ЧС) в области биологической безопасности (биологического характера), отличающимися признаками которой являются наличие разрушительных эпидемиологических, социально-

экономических последствий и геополитический резонанс уровня и масштаба национальной и международной безопасности [5]. В качестве примера ЧС в области ББ в литературе приводится эпидемия лихорадки Эбола в Западной Африке в 2013–2016 гг. [6]. Актуальными на сегодняшний день являются анализ и оценка широкого спектра угроз и вызовов на предмет выявления рисков возникновения ЧС в области биологической безопасности, предшественниками которых могут выступать ЧС санитарно-эпидемиологического характера международного значения. Исследованию этого вопроса и посвящена данная работа.

В качестве наиболее актуальных угроз исследованы лихорадка Эбола, лихорадка Зика, грипп птиц А(Н5N1), А(Н7N9), Ближневосточный респираторный синдром, холера, чума, а также целый ряд событий с реальным и потенциальным риском возникновения ЧС в области общественного здравоохранения международного значения, в том числе связанных с развитием синтетической биологии.

В последнее время по параметрам ЧС в области ББ рассмотрена эпидемия лихорадки Эбола в Западной Африке [6], начавшаяся в декабре 2013 г., 8 августа 2014 г. объявленная Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в соответствии с ММСП (2005 г.) чрезвычайной ситуацией в области общественного здравоохранения международного значения, а по существу достигшая масштаба угрозы национальной безопасности для охваченных эпидемией стран и ставшая приоритетной угрозой для всего международного сообщества, т.е. трансформировавшаяся в ЧС в области ББ. В количественном отношении это выглядит так: на август 2014 г. пришелся эксплозивный рост заболеваемости лихорадкой Эбола в Гвинее и Либерии, где еженедельно регистрировалось 150 и 500 случаев соответственно. В Сьерра-Леоне наиболее интенсивный рост заболеваемости, достигавший 500 и более случаев в неделю, отмечен в сентябре–ноябре 2014 г. На 29 ноября 2015 г., по данным ВОЗ, общее количество больных/умерших составило 28637/11315, из них в Гвинее – 3804/2536, Либерии – 10675/4809, Сьерра-Леоне – 14122/3955. После этой даты общее количество больных увеличилось незначительно. Так, на 9 июня 2016 г. (дата объявления ВОЗ о ликвидации эпидемии лихорадки Эбола) зарегистрировано 28646 больных, из них 11323 умерших. Указанный выше экспоненциальный рост количества больных в Гвинее, Либерии, Сьерра-Леоне, заносы болезни в сопредельные страны – Нигерию, Сенегал, Мали, в страны Европы – Великобританию, Испанию, Италию, а также в США являются фактической иллюстрацией примера перерастания ЧС в области общественного здравоохранения в ЧС в области биологической безопасности.

Предикторами такой ЧС были: недостаточный уровень имплементации ММСП (2005 г.) в охваченных эпидемией странах, пропуск начала эпидемии,

недооценка регламентированных в ММСП (2005 г.) признаков, таких как неожиданность, необычность возникшей эпидемической ситуации, серьезный характер проявления, возникновение рисков международного распространения и ограничения международных сообщений, поздняя этиологическая расшифровка эпидемии и ее верификация ВОЗ как ЧС в области общественного здравоохранения международного значения.

Составляющими указанных предикторов являются:

- фактор новой инфекционной болезни, по отношению к которой чаще всего остаются неразработанными или недостаточно представленными средствами индикации и идентификации (лабораторные методы определения этиологического агента, методы специфической профилактики и лечения, наиболее эффективные противоэпидемические мероприятия);

- эффект неожиданности, который обычно присутствует при непрогнозируемой интродукции относительно новой (возникшей в 1976 г.) инфекционной болезни на новую территорию (из Центральной Африки в западную ее часть);

- феномен неготовности национальных и международных структур здравоохранения к изменению синдромного фона болезни (минимизация геморрагического симптомокомплекса и профилирование синдрома острой диареи), увеличившего продолжительность времени выявления и дифференциальной диагностики болезни как раз в период интенсивной диссеминации возбудителя в человеческой популяции;

- фактор непредвиденного и не имеющего аналога темпа продвижения болезни из сельской местности в социум крупных населенных пунктов и столичных городов в сочетании с эксплозивным ростом интенсивности и экстенсивности эпидемического процесса, масштабирования социально-экономической значимости болезни, значительно превышающей ресурсные возможности пораженных стран;

- риск потенциального рукотворного воздействия на ход развития эпидемического процесса с целью испытания боевых качеств биологических агентов и выработки эффективных мер индикации, идентификации, мониторинга, лечения и эпидемиологического контроля.

Оценка предикторов эпидемии лихорадки Эбола в Западной Африке биоценологического, эпизоотологического, пространственного экологического порядка на сегодняшний день может быть сугубо гипотетической.

Другой актуальной инфекционной болезнью, которую следует рассмотреть с точки зрения рисков возникновения ЧС в области ББ, является лихорадка Зика. В 2015 г. лихорадка Зика впервые появилась и стала стремительно распространяться в Американском регионе. До указанного периода ареал болезни, описанной в 1947 г., ограничивался странами Африки, Юго-Восточной Азии и Западной части Тихого океана [7].

В течение 2015–2017 гг. болезнь охватила 48 стран и территорий Северной, Южной, Центральной Америки и Карибского бассейна. Общее число случаев, по данным Панамериканской организации здравоохранения, на 07.09.2017 г. составило 579700. Наиболее неблагоприятная ситуация по инфекционной болезни остается в Бразилии, где зарегистрировано 231725 случаев. Что касается международного распространения лихорадки Зика, то с 2015 г. сообщается о более 8 тыс. случаев завоза болезни на территорию 62 стран мира, в том числе в 21 страну Европейского региона (свыше 1,9 тыс. случаев, из них в Россию – 18), а также в США (5168), Канаду (507) и ряд других государств.

При такой значительной заболеваемости летальные случаи единичны и отмечены у лиц с сопутствующей патологией (всего 20 случаев). Серьезность ситуации, связанной с эпидемическим распространением лихорадки Зика, состоит в неуклонном росте числа больных и стран, в которых регистрируются случаи микроцефалии у детей, родившихся от инфицированных матерей, а также других неврологических нарушений, включая синдром Гийена-Барре. К настоящему времени случаи патологий нервной системы новорожденных отмечены в 31 стране из числа пораженных, случаи неврологических расстройств, в том числе синдром Гийена-Барре, – в 23 странах. Общее количество случаев микроцефалии у детей составило более 3,5 тыс., из них 2,8 тыс. диагностировано в Бразилии.

Таким образом, в связи с ростом числа случаев микроцефалии и других неврологических нарушений при неуклонном распространении лихорадки Зика в мире данная эпидемическая ситуация, согласно требованиям ММСП (2005 г.), приобрела все признаки ЧС санитарно-эпидемиологического характера международного значения, что и нашло отражение в решении совещания Комитета по чрезвычайной ситуации (КЧС), созданного 1 февраля 2016 г. Генеральным директором в соответствии с ММСП (2005 г.) по вопросам микроцефалии, других неврологических нарушений и вируса Зика. Позже, 18 ноября 2016 г., на своем пятом совещании КЧС счел, что ситуация с вирусом Зика уже не представляет ЧС в области общественного здравоохранения, а требует создания полноценного и более долгосрочного технического механизма по принятию мер реагирования на глобальном уровне и рекомендовал преобразовать эти меры в более долгосрочную программу работы по борьбе с заболеванием и связанными с ним последствиями, на которую в целевом порядке будут выделяться необходимые ресурсы. Это решение фактически показало сохранение указанной тенденции и возникновение угрозы здоровью будущих поколений людей и подтвердило, что реальной является возможность перерастания ЧС в области общественного здравоохранения в ЧС в области ББ международного значения, что требует более системного реагирования. Предикторами такой ЧС могут выступать все факторы, которые способствуют

широкому распространению болезни. Сдерживающим фактором является невысокая летальность и проэпидемичивание населения.

В число современных угроз в области ББ следует отнести и прогнозируемое в ММСП (2005 г.) событие – пандемию гриппа нового подтипа (новая – неизвестная болезнь), способную в случае возникновения привести к крайне тяжелым эпидемиологическим, социально-экономическим последствиям для всего международного сообщества. Именно на пандемию гриппа, вызванную новым подтипом возбудителя, ориентируется уровень международной настороженности и готовности. Речь идет об угрозе совмещения в новом гриппе высокой летальности (60 %), свойственной гриппу птиц А(Н5N1), и интенсивности передачи воздушно-капельным путем, присущей сезонному гриппу. Прогнозируется, что при таком гриппе необходимые расходы только на первом этапе борьбы с эпидемией превысят \$800 млрд, что несомненно соответствует параметрам ЧС в области ББ.

Грипп птиц А(Н5N1), известный с 2003 г., к настоящему времени зарегистрирован на территории 16 стран мира. Общее количество случаев инфицирования – 859, включая 453 с летальным исходом (52,7 %). Пик заболеваемости пришелся на 2015 г., когда количество случаев болезни достигло 145, летальных исходов – 42. Наиболее неблагоприятной территорией является Египет, где лабораторно подтверждено 356 случаев заражения, в том числе 119 с летальным исходом. В 2016–2017 гг. отмечена спорадическая заболеваемость, регистрируемая только на территории Египта (10 и 3 случая соответственно). Для вируса гриппа птиц А(Н5N1) установлена возможность передачи от человека к человеку. Случаи передачи документально подтверждены в Таиланде, Китае и Пакистане, что свидетельствует о потенциальной возможности приобретения высокопатогенным вирусом способности к антропонозному распространению.

Что касается другого нового возбудителя гриппа птиц – вируса гриппа А(Н7N9), то территория его распространения ограничена материковой частью Китая. Отмечены единичные завозные случаи на Тайвань, в Гонконг, Малайзию и Канаду. Общее количество заболевших с момента выявления вируса в марте 2013 г. по состоянию на 9 сентября 2017 г. составило 1563 человека, из них 564 летальных (36,1 %). Убедительные доказательства передачи вируса гриппа птиц А(Н7N9) от человека к человеку отсутствуют.

В целом, на сегодняшний день риск возникновения ЧС в области ББ, связанный с циркуляцией вирусов гриппа птиц А подтипов Н5 и Н7, достаточно низкий. Существенным сдерживающим фактором является отсутствие устойчивой передачи от человека к человеку.

В контексте возможного риска возникновения ЧС в области ББ следует упомянуть такую новую ин-

фекционную болезнь как Ближневосточный респираторный синдром (БВРС, англ. Middle East respiratory syndrome, MERS). Случаи заболевания БВРС диагностированы впервые на территории Саудовской Аравии в июне 2012 г. В дальнейшем отмечено последовательное вовлечение в эпидемический процесс новых территорий Ближнего Востока – Катар, Кувейт, Оман, Йемен, Объединенные Арабские Эмираты, Иран, Ливан. К настоящему времени случаи БВРС зарегистрированы в 27 странах, включая заводы в Европу, Азию, Северную Африку, США. По данным Европейского центра по контролю и профилактике заболеваний, с 2012 г. по 2 сентября 2017 г. лабораторно подтвержден 2061 случай, в том числе 782 летальных (37,9 %). На Саудовскую Аравию приходится более 80 % заболевших (1715 случаев, 690 смертей). Установлена возможность передачи нового коронавируса от человека к человеку только при тесном и продолжительном контакте. Среди вторичных случаев 12 % составляют медицинские работники, 33 – пациенты, пребывавшие в одном медицинском учреждении с больными, 14 – заразились в результате тесного контакта с больными в быту. Единственная крупная вспышка указанной болезни, обусловленная заводом и последующим распространением ее как внутрибольничной инфекции, зарегистрирована в Республике Корея в мае–июне 2015 г. – 186 больных, 36 летальных (19,3 %). Нозокомиальный вариант распространения БВРС напоминает подобный тип развития крупной эпидемической вспышки другой новой коронавирусной инфекционной болезни – Тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС, Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS, атипичная пневмония) в 2003 г. Так, на Тайване резкое увеличение числа новых случаев ТОРС, начавшееся с 22 апреля, произошло вследствие вспышки болезни в больнице А г. Тайбэя, распространившейся к 22 мая на ряд других больниц. В указанный срок число инфицированных на Тайване увеличилось с 28 до 483.

Признаков ЧС в области общественного здравоохранения международного значения в проявлении БВРС пока не просматривается. Вместе с тем ВОЗ проводит на постоянной основе оценку риска перерастания ситуации с БВРС в ЧС в области общественного здравоохранения международного значения. Возникновение ЧС в области ББ при нозокомиальном варианте распространения указанной болезни представляется маловероятным, что связано с невысокой контагиозностью, отсутствием эффективных механизмов передачи (передача от человека к человеку ограничена). Не возникло ЧС в области ББ и при распространении эпидемии ТОРС в 2003 г., охватившей 30 стран мира. Общее число больных – 8437, из них умерших – 916 (летальность 11 %). Экономический ущерб от ТОРС по большей части явился следствием сокращения международных поездок и ограничений в трансграничной торговле и составил по существующим оценкам от \$40 млрд до \$60 млрд.

В номенклатуру современных угроз и вызовов в области биологической безопасности следует включить и холеру. Случаи заболевания и вспышки холеры, этиологическим агентом которых выступает холерный вибрион O1, биовара Эль Тор с повышенной вирулентностью, обусловленной наличием в структуре гена холерного токсина В-субъединицы классического биовара, регистрируются на всех континентах. В среднем ежегодно болезнь диагностируют в 59 странах мира. В последнее десятилетие, как и на протяжении всей 7-ой пандемии, сохраняется тенденция к росту заболеваемости. Общее количество заболевших холерой с 2007 по 2016 год составило свыше 2,4 млн человек, зарегистрировано более 1,7 тыс. заносных случаев холеры, в том числе 88 в Российскую Федерацию.

Одним из крупнейших событий последних лет, изменивших мировую структуру заболеваемости, является эпидемия холеры на Гаити, начавшаяся в 2010 г. и едва не достигшая масштаба 8-ой пандемии холеры. Всего с начала эпидемии по 30 августа 2017 г. на Гаити зарегистрировано около 811 тыс. случаев, в том числе около 9,6 тыс. летальных (1,2 %). Из Гаити холера распространилась в Доминиканскую Республику, поразив 31 из 32 провинций страны (33,2 тыс. случаев), а также различные страны мира – США, Канаду, Багамские острова, Чили, Германию, Великобританию и остров Мартинику (департамент Франции).

Приведенные данные о современном этапе развития 7-ой пандемии холеры, связанном с циркуляцией высоковирулентного холерного вибриона, свидетельствуют о возможности развития ЧС в области ББ, предикторами которой могут выступать целый ряд природных, социально-экономических, политических факторов, негативное интегрированное действие которых резко ухудшает условия жизни населения, разрушает санитарно-коммунальную инфраструктуру, снижает уровень надзора и контроля санитарно-эпидемиологической обстановки, что особенно ощутимо в странах с недостаточными ресурсами здравоохранения (Гаити).

Стойкое и длительное неблагополучие по холере в результате заносов болезни формируется на территориях с недостаточно развитой санитарно-коммунальной инфраструктурой, в зонах гуманитарных катастроф и военных конфликтов, что, по существу, и расширяет спектр предикторов ЧС.

Определенные риски возникновения ЧС в области ББ просматриваются и при чуме. Несмотря на относительно невысокий уровень заболеваемости населения чумой в мире и наличие эффективных средств лечения, на примере эпидемических осложнений этой болезни в Республике Алтай в 2014–2016 гг., произошедших вследствие незаконного промысла и контакта с мясом зараженных сурков, совершенно определено прослеживается повышенный риск эпидемического распространения чумы, связанный с высокой частотой обнаружения возбудителя у че-

ловека в верхних дыхательных путях при отсутствии признаков легочной чумы. До эпидемических событий по чуме в Горном Алтае была известна высокая частота (около 50 %) осложнения бубонной чумы легочной формой болезни в природных очагах чумы сурочьего типа, где циркулирует чумной микроб *Y. pestis* ssp. *pestis* biovar *medievalis*. Установленный в Горном Алтае феномен тропности возбудителя чумы к верхним дыхательным путям человека является составляющим компонентом высокой эпидемической значимости возбудителя, которая при определенном сочетании предикторов природного, биологического, социально-экономического порядка может реализоваться в эпидемии и пандемии. О вероятности таких сочетаний и событий могут свидетельствовать две самые крупные, не имеющие аналога в мире по масштабу распространения, связанные с первичным заражением от сурков эпидемии легочной чумы в 1910–1911 и 1920–1921 гг. в регионе Забайкалья, Маньчжурии, Дальнего Востока (в районе Восточно-Китайской железной дороги), когда количество заболевших составило около 160000 человек [1].

В отношении других инфекционных болезней, и конкретно полиомиелита, включенного в перечень болезней, случаи возникновения которых подлежат уведомлению в соответствии с Приложением 2 ММСП (2005 г.), то актуальность проблемы обусловлена продолжающейся циркуляцией дикого полиовируса в трех эндемичных странах (Пакистан, Афганистан и Нигерия) и потенциальной угрозой его выноса на свободные от заболевания территории с последующей местной передачей. Возникновение ЧС в области ББ, сопряженной с инвалидизацией детского населения в условиях высокой эффективности иммунопрофилактики, представляется маловероятным событием. Вместе с тем, сохраняется риск реализации заносов на территориях, где объемы вакцинации не обеспечивают достаточную иммунную прослойку среди населения. Примером подобного распространения дикого полиовируса может послужить ситуация, сложившаяся в мае 2014 г., когда случаи заболевания и вспышки зарегистрированы на территории 10 стран Ближнего Востока и Африки, что привело к возникновению эпидемической ситуации, которую ВОЗ верифицировала как ЧС в области общественного здравоохранения международного значения [2]. Таким образом, по отношению к предиктору эпидемических ситуаций по полиомиелиту, каким является недостаточная вакцинация, предположить существование каких-либо других предикторов ЧС в области ББ с учетом стратегии международного здравоохранения по искоренению полиомиелита в мире на сегодняшний день представляется практически невозможным.

Из числа современных угроз также можно выделить малярию, являющуюся примером возвращающейся паразитарной болезни с достаточно высокой летальностью (тропическая малярия), перманентным процессом развития лекарственной устойчиво-

сти и высокой социально-экономической значимостью, а также лихорадку денге в связи устойчивым неблагополучием в мире, многочисленными эпизодами заносов.

Расширению спектра рисков возникновения ЧС в области ББ, на этот раз обусловленных работой с ПБА (узкий формат ББ), способствуют инциденты, создающие угрозу национальной и международной безопасности. Речь идет о целой серии инцидентов, возникших в последние годы в лабораториях, осуществляющих работу с ПБА 1 класса патогенности, на территории США. Случаи в основном связаны с поставкой из одних лабораторий в другие вместо инактивированных образцов особо опасных ПБА объектов с живым возбудителем, обнаружением неучтенных возбудителей, нарушением регламента работ в лабораториях.

Один из наиболее крупных инцидентов, ставших достоянием общественности, создавших угрозу национальной и международной безопасности, имел место в 2015 г. Он связан с масштабной рассылкой из лабораторий, находящихся в ведении Министерства обороны США, живого возбудителя сибирской язвы. Из четырех лабораторий военного ведомства образцы с живыми микроорганизмами были направлены в 86 лабораторий (192 организации), располагавшихся как на территории США, так и в 9 странах мира (Великобритании, Италии, Австралии, Канаде, Южной Корее, Японии, Германии, Норвегии и Швейцарии). В целом по результатам всесторонней проверки инцидентов в США, попавших в средства массовой информации, серьезные нарушения биологической безопасности были зафиксированы при работе с возбудителями сибирской язвы, лихорадки Эбола, натуральной оспы, гриппа птиц А(Н5N1) [8, 9].

Эти инциденты происходили на фоне тех тяжелых для США последствий распространения спор сибирской язвы посредством почтовых отправок, которые имели место в 2001 г. Тогда заболело 22 человека и умерло 5. Этот резонансный для общественности и национальной безопасности США акт по существу представлял собой ЧС в области ББ.

По поводу увеличившихся инцидентов при работе с ПБА, власти США 29 октября 2015 г. выпустили специальный Меморандум по укреплению биологической безопасности для заместителя государственного секретаря, заместителей министров обороны, внутренних дел, транспорта, торговли, сельского хозяйства, здравоохранения, энергетики, ветеринарии, внутренней безопасности и заместителей руководителей ряда других ведомств [9].

Рассмотренные нарушения ББ при работе с ПБА в зарубежных странах, прежде всего в США, могут служить свидетельством большого количества проводимых исследований, цели и задачи которых не всегда открыты и понятны, прежде всего, с точки зрения контрольных функций в рамках Конвенции о запрете биологического и токсинного оружия

(КБТО). Эта конвенция является на сегодняшний день единственным многосторонним юридически обязывающим международным механизмом, препятствующим разработке опасных микроорганизмов, которые могут быть использованы в противоправных целях. Однако рядом стран, прежде всего США при поддержке Великобритании, Канады и др., проводится работа по ослаблению КБТО и замещению ее другими подконтрольными лишь группе стран механизмами. К таковым можно отнести Глобальное партнерство «Группы семи» против оружия массового уничтожения, которая фактически преследует цель усиления надзора и установления одностороннего контроля за деятельностью в сфере обеспечения биологической безопасности и биотехнологическим потенциалом третьих стран, а также и выведения собственной деятельности в военно-биологической области из-под многостороннего контроля, в том числе в рамках КБТО [3].

Завершая изложение материалов, нельзя не упомянуть, что в спектр рисков возникновения ЧС в области ББ международного значения, наряду с актуальными инфекционными болезнями природного происхождения из регламентированных списков ММСП (2005 г.), входят риски биологического терроризма, разработки биологического оружия, роста значимости технологий двойного назначения, синтетическая биология и др.

В настоящее время в арсенал потенциальных средств биологической агрессии входят, согласно списку Центра по контролю за заболеваниями США, более 40 наименований патогенов, в их числе возбудители лихорадки Эбола, Ласса, Марбург, оспы, ТОРС, желтой лихорадки, лихорадки денге, Рифт-Валли, Крымской геморрагической лихорадки, вероятно, лихорадки Зика, Ближневосточного респираторного синдрома (БВРС-CoV – новая инфекционная болезнь), чумы, холеры, сибирской язвы и др. Все эти нозологии относятся к категории острых угроз в области биологической безопасности. Применение их может быть замаскировано под естественный ход эпидемического процесса. Наряду с микроорганизмами в арсенал потенциальных биотеррористических средств входят и токсины.

Мишенью для совершения атак с использованием патогенов могут служить массовые мероприятия международного характера (ММ). Наряду с этим в условиях ММ любые эпидемические события, обусловленные номенклатурой внешних и внутренних угроз биологической безопасности, способные нарушить ход ММ, причинить серьезный социально-экономический, политический и репутационный ущерб проводящей ММ стране, способны привести к возникновению ЧС в области ББ. Приоритетные направления по предупреждению рисков возникновения ЧС в области ББ охарактеризованы на примере Универсиады-2013 в Казани [4].

В спектре угроз и вызовов в области биологической безопасности необходимо рассматривать воз-

растающие риски информационной безопасности (киберугрозы), в связи с чем их следует трактовать как риск повышения вероятности хакерских атак на потенциально опасные биологические объекты, работающие с особо опасными патогенами. С учетом развития синтетической биологии и информационных технологий, существуют риски неправомерного вмешательства в процессы лабораторного синтеза ДНК и производство живых одноклеточных организмов с заданными свойствами в основном с целью продукции безопасных и полезных для человека и животных веществ. Целью вмешательства может быть преднамеренное искажение нуклеотидной последовательности ДНК вплоть до скрытого внедрения участков генома возбудителей инфекционных болезней I группы патогенности, что может привести к приобретению новым организмом болезнетворных свойств с высоким потенциалом бесконтрольного распространения.

В связи с увеличивающимися рисками подобного вмешательства возрастают требования к информационной и биологической безопасности в лабораториях биосинтетического профиля и импортозамещению оборудования, используемого при экспериментальной работе в области синтетической биологии.

В части синтетической биологии угрозу для здоровья человека могут нести создаваемые для полезных целей синтетические одноклеточные микроорганизмы, вероятно способные приобретать патогенные для человека и животных свойства в процессе циркуляции в объектах внешней среды. О такой вероятности могут свидетельствовать данные из средств массовой информации и научной литературы относительно синтетического микроорганизма *Mycoplasma laboratorium*, он же «Синтетические микоплазменные микойды JCVI-syn1.0» или «Синтия». Этот микроорганизм был создан для обеспечения утилизации углеводов и применен в ходе ликвидации последствий разлива нефти в Мексиканском заливе в 2011 г. Бактерия эффективно перерабатывала сырую нефть и активно размножалась. Площадь загрязнения нефтью значительно уменьшилась. Вскоре в средствах массовой информации появились сообщения о том, что «Синтия» стала поражать живые организмы водно-воздушной среды (рыб, птиц и других животных), а также человека с образованием на коже и слизистых оболочках язв, кровотечениями при 100 % летальности и неэффективности лечения антибиотиками. При отсутствии строгих доказательств значимости «Синтии» в этиологии указанной болезни, неизвестности всего спектра рисков и связанных с их реализацией эпидемиологических проблем, которые несет синтетическая биология, сам по себе факт появления и распространения смертельной болезни человека, угроза ее глобального распространения из Мексиканского залива через Атлантический океан, требуют настороженного отношения к продуктам синтетической биологии, получающим выход в среду обитания человека с труд-

но контролируемые негативными последствиями.

Приведенные выше данные свидетельствуют о представительном и расширяющемся спектре рисков возникновения ЧС в области биологической безопасности национального и международного значения, обусловленных инфекционными болезнями. Вероятно, существуют риски возникновения ЧС в области ББ в сфере массовых неинфекционных болезней токсического характера, что может служить темой отдельного сообщения.

Оценка рисков возникновения ЧС в области ББ является актуальной задачей, направленной на совершенствование стратегического и тактического аспектов готовности в плане предупреждения, выявления и реализации ответных мер, в том числе в случае перерастания ЧС санитарно-эпидемиологического характера в ЧС в области ББ.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Захаров П.В. Эпидемия чумы в Приморской области в 1921 году. Владивосток: Типо-Литография; 1922. 78 с.
2. Заявление ВОЗ по итогам совещания Комитета Международных медико-санитарных правил по чрезвычайной ситуации в отношении международного распространения дикого полиовируса. Всемирная организация здравоохранения (официальный сайт). URL: <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2014/polio-20140505/ru/> (дата обращения 20.08.17).
3. О выполнении Конвенции о запрете биологического и токсинного оружия. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (официальный сайт). URL: [http://rospotrebnadzor.ru/region/rss/rss.php?ELEMENT\\_ID=6955](http://rospotrebnadzor.ru/region/rss/rss.php?ELEMENT_ID=6955) (дата обращения 25.08.17).
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. XXVII Всемирная летняя Универсиада 2013 года в Казани. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия. Тверь: Триада; 2013. 528 с.
5. Онищенко Г.Г., Смоленский В.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Топорков В.П., Топорков А.В., Ляпин М.Н., Кутырев В.В. Актуальные проблемы биологической безопасности в современных условиях. Часть 2. Понятийная, терминологическая и определяющая база биологической безопасности. *Вестник РАМН*. 2013; 11:4–11.
6. Онищенко Г.Г., Топорков В.П., Карнаухова И.Г., Удовиченко С.К. Эпидемия лихорадки Эбола в Западной Африке как чрезвычайная ситуация в области биологической безопасности международного значения. *Инф. бол.: новости, мнения, обучение*. 2016; 1:61–7.
7. Попова А.Ю., Топорков А.В., редакторы. Лихорадка Зика: эпидемиология, клиника, лабораторная диагностика и

меры профилактики. Волгоград: Волга-Пресс; 2016. 192 с.

8. Biological Laboratory Mishaps, 2013–2014 – USA (02): White House Safety Plan. [Internet]. 30 Oct 2015. Archive Number: 20151103.3764901. URL: <http://www.promedmail.org> (дата обращения: 30.08.17).
9. White House Memorandum on Biosafety and Biosecurity Measures. URL: [https://obamawhitehouse.archives.gov/sites/default/files/docs/10-2015\\_biosafety\\_and\\_biosecurity\\_memo.pdf](https://obamawhitehouse.archives.gov/sites/default/files/docs/10-2015_biosafety_and_biosecurity_memo.pdf) (дата обращения 28.08.17).

#### References

1. Zakharov P.V. [Plague epidemic in the Primorsky Region in 1921]. Vladivostok; 1922. 78 p.
2. WHO statement on the meeting of the International Health Regulations Emergency Committee concerning the international spread of wild poliovirus [Internet]. World Health Organization. (Cited 20 Aug 2017). Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2014/polio-20140505/ru/>.
3. [Concerning compliance to the Convention on the Prohibition of Biological and Toxin Weapons (CBTW)]. [Internet]. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare. (Cited 25 Aug 2017). Available from: [http://rospotrebnadzor.ru/region/rss/rss.php?ELEMENT\\_ID=6955](http://rospotrebnadzor.ru/region/rss/rss.php?ELEMENT_ID=6955).
4. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [XXVII World Summer Universiade, 2013 in Kazan. Provision of Sanitary-Epidemiological Welfare]. Tver: "Triada"; 2013. 528 p.
5. Onishchenko G.G., Smolensky V.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Toporkov V.P., Toporkov A.V., Lyapin M.N., Kutyrev V.V. [Topical issues of biological safety provision under the current conditions. Part 2. Definitive, terminological and interpretive bases of biological safety]. *RAMS Bulletin*. 2013; 11:4–11.
6. Onishchenko G.G., Toporkov V.P., Karnaukhov I.G., Udovichenko S.K. [Ebola fever epidemic in West Africa countries as an emergency situation in the sphere of biological safety of international concern]. *Infek. Bol.: Novosti, Mneniya, Obucheniye*. 2016; 1:61–7.
7. Popova A.Yu., Toporkov A.V., editors. [Zika Fever: Epidemiology, Clinical Picture, Laboratory Diagnostics, and Prophylactic Measures]. Volgograd: "Volga-Press"; 2016. 192 p.
8. Biological Laboratory Mishaps, 2013–2014 – USA (02): White House Safety Plan [Internet]. 30 Oct 2015 (cited 30 Aug 2017). Archive Number: 20151103.3764901. Available from: <http://www.promedmail.org>.
9. White House Memorandum on Biosafety and Biosecurity Measures [Internet]. (Cited 28 Aug 2017). Available from: [https://obamawhitehouse.archives.gov/sites/default/files/docs/10-2015\\_biosafety\\_and\\_biosecurity\\_memo.pdf](https://obamawhitehouse.archives.gov/sites/default/files/docs/10-2015_biosafety_and_biosecurity_memo.pdf).

#### Authors:

*Smolensky V.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.

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

#### Об авторах:

*Смоленский В.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.

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

Поступила 12.09.17.

А.С.Водопьянов, В.В.Баташев, С.О.Водопьянов, С.В.Титова, Н.Л.Пичурина, И.П.Олейников,  
А.В.Самородова, В.Д.Кругликов, Л.М.Веркина

## РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ПРОСТРАНСТВЕННОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ «ТЕРРИТОРИЙ РИСКА» ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ ВНЕШНИХ УГРОЗ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМУ БЛАГОПОЛУЧИЮ

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

Цель данного исследования состояла в разработке методики выявления административно-независимых потенциальных территорий риска при реализации внешних эпидемиологических угроз на примере холеры. **Материалы и методы.** Анализ проводили с использованием бесплатного программного обеспечения с открытым исходным кодом (QGIS 2.8 и GRASS GIS 7.0) на основе данных, полученных от Росграницы и Федеральной службы государственной статистики. Построение картограмм риска проводили на основе евклидовой дистанции и оценки плотности ядер. **Результаты и выводы.** Создана ГИС, содержащая информацию о пунктах пропуска через границу Российской Федерации, населенных пунктах, автомобильных дорогах и железнодорожных магистралях. Разработана методика выявления территорий риска завоза инфекционных болезней на модели холеры, при этом их суммарная площадь составила менее 1 % от всей площади страны. Установлено, что в ряде случаев территория риска располагается на некотором удалении от пункта пропуска, но наличие пункта пропуска не всегда приводит к формированию территории риска. Разработанная ГИС доступна на геоинформационном портале ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт».

*Ключевые слова:* внешние угрозы санитарно-эпидемиологическому благополучию, эпидемиологический риск, холера, географическая информационная система.

*Корреспондирующий автор:* Водопьянов Алексей Сергеевич, e-mail: vodopyanov\_as@antiplague.ru.

A.S.Vodopianov, V.V.Batashev, S.O.Vodopianov, S.V.Titova, N.L.Pichurina, I.P.Oleinikov, A.V.Samorodova,  
V.D.Kruglikov, L.M.Verkina

## Development of Spatial Analysis Techniques for Identification of «Risk Areas» in Case of External Threats Realization as regards Sanitary and Epidemiological Welfare

**Objective** of the study was to develop the methodology for identification of administratively independent areas under potential risk of “external” epidemiological threat realization, by the example of cholera. **Materials and methods.** Analysis was conducted using free software package with open source code (QGIS 2.8 and GRASS GIS 7.0) on the basis of the data received from Rosgrantsa and the Federal State Statistics Service. The construction of risk cartogram was performed on the base of Euclidean distance and estimation of nuclear density. **Results and conclusions.** In accordance with the obtained results, the GIS containing information about the checkpoints on the Russian border, settlements, roads and railway lines was worked out. The method of identification of risk areas due to importation of infectious diseases based on the cholera model has been developed, and the total area of such territories was less than 1 % of the total area of the country. It was found that in some cases the risk area is located at a certain distance from the checkpoint, but the existence of checkpoint does not lead to the formation of risk areas. The developed GIS is available on the geo-information portal of FGHI Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor.

*Keywords:* external threats to sanitary-epidemiological welfare, epidemiological risk, cholera, geographic information system.

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

*Corresponding author:* Alexey S. Vodopianov, e-mail: vodopyanov\_as@antiplague.ru.

*Citation:* Vodopianov A.S., Batashev V.V., Vodopianov S.O., Titova S.V., Pichurina N.L., Oleinikov I.P., Samorodova A.V., Kruglikov V.D., Verkina L.M. Development of Spatial Analysis Techniques for Identification of “Risk Areas” in Case of External Threats Realization as regards Sanitary and Epidemiological Welfare. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:12–15. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-12-15

Современные геоинформационные системы (ГИС) – это компьютерные технологии, которые обеспечивают комплексную автоматизацию процессов сбора, хранения, обработки и анализа информации с ее визуализацией на электронных картах.

С внедрением компьютерных технологий и географических информационных систем появилась возможность применять математический аппарат моделирования тематического содержания карт и создавать типологические, синтетические и систем-

ные медико-географические карты высокого уровня.

В эпидемиологии инфекционных болезней понятие «риск» рассматривается как возможность (вероятность) наступления какого-либо неблагоприятного события. При этом под термином «территория риска» рассматриваются не только территории с высокими показателями заболеваемости, но и вероятного заноса болезней, требующих проведения мероприятий по санитарной охране [5]. При этом эпидемиологические осложнения, связанные с заносом

возбудителя инфекции, определяются как «внешние» угрозы, а обусловленные активизацией местных зоологических форм как «внутренние» [7]. Однако риск заноса инфекций из-за рубежа, например, возбудителя холеры, в различных районах может быть неодинаковым [1, 4].

В последние годы помимо эндемичных территорий в Индии и Бангладеш выявлено формирование очагов в 12 странах Африки [3, 6]. На территории Российской Федерации случаи выделения возбудителя холеры всегда были связаны с заносами инфекции из других стран. Это позволило сделать вывод, что для нашей страны холера представляет собой внешнюю угрозу [6], при этом все заносы инфекции выявлены в глубине территории нашей страны [2].

На данный момент эпидемиологический надзор за холерой на территории Российской Федерации строится на дифференциации административных территорий по важнейшим критериям: удельный вес случаев заболеваний холерой, максимальные показатели заболеваемости на 100 тыс. населения, заносы инфекции, сезонность обнаружения холерных вибрионов в водных объектах и другие. Очевидно, что территория субъекта Российской Федерации является неоднородной по степени эпидемиологического риска. Так, даже небольшие поселения, расположенные поблизости от крупных городов и международных пунктов пропуска, подвергаются большому риску по сравнению с населенными пунктами, расположенными вдали от городов и крупных транспортных магистралей. Использование методов пространственной статистики позволяет анализировать взаимосвязи между различными факторами, характеризующими риск завоза инфекций без учета административного деления.

Например, аналогичный подход использован при выявлении зон риска при анализе распространения случаев холеры в Нигерии [9]. При этом авторы строили отдельные картограммы по таким факторам как плотность населения, зоны подвоза воды, удаленность от водопровода, плотность открытых водоемов, наличие скважин и количество осадков.

При анализе распространения малярии в Танзании [8] исследователи построили 20 слоев, каждый из которых отражал отдельный фактор, влияющий на распространение малярии, что позволило выявить несколько зон высокого риска.

В связи с этим, цель данного исследования состояла в разработке методики выявления административно-независимых потенциальных территорий риска при реализации внешних эпидемиологических угроз, например холеры.

### Материалы и методы

Для пространственного анализа использовали бесплатную ГИС с открытым исходным кодом QGIS версий 2.2–2.6. Для отображения карт применяли сво-

бодно распространяемую JavaScript библиотеку leaflet (leaflet.org). Пространственные расчеты проводили с использованием модулей GRASS GIS 7.0 (grass.osgeo.org). Картографические данные получены из проекта OpenStreetsMap (openstreetmap.org). Данные о расположении пунктов пропуска через государственную границу получены с официального сайта Росграницы (rosgranitsa.ru). Для оценки численности населения крупных населенных пунктов использованы данные Федеральной службы государственной статистики (gks.ru). В работе использовали данные о выделении токсигенных штаммов холерного вибриона с 2006 по 2015 год на основе анализа паспортов из Музея живых культур ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт». Картограммы, отражающие влияние отдельных факторов, строили на основе евклидовой дистанции (Euclidean distance) и оценки плотности на основе бивесовой функции ядра (QGIS 2.8).

### Результаты и обсуждение

Для выявления территорий риска мы использовали данные о расположении пунктов пропуска граждан из других стран на территорию Российской Федерации, крупных населенных пунктов, в которые могут направляться больные, наличии интенсивных автомобильных и железнодорожных транспортных магистралей и узлов.

Для оценки риска сформированы четыре отдельные картограммы, каждая из которых отражает пространственное распределение одного анализируемого фактора.

Так, на основе расположения пунктов пропуска через государственную границу РФ составлена картограмма, на которой риск в каждой конкретной точке определялся, исходя из удаленности от пункта пропуска, включая международные аэропорты. В качестве примера приведен фрагмент карты территории Краснодарского края, на котором отражена картограмма территорий риска, рассчитанных с учетом расположения пунктов пропуска через государственную границу РФ.

Аналогичные картограммы построены для крупных федеральных и региональных автомобильных дорог и основных железнодорожных магистралей.

Одним из факторов, учитываемых предлагаемой методикой, является наличие крупных населенных пунктов вблизи пунктов пропуска через государственную границу. В связи с этим построена картограмма уровней риска близлежащих населенных пунктов, свидетельствующая о взаимосвязи населенных пунктов, имеющих транспортные связи с пунктами пропуска, и численностью населения, проживающего в каждом из них. Значимость каждого населенного пункта для оценки риска определяли как натуральный логарифм от числа жителей.

Для оценки интегративного риска построена результирующая картограмма, при этом значение каж-

дой точки рассчитывалось по формуле:

$$\text{РИСК} = (\text{Кавто} \times \text{Равто} + \text{Кжд} \times \text{Ржд} + \text{Кнас} \times \text{Рнас}) \times \text{Кпп} \times \text{Рпп},$$

где РИСК – интегративное выражение риска заноса в каждой точке результирующей картограммы; Равто, Ржд, Рнас, Рпп – уровень риска в каждой точке картограмм, рассчитанных на основе расположения автодорог, железнодорожных магистралей, населенных пунктов и пунктов пропуска; Кавто, Кжд, Кнас, Крпп – коэффициенты для каждой из картограмм.

Для определения коэффициентов на карту нанесены места заноса токсигенных штаммов холерного вибриона на территорию нашей страны за последние 10 лет. При этом подбор коэффициентов проведен таким образом, чтобы все места заноса холерных вибрионов имели максимальное значение РИСКА при минимальной сумме РИСКА всех точек карты. В результате значение  $\text{Кавто} = 0,45$ ,  $\text{Ржд} = 0,55$ ,  $\text{Рнас} = 1,0$ ,  $\text{Рпп} = 1,2$ .

На основании этого построена итоговая картограмма, каждая точка которой отражала интегративный риск по угрозе завоза болезней в числовом эквиваленте, колеблющемся от 0 до 14000. При этом граница условных зон (территорий) риска была определена на основе изолинии со значением 5000 (минимальное значение, при котором все места заноса токсигенных холерных вибрионов попадают в зону риска). Последним этапом анализа является наложение на результирующую картограмму территорий риска административных границ.

Рассчитанные территории риска легли в основу ГИС, расположенной на геоинформационном портале Ростовского-на-Дону противочумного института по адресу: [http://gis.antiplague.ru/risk\\_inf.php](http://gis.antiplague.ru/risk_inf.php).

При детальном анализе картограммы удалось установить, что ряд выявленных территорий риска располагается вокруг пунктов пропуска. В качестве примера можно привести города Ростов-на-Дону (областной центр), Таганрог, Азов (рис. 1). При этом размер территории риска напрямую зависит от числа жителей в населенном пункте и интенсивности ав-

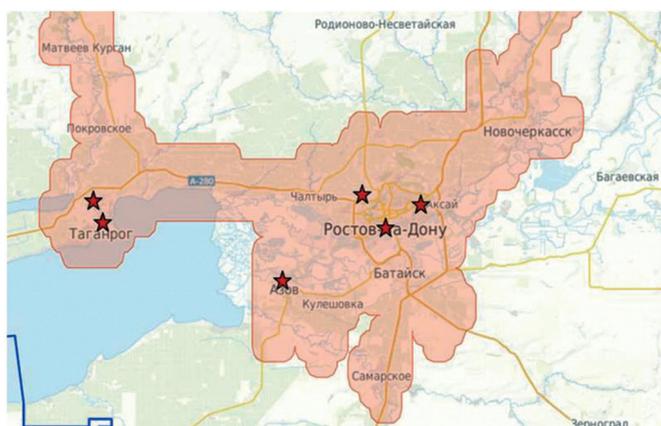


Рис. 1. Взаимное расположение территории риска и пунктов пропуска через границу. Территория риска отображена красным цветом, пункты пропуска – красной звездочкой



Рис. 2. Фрагмент границы между Украиной и Белгородской областью. В районе пункта пропуска «Клименки» зоны риска нет

томобильных и железнодорожных путей сообщения. Как видно из рис. 2, в Новочеркасске пункта пропуска нет, однако включение данного населенного пункта в территорию риска объясняется близостью к пунктам пропуска в Ростове-на-Дону и наличием интенсивного транспортного сообщения с областным центром.

Некоторые пункты пропуска не привели к формированию территорий риска, что, скорее всего, объясняется отсутствием поблизости крупных населенных пунктов и транспортных узлов (рис. 2).

Значение взаимного влияния расположения крупных населенных пунктов и транспортных магистралей показано на примере пунктов пропуска на автомобильном транспорте «Бугаевка» и пункта пропуска на железнодорожном транспорте «Гартмашевка», расположенных в Воронежской области (рис. 3). При этом сами пункты пропуска не формируют территории риска в связи с тем, что находятся вне пределов населенных пунктов, однако, по данным многофакторного пространственного анализа, установлено наличие значительной территории риска в селе Кантемировка, находящемся на расстоянии около 10 км от указанных пунктов пропуска.

Таким образом, предложенная методика, как новый элемент дополнительного подхода к эпидемиологическому надзору, позволяет выявлять территории риска с учетом пунктов пропуска через государственную границу и характеризовать территории как:

- территории риска, которые формируются вокруг пункта пропуска через государственную границу;
- территории риска, которые формируются на некотором удалении от пункта пропуска (в ближайшем крупном населенном пункте с транспортным

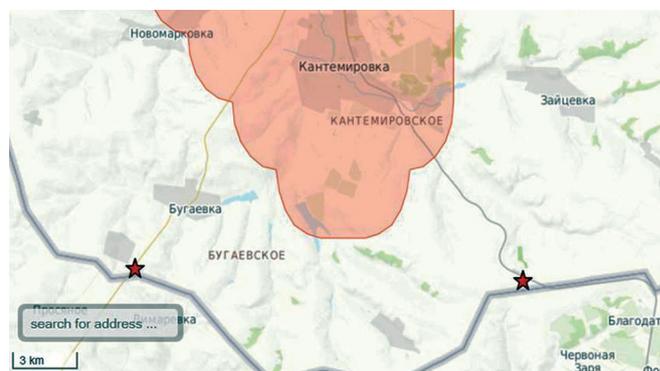


Рис. 3. Фрагмент границы между Украиной и Воронежской областью. Взаимное расположение территории риска и автомобильного пропускного пункта «Бугаевка» (слева) и железнодорожного «Гартмашевка» (справа)

узлом);

- отсутствие территорий риска, несмотря на наличие пункта пропуска.

При анализе территорий риска установлена неравномерность их распределения на территории Российской Федерации. Так, в Республике Крым площадь территорий риска составляет 47,21 % от всей площади региона, в Ростовской области – 8, в то время как в ряде регионов, например в Вологодской области, этот показатель составляет 0,24.

Учитывая динамичность этого распределения во времени важно, что использование компьютерных геоинформационных систем дает возможность коррекции информационных слоев (например, добавление новых пунктов пропуска, открытие или закрытие транспортных магистралей). При этом итоговая картограмма риска, быстро перестроенная с учетом изменившейся обстановки, может быть использована в оперативной работе эпидемиолога.

Таким образом, разработана методика, позволяющая выявлять территории риска по угрозе заноса инфекционных болезней, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территорий, из зарубежных стран. Проведена апробация разработанной методики на модели холеры. Разработанная методика и созданная ГИС могут быть использованы для совершенствования противоэпидемических мероприятий, направленных на недопущение завоза опасных инфекционных болезней.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вишняков В.А., Носков А.К., Чеснокова М.В., Лапа С.Э., Дампилова И.Г. Транспортная инфраструктура как внешний риск формирования чрезвычайных ситуаций эпидемиологического характера в Забайкальском крае. *Дальневосточный журн. инф. патол.* 2014; 24(24):124–6.
2. Кутырев В.В. Актуальные проблемы особо опасных инфекционных болезней и санитарная охрана территорий в современных условиях. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2008; 1:17–23.
3. Москвитина Э.А., Мазрухо А.Б., Адаменко О.Л., Арешина О.А., Назаретян А.А., Кругликов В.Д., Иванова С.М., Козина Д.А. Характеристика эпидемиологической обстановки по холере в мире (2003–2012 гг.) и прогноз на 2013 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 1:11–7.
4. Носков А.К., Вишняков В.А., Лапа С.Э., Зайцева Т.А., Дампилова И.Г., Попова А.В. Санитарная охрана территории субъекта Российской Федерации. Сообщение 2. Дифференциация территории субъекта РФ по риску возникновения болезней, представляющих опасность для населения. *Бюлл. Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения РАМН.* 2013; 1(89):140–4.
5. Онищенко Г.Г., Пяташина М.А., Удовиченко С.К., Топорков А.В., Топорков В.П., Кутырев В.В. О двухуровневой структуре потенциальной эпидемической опасности массовых мероприятий с международным участием. *Пробл. особо опасных*

*инф.* 2015; 1:5–9.

6. Титова С.В., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Самородова А.В., Тюленева Е.Г., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Архангельская И.В., Иванова С.М., Ковалева Т.В., Водопьянов С.О. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2006–2015 гг. Прогноз на 2016 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 1:20–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-20-27.

7. Удовиченко С.К., Топорков А.В., Карнаухов И.Г., Сафронов В.А., Кедрова О.В., Топорков В.П., Кутырев В.В. Оценка внешних и внутренних угроз санитарно-эпидемиологическому благополучию населения в условиях проведения массовых спортивных мероприятий. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 2:26–32.

8. Hagenlocher M., Castro M.C. Mapping malaria risk and vulnerability in the United Republic of Tanzania: a spatial explicit model. *Popul. Health Metr.* 2015; 13(1):2. DOI: 10.1186/s12963-015-0036-2.

9. Nkeki F.N., Osirike A.B. GIS-Based Local Spatial Statistical Model of Cholera Occurrence: Using Geographically Weighted Regression. *Journal of Geographic Information System.* 2013; 5:531–42. DOI: 10.4236/jgis.2013.56050.

#### References

1. Vishnyakova V.A., Noskov A.K., Chesnokova M.V., Lapa S.E., Dampilova I.G. [Transport infrastructure as an external risk of occurrence of emergency situations of epidemiological character in the Trans-Baikal Territory]. *Dal'nevost. Zh. Infek. Patol.* 2014; 24(24):124–6.
2. Kutyrev V.V. [Topical issues of particularly dangerous infectious diseases and sanitary protection of the territories under current conditions]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2008; 1:17–23.
3. Moskvitina E.A., Mazrukho A.B., Adamenko O.L., Areshina O.A., Nazaretyan A.A., Kruglikov V.D., Ivanova S.M., Kozina D.A. [Characteristics of the epidemiological situation on cholera the world over in 2003–2012 and Prognosis for 2013]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 1:11–7.
4. Noskov A.K., Vishnyakov V.A., Lapa S.E., Zaitseva T.A., Dampilova I.G., Popova A.V. [Sanitary protection of the territory of RF constituent entity. Communication 2. Differentiation of the territory of RF constituent entity in accordance with the level of risk of disease emergence, which pose a threat to the population]. *Bulletin of the East-Siberian Scientific Center of RAMS Siberian Branch.* 2013; 1(89):140–4.
5. Onishchenko G.G., Pityashina M.A., Udovichenko S.K., Toporkov A.V., Toporkov V.P., Kutyrev V.V. [Concerning two-level structure of potential epidemic hazard of the mass events with international participation]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2015; 1:5–9.
6. Titova S.V., Moskvitina E.A., Kruglikov V.D., Samorodova A.V., Tyuleneva E.G., Monakhova E.V., Pisanov R.V., Vodop'yanov A.S., Arkhangel'skaya I.V., Ivanova S.M., Kovaleva T.V., Vodop'yanov S.O. [Cholera: analysis of epidemiological situation across the world and in Russia within a period of 2006–2015]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 1:20–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-20-27.
7. Udovichenko S.K., Toporkov A.V., Karnaukhov I.G., Safronov V.A., Kedrova O.V., Toporkov V.P., Kutyrev V.V. [Evaluation of external and internal threats to sanitary-epidemiological welfare of the population in the context of mass sporting events]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 2:26–32.
8. Hagenlocher M., Castro M.C. Mapping malaria risk and vulnerability in the United Republic of Tanzania: a spatial explicit model. *Popul. Health Metr.* 2015; 13(1):2. DOI: 10.1186/s12963-015-0036-2.
9. Nkeki F.N., Osirike A.B. GIS-Based Local Spatial Statistical Model of Cholera Occurrence: Using Geographically Weighted Regression. *Journal of Geographic Information System.* 2013; 5:531–42. DOI: 10.4236/jgis.2013.56050.

#### Authors:

Vodopianov A.S., Batashev V.V., Vodopianov S.O., Titova S.V., Pichurina N.L., Oleinikov I.P., Samorodova A.V., Kruglikov V.D., Verkina L.M. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aanet.ru.

#### Об авторах:

Водопьянов А.С., Баташев В.В., Водопьянов С.О., Титова С.В., Пичурина Н.Л., Олейников И.П., Самородова А.В., Кругликов В.Д., Веркина Л.М. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aanet.ru.

Поступила 14.04.17.

А.А.Кузнецов<sup>1</sup>, С.М.Голосовский<sup>2</sup>, А.Н.Матросов<sup>1</sup>, А.М.Поршаков<sup>1</sup>, А.А.Лопатин<sup>1</sup>

## ПЕРСПЕКТИВЫ СТАНДАРТИЗАЦИИ И СИСТЕМАТИЗАЦИИ ПУНКТОВ ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ ТЕРРИТОРИЙ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЧУМЫ

<sup>1</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов;

<sup>2</sup>ФКУЗ «Астраханская противочумная станция», Астрахань, Российская Федерация

Существующий в настоящее время порядок свободного позиционирования и регистрации мест забора проб полевого материала приводит к хаотическому нагромождению изображаемых на карте значков обследованных участков, затрудняющему пространственный анализ результатов мониторинга за тот или иной период. **Цель исследования.** Разработка системы стандартизации, расположения и нумерации пунктов эпизоотологического обследования при мониторинге природных очагов чумы. **Материалы и методы.** Топографические карты, материалы эпизоотологического картографирования и их анализ. **Результаты и выводы.** Оптимальный размер точки эпизоотологического обследования (ТЭО): 10 секунд по широте, 15 секунд по долготе. В рамках одного сектора умещается 900 стандартных ТЭО. Предлагаемая система стандартизации обследуемых пунктов способна существенно упростить процесс эпизоотологического и эпидемиологического картографирования, улучшить визуализацию результатов мониторинга, а также расширить возможности и качество пространственного и ретроспективного анализа эпизоотической активности природных очагов чумы.

**Ключевые слова:** природный очаг чумы, эпизоотологический мониторинг, ГИС-картографирование.

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

A.A.Kuznetsov<sup>1</sup>, S.M.Golosovsky<sup>2</sup>, A.N.Matrosov<sup>1</sup>, A.M.Porshakov<sup>1</sup>, A.A.Lopatin<sup>1</sup>

## Prospects of Standardization and Systematization of the Points for Epizootiological Surveillance of Natural Plague Foci

<sup>1</sup>Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation; <sup>2</sup>Astrakhan Plague Control Station, Astrakhan, Russian Federation

Currently existent procedure for free positioning and registration of sites for field sample collection results in chaotic concentration of visualized on electronic map icons of surveyed areas, which obstructs spatial analysis of the results on monitoring in a given period of time. **Objective** of the study is to develop the system of standardization, positioning, and numbering of the points for epizootiological surveillance as part of monitoring over natural plague foci. **Materials and methods.** Topographical maps, epizootiological mapping data and their analysis. **Results and conclusions.** Optimum size of the icons corresponding to sites of epizootiological surveillance (SES) is 10 seconds in latitude and 15 seconds in longitude. One sector comprises 900 standard SESs. Put forward system of optimization is able to significantly ease epizootiological and epidemiological mapping, enhance visualization of monitoring data, as well as expand the capacities and improve the quality of spatial and retrospective analysis of epizootic activity of natural plague foci.

**Key words:** natural plague focus, epizootiological monitoring, GIS-mapping.

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

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

**Citation:** Kuznetsov A.A., Golosovsky S.M., Matrosov A.N., Porshakov A.M., Lopatin A.A. Prospects of Standardization and Systematization of the Points for Epizootiological Surveillance of Natural Plague Foci. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:16–20. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-16-20

В практике эпизоотологического обследования природных очагов чумы обязательным этапом является создание карт дислокации мест забора проб полевого материала, направляемого для лабораторного исследования. В подразделениях и сезонных формированиях каждой противочумной станции (отделениях, противэпидемических отрядах) изготавливают карты закрепленных территорий, исполненные на бумажном носителе в настенном варианте, предназначенные для демонстрации хода выполнения и результатов эпизоотологического обследования в данный период. Как правило, эти карты изготавливают в километровом масштабе. Длительное хранение карт, поиск и использование информации по нанесенным на карту точкам затруднено, а в случае использования мелкомасштабных карт – вообще невозможно.

Весьма сложно разобраться с информацией по конкретным точкам эпизоотологического обследования (ТЭО) даже в случаях, когда они пронумерованы.

При ретроспективном анализе, когда требуется суммировать результаты мониторинга за ряд лет путем наложения картографической информации, возникают проблемы графического характера. В соответствии с установленными правилами выбор конкретного места для сбора полевого материала осуществляет руководитель зоологической бригады по собственному усмотрению, что совершенно оправдано. Норматив иногда устанавливают только для расстояния между соседними точками (которое не должно быть меньше 1 км), обследуемыми в данный сезон или конкретную декаду. При повторном обследовании территории (в тот же или следующий

сезон), особенно при необходимости повторного взятия пробы полевого материала в конкретной точке, вновь облавливаемый участок может оказаться в различной степени смещенным в ту или иную сторону от первоначального. Во всех подобных случаях точки, изображаемые в виде кружков, полностью или частично накладываются друг на друга, образуя хаотическое нагромождение, существенно затрудняющее пространственную дифференциацию отдельных мест отбора проб. В случае интенсивного обследования эффект нагромождения возникает даже при показе данных всего лишь за один сезон (рис. 1). В этой ситуации (как на бумажной карте, так и на экране монитора) резко ограничена возможность целенаправленного выбора требуемой точки для просмотра имеющихся о ней сведений, полученных в предыдущие периоды обследования.

### Материалы и методы

Для разработки и последующего анализа системы расположения и обозначения (нумерации) пунктов сбора полевого материала использовали цифровые топографические карты, их растровые копии и реальные картографические данные о результатах эпизоотологического мониторинга.

### Результаты и обсуждение

Учитывая трудность пространственной детализации результатов эпизоотологического мониторинга

при свободном позиционировании обследуемых участков, мы разработали систему их картографической стандартизации и привязки, упрощающую процесс нанесения информации на карту и последующий ее поиск. Система обеспечивает также более четкую и понятную визуализацию результатов мониторинга на карте, а использованный в ней прием графической формализации данных обследования не снижает точности пространственного анализа эпизоотической активности природных очагов чумы. Следует подчеркнуть, что предлагаемая система, прежде всего, предназначена для реализации на ГИС-сервере (РосНИПЧИ «Микроб» и другие НИПЧИ), где специалисты-операторы ведут работу с электронными паспортами природных очагов чумы [1]. Работа полевых зоологов, включающая обязательное определение координат на месте сбора полевого материала, не изменяется. С введением в практику мониторинга ГИС-технологий, проблемы накопления, хранения, поиска и анализа данных резко идут на убыль. Тем не менее, эффект нагромождения графической информации при ретроспективном анализе многолетних данных остается в прежнем виде с той лишь разницей, что происходит это на экране монитора, а не на бумажной карте. Решение проблемы вычленения информации в условиях ее нагромождения заключается в подходах к интерпретации понятия «точка эпизоотологического обследования». Это понятие следует рассмотреть более подробно.

В соответствии с практикой обследования и по-

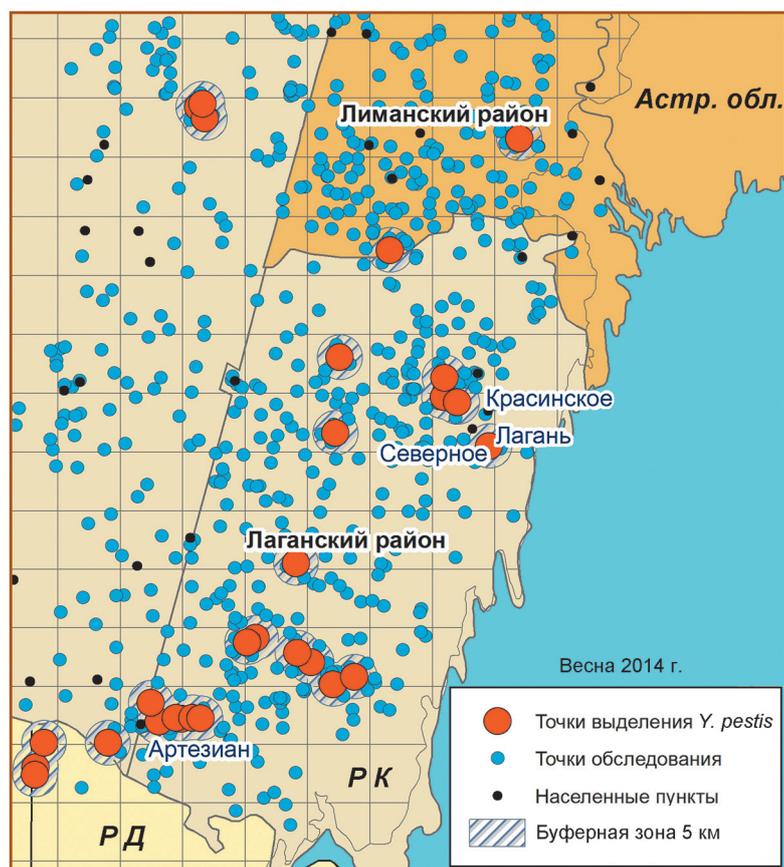


Рис. 1. Фрагмент скриншота интерактивной карты Прикаспийского песчаного очага чумы (Астраханская область, Республика Калмыкия и Республика Дагестан) с результатами эпизоотологического мониторинга весной 2014 г.

ложениями нормативно-методических документов, регламентирующих мероприятия эпидемиологического надзора за чумой, точкой (пунктом) сбора полевого материала считается участок местности, где выставляются орудия лова грызунов, осматриваются или раскапываются их норы с целью добычи эктопаразитов, собираются иные природные объекты, подходящие для выявления возбудителя чумы в лабораторных условиях. Размеры и конфигурация непосредственно обследуемого участка местности строго не регламентируются, но обычно его площадь не превышает 9–10 гектаров, и он вписывается в условную площадку произвольной формы в поперечнике не более 500 м. Рассредоточение орудий лова или осматриваемых нор по участку может быть весьма разнообразным. «Адрес» участка – его координаты – при таких параметрах является достаточно условным понятием. Согласно современным требованиям координаты точки обследования (широта и долгота) определяют с помощью приемника спутниковых сигналов (ГЛОНАСС/GPS) приблизительно в геометрическом центре обследуемого участка. На весь полевой материал, собранный на участке, составляют этикетку с указанием единых для него координат. В случае обнаружения здесь зараженного чумой грызуна или его эктопаразитов определить точное место их сбора (конкретную нору) невозможно. Однако это и не требуется, поскольку перемещения грызунов по участкам обитания происходят в течение суток неоднократно, а их дистанции достигают 200–300 м и больше. В результате перемещений и посещений зверьками различных нор между ними происходит регулярный обмен эктопаразитами. Учитывая все эти обстоятельства, допустимо принять в качестве оптимального размера точки эпизоотологического обследования участок площадью 300×300 м.

Как уже говорилось, в практике мониторинга существует необходимость повторного обследования определенных точек (через декаду, месяц, год и т.д.). Невозможно представить ситуацию, когда при повторном обследовании намеченной точки будут определены ее координаты точно в том же месте, как и в прошлый раз. Отклонения могут измеряться десятками и сотнями метров. Но это будут уже другие координаты, а, следовательно, и другая новая точка, хотя фактически полевой материал (весь или частично) мог быть добыт на ней из тех же самых нор. Вблизи могут оказаться и другие точки, обследованные в прошлом без цели повторного забора проб. Все это и создает эффект нагромождения при анализе многолетнего материала. Тесно сгруппированных точек может оказаться очень много, накладываясь друг на друга они могут в самой различной степени и совмещаться как бы по цепочке, растянувшейся на большое расстояние, поэтому весьма сложно определить какие же из них считать повторно обследованными, а какие нет.

Значительные размеры обследуемых участков и то, что ошибка определения координат приемниками

спутниковых сигналов, работающими в автономном режиме, может достигать 100 м, делает понятие ТЭО достаточно абстрактным. Поэтому все перечисленные выше обстоятельства позволяют уверенно установить уровень точности, достаточный для определения координат пунктов обследования ( $\pm 100$  м), и внедрить систему упорядочивания и стандартизации мест сбора полевого материала, исключающую хаотическое нагромождение географической информации. Суть предлагаемой системы заключается в картометрическом формировании стандартных участков забора проб полевого материала, определяемых с геодезической точностью на топографических картах. Оптимальный размер стандартного участка (фактически – ТЭО) – 15 секунд по долготе и 10 секунд по широте. На широтах природных очагов чумы Российской Федерации такой участок будет занимать приблизительно 300×300 м, что вполне соизмеримо с реально обследуемыми площадями. Логично привязать рамки стандартных ТЭО к рамкам секторов, регламентируемых методическими указаниями по паспортизации природных очагов чумы. В каждом секторе умещается 900 участков, поскольку и горизонтальные, и вертикальные рамки сектора делятся на 30 отрезков каждая. Нумерацию ТЭО логично провести по общепринятым в картографии правилам: слева направо и сверху вниз с трехзначной формой написания (от 001 до 900).

Один из возможных вариантов внешнего вида крупномасштабной карты сектора представлен на рис. 2. На цифровой карте сетка ТЭО может включаться и отключаться по команде оператора. При необходимости могут отображаться рамки и номера только тех точек, которые обследованы в запрашиваемый отрезок времени. Такие точки должны дополнительно выделяться цветом, вариации которого могут обозначать ту или иную кратность обследования и т.д. Использование электронных карт подразумевает также отказ в будущем от бумажных настенных карт и демонстрацию результатов обследования с помощью цифрового проектора.

Оправданным является включение номера ТЭО в шифры секторов, что делает подобное шифрование адресов мест сбора полевого материала достаточно точным, позволяющим обойтись без других форм адресации. Тем не менее, о других формах адресации необходимо сказать, что указание реальных долготы и широты места работы в полевых условиях является обязательным условием для последующего определения номера ТЭО, который используется оператором для нанесения данных на карту. Описательная форма (название урочища, местности, населенного пункта, румб и расстояние от известного ориентира и т.д.) необходима для использования в текстовой части отчетов, статей, справок и в процессе обсуждения специалистами. Общий шифр сектора и ТЭО выглядит следующим образом: 123802214(14)219, где первые 9 цифр обозначают номенклатуру листа топографической карты масштаба 1:25000, соответ-

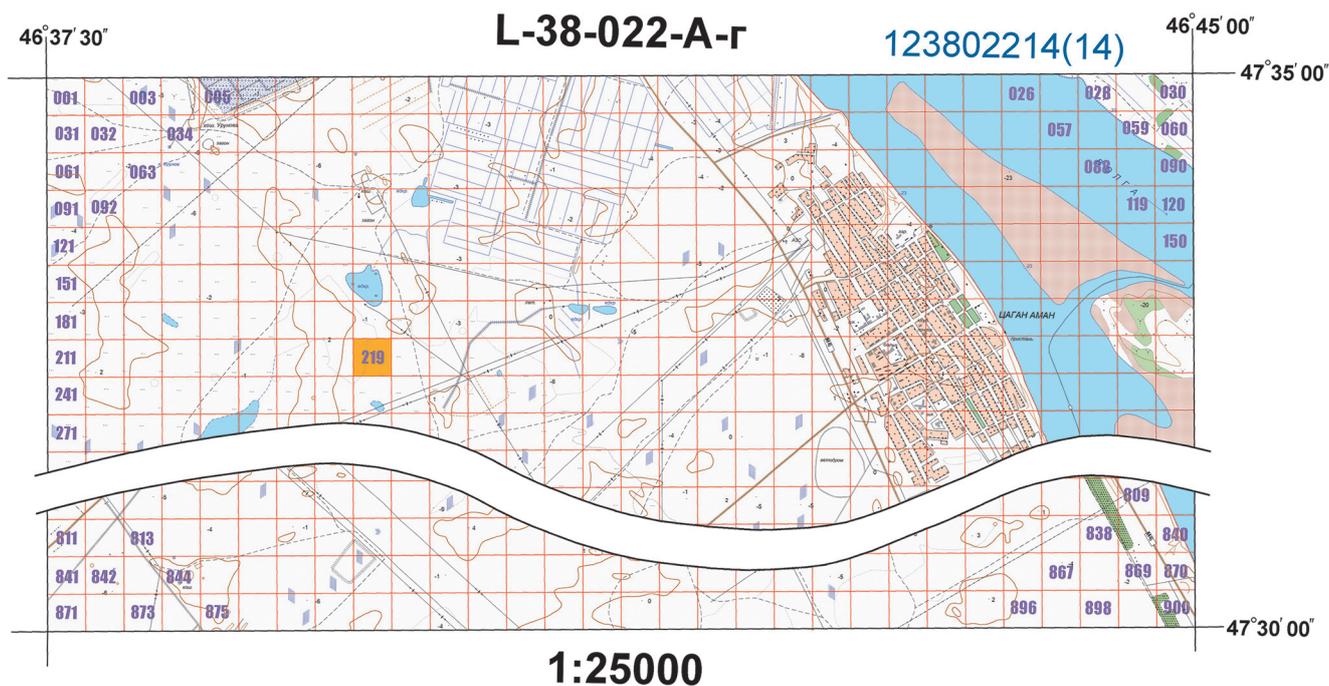


Рис. 2. Фрагмент карты одного из секторов Прикаспийского Северо-Западного степного очага чумы (14), демонстрирующий расположение и нумерацию стандартных ТЭО

ствующего данному сектору, цифры в скобках – номер природного очага чумы, последние три цифры – номер ТЭО (рис. 2).

Координаты конкретного места сбора полевого материала должны быть вписаны во все сопровождающие этот материал документы (этикетки, протоколы, журналы, ведомости и т.д.), но для дальнейшего анализа следует использовать стандартный номер ТЭО, куда попадают эти координаты, и его геодезические рамки (для отображения на картах).

Важным преимуществом предлагаемого способа нумерации точек является возможность его реализации в ГИС. Для этого необходима соответствующая настройка программного обеспечения, позволяющая отображать регламентируемую сетку ТЭО при просмотре электронной карты сектора в крупном масштабе. Следует предусмотреть также автоматическое сохранение рамок и номеров точек обследования (определяются и визуализируются программными средствами по указанным координатам) на специально выделенном для этого слое, по которым имеются занесенные в базу данных сведения о полевого материала. Возможны и другие, расширенные настройки программы, облегчающие и ускоряющие работу операторов, а также улучшающие просмотр и анализ интерактивной карты специалистами противочумных учреждений.

Дальнейшее развитие системы упорядочивания ТЭО предполагает внесение информации о полевого материала и результатах его исследования в электронный паспорт природного очага чумы на ГИС-сервере непосредственно исполнителями мониторинга на своих рабочих местах. Для реализации этого этапа необходимы приобретение и настройка

соответствующего оборудования, настройка программного обеспечения, наличие надежного подключения к Интернету и обучение персонала (врачей и зоологов). При выполнении этих условий номера точек можно будет легко определять уже в процессе обследования при загрузке их координат на сервер. Определение номеров по координатам возможно также вручную на крупномасштабных цифровых топографических картах или их растровых копиях (тайлах), для чего требуется обладание специальными навыками.

Предлагаемый вариант систематизации и стандартизации ТЭО полностью исключает пространственное наложение соседних точек друг на друга (все они разделены незыблемыми формализованными рамками), позволяет четко выявить повторно обследуемые точки и кратность их обследования, обеспечивает легкий визуальный поиск необходимых участков для вызова информации из базы данных. Следует подчеркнуть, что в базе данных для каждого исследованного пула полевого материала необходимо размещать всю информацию, указанную в полевой этикетке и табличных формах Excel, направляемых в центр сбора информации по окончании обследовательского сезона: дата сбора, координаты и соответствующий номер точки, адрес, вид материала, результаты исследования и т.д. Кроме того, качество визуализации и возможности пространственного эпизоотологического анализа в системе стандартных ТЭО существенно повышаются при использовании в качестве основы цифровых топографических карт масштаба 1:25000. Эти же карты незаменимы при планировании и проведении эпизоотологического обследования энзоотических

территорий.

Стандартизация графического оформления результатов эпизоотологического мониторинга природных очагов чумы не нарушает правил формирования эпизоотических участков методом круговой экстраполяции [2, 3]. Для реализации этого метода в качестве центров экстраполяции следует использовать центры стандартных пронумерованных ТЭО, где выявлен возбудитель чумы. Остальные этапы пространственного эпизоотологического анализа остаются прежними.

Детальный формально-территориальный подход к обследованию обладает еще одной важной особенностью – возможностью объединять информацию по естественно сгруппированным ТЭО, если возникает такая необходимость. Например, формировать сводные ячейки из двух, четырех (2×2) или девяти (3×3) точек. Подобное объединение может оказаться полезным для выявления эпизоотических ядер.

Система формально-территориальной дифференциации территории на секторы и ТЭО пригодна также для использования учреждениями санитарно-эпидемиологического профиля при проведении ими эпизоотологического обследования любых природных очагов опасных инфекционных болезней. Положительное решение этого вопроса обеспечивается опытом работы, накопленным противочумными учреждениями, и прогрессивным развитием географических информационных технологий.

Таким образом, усовершенствованный порядок нумерации точек эпизоотологического обследования и их стандартизация способны существенно упростить процесс эколого-эпизоотологического и эпидемиологического ГИС-картографирования и улучшить визуализацию результатов мониторинга, а также расширить возможности и качество пространственного и ретроспективного анализа эпизоотической активности природных очагов чумы и других инфекций.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузнецов А.А., Поршаков А.М., Матросов А.Н., Куклев Е.В., Коротков В.Б., Мезенцев В.М., Попов Н.В., Топорков В.П., Топорков А.В., Кутырев В.В. Перспективы ГИС-паспортизации природных очагов чумы Российской Федерации. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 1(111):48–53.
2. 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.
3. 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.

#### References

1. Kuznetsov A.A., Porshakov A.M., Matrosov A.N., Kuklev E.V., Korotkov V.B., Mezentsev V.M., Popov N.V., Toporkov V.P., Toporkov A.V., Kutyrev V.V. [Prospects of GIS-passportization of natural plague foci in the territory of the Russian Federation]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 1(111):48–53.
2. 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.
3. 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.

#### Authors:

*Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Porshakov A.M., Lopatin A.A.* Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapl@microbe.ru.  
*Golosovsky S.M.* Astrakhan Plague Control Station. 3, Kubanskaya St., Astrakhan, 414000, Russian Federation. E-mail: antichum@astranet.ru.

#### Об авторах:

*Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Поршаков А.М., Лопатин А.А.* Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapl@microbe.ru.  
*Голосовский С.М.* Астраханская противочумная станция. Российская Федерация, 414000, Астрахань, ул. Кубанская, 3. E-mail: antichum@astranet.ru.

Поступила 07.12.16.

Н.Д.Омельченко, И.А.Иванова, И.А.Беспалова, А.В.Филиппенко

**ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ И СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ***ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация*

Первостепенной задачей вакцинопрофилактики будущего является разработка дифференцированных подходов к вакцинации с целью создания эффективного иммунитета у каждого прививаемого человека с использованием разных доз и схем вакцинации, а также адъювантов и дополнительных средств иммуномодуляции иммунного ответа. Многочисленные исследования посвящены поиску иммуноадъювантов, способных стимулировать иммунный ответ на вакцинацию даже у лиц с ослабленной иммунной активностью и проявлениями иммунодефицита. В обзоре приведены примеры сочетанного применения в отечественной практической медицине различных групп иммунобиологических препаратов – вакцин, иммуномодуляторов, цитокинов, а также перспективных препаратов, прошедших доклиническую проверку качества и рекомендованных для проведения клинических испытаний. Освещаются основные задачи, дополнительные подходы и направления, используемые в экспериментальной иммунологии, касающиеся совершенствования вакцинопрофилактики инфекционных болезней самой разной этиологии, посредством препаратов, способных стимулировать формирование поствакцинального иммунитета. Особое внимание уделено возможности использования иммуномодуляторов при специфической профилактике особо опасных инфекций.

*Ключевые слова:* вакцина, иммуномодулятор, иммунодефицит, инфекционные болезни, профилактика, цитокины.

*Корреспондирующий автор:* Омельченко Наталья Дмитриевна, e-mail: plague@aaanet.ru.

N.D.Omel'chenko, I.A.Ivanova, I.A.Bespalova, A.V.Filippenko

**Immunomodulators and Specific Prophylaxis of Infectious Diseases***Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation*

The high-priority task of prospective preventive vaccination consists in the development of differentiated approaches to vaccination with the aim of generation of effective immunity in each immunized person, using various dosages and vaccination regimes as well as adjuvants and accessory means of immune response modulation. At present, multiple investigations are dedicated to the search of immunoadjuvants capable of inducing immune response even in individuals with compromised immune activity and immunodeficiency signs. The review exemplifies combined usage of different groups of immunobiological agents in domestic applied medicine – vaccines, immunomodulators, cytokines, as well as prospective preparations, prequalified and recommended for clinical trials. The review covers major objectives, additional approaches and focus areas in experimental immunology related to the advancement of vaccinal prevention of infectious diseases of different etiology applying preparations capable of stimulating the induction of post-vaccinal immunity. Proper attention is given to the possibility of immunomodulator usage in the specific prophylaxis of particularly dangerous infections.

*Key words:* vaccine, immunomodulator, immunodeficiency, infectious diseases, prophylaxis, cytokines.

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

*Corresponding author:* Natal'ya D. Omel'chenko, e-mail: plague@aaanet.ru.

*Citation:* Omel'chenko N.D., Ivanova I.A., Bespalova I.A., Filippenko A.V. Immunomodulators and Specific Prophylaxis of Infectious Diseases. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:21–26. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-21-26

Массовая вакцинопрофилактика некоторых опасных инфекционных болезней в силу ряда причин не проводится: вакцинируются, как правило, группы людей, которые подвержены риску инфицирования в силу своей специальности или проживания в тех регионах, где могут встречаться указанные инфекции. Существующие вакцины способны вызывать как активацию, так и супрессию отдельных иммунных функций, а вакцинация лиц с нарушениями иммунного статуса может усугубить эти нарушения и быть неэффективной [35]. Кроме того, существующий порядок вакцинации с усредненными дозами вакцин и жесткими схемами их введения уравнивают условия иммунизации граждан и рассчитаны на среднего по иммунологической активности челове-

ка. Особенности иммунного статуса отдельных лиц и наличие у людей многочисленных вариантов иммунного ответа на одну и ту же вакцину при этом не учитываются. Особую группу составляют лица с очень высокой иммунологической реакцией на конкретную вакцину, такие люди не нуждаются в повторном введении того же антигена, так как гипериммунизация имеет свои отрицательные стороны [25]. Опыт мировой практики по иммунопрофилактике показывает, что среди вакцинированных всегда имеется группа лиц, не отвечающих на вакцину или слабо реагирующих на нее. Эти люди во многих случаях сформируют категорию бактерионосителей (вирусоносителей), поддерживая тем самым инфекционную заболеваемость. Есть данные, что с клини-

ческой точки зрения вакцинация лиц с различными нарушениями в состоянии здоровья безопасна, однако напряженность иммунного ответа у них ниже, чем у практически здоровых лиц. Эта категория лиц в первую очередь нуждается в особом подходе к вакцинации против инфекционных болезней [5].

В связи с вышесказанным становится очевидным, что на современном этапе стратегия борьбы с инфекционными болезнями любой этиологии должна включать разработку схем комплексного применения различных групп иммунобиологических препаратов – вакцин, иммуномодуляторов (ИМ), цитокинов и других иммунореагентов, способных стимулировать формирование поствакцинального иммунитета [8].

Лекарственные средства, которые относят к современным ИМ, обладают способностью в терапевтических дозах восстанавливать эффективную иммунную защиту. Они имеют высокий профиль безопасности, могут применяться как у взрослых, так и у детей, при разных сопутствующих заболеваниях в любой стадии и при любой степени тяжести, не взаимодействуют с другими лекарственными средствами (антибактериальными, противовирусными, противогрибковыми, сердечно-сосудистыми и др.), могут использоваться у больных с аллергическими заболеваниями [15, 19, 37].

ИМ объединяет основное свойство – все они имеют иммунологические точки приложения, т.е. определенные мишени среди клеток иммунной системы. С одной стороны, они выполняют функцию иммуoadъювантов – повышают иммуногенность вакцин, индуцируя быстрый антиген-специфический ответ, направляя его развитие по гуморальному или клеточному типу в зависимости от свойств патогена; с другой – предотвращают развитие вторичных иммунодефицитных состояний у организма [24, 25].

Поэтому экспериментальные исследования настоящего времени направлены на разработку комбинированных вакцин, создающих защиту сразу против нескольких возбудителей инфекционных болезней, в том числе особо опасных инфекций, а также поиску иммуoadъювантов, способных стимулировать иммунный ответ на такие вакцины даже у лиц с ослабленной иммунной активностью и проявлениями иммунодефицита. Коррекция иммунного ответа на вакцины посредством ИМ – это относительно новый и бурно развивающийся раздел иммунологии.

В настоящее время в практической медицине существует немного примеров такого симбиоза: перспективный отечественный ИМ последнего поколения – полиоксидоний (азоксимера бромид), включенный в состав поливакцины для терапии и профилактики хронической герпетической инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 групп (ВПГ1 и ВПГ2). Другая поливакцина против ВПГ1 и ВПГ2 под названием «Витагерпавак», содержащая иммуномодулятор гиалуронат натрия, разрешена к применению в Российской Федерации с 2003 г.

[7]. Для профилактики гриппа, в том числе у детей с 6-месячного возраста, уже используется субъединичная гриппозная вакцина «Гриппол» с полиоксидонием. Иммуномодулятор обеспечивает увеличение иммуногенности вакцины, стабилизирует антигены вирусов гриппа, что существенно снижает прививочную дозу гемагглютининов и нейраминидаз, и повышает устойчивость организма к другим инфекциям за счет неспецифической иммуностимуляции функциональной активности клеток моноцитарно-макрофагальной системы [30].

Продолжаются эксперименты, направленные на снижение антигенной нагрузки комбинированной дивакцины против вирусного гепатита А и В «ГЕПОЛ А+В» путем введения в ее состав полиоксидония. Сочетанное использование иммуномодулятора и вакцины позволило сократить вдвое дозу антигенов, число инъекций, а также количество гидроксида алюминия и формальдегида, вводимых в организм. Вакцина уже успешно прошла доклиническую проверку качества и рекомендована для проведения клинических испытаний [9].

Готовится к испытаниям на людях и другая вакцина с полиоксидонием – против цитомегаловирусов человека. Исследования, направленные на повышение лечебной и профилактической эффективности вакцины, показали, что иммуномодулятор значительно повышал терапевтические свойства вакцины и уменьшал количество инъекций вакцинного штамма [7].

При сочетанном применении иммунопрепарата «Имиксимод 5 % крем» и квадριвалентной рекомбинантной вакцины против вируса папилломы человека (ВПЧ) в 94,4 % случаев наблюдалась длительная клиническая ремиссия хронической ВПЧ-инфекции [32].

Эксперименты по созданию инактивированной противохламидийной вакцины, в состав которой входит полиоксидоний, продемонстрировали, что одновременное введение иммуномодулятора и инактивированного формалином хламидийного антигена приводило к усилению иммуногенной активности последнего. Вакцина оказалась эффективна, так как вызывала выработку специфических антител и стимуляцию Т-клеточного звена иммунитета [33].

В отношении арбовирусных инфекций (восточный энцефаломиелит лошадей и вирус клещевого энцефалита (ВКЭ)) экспериментально доказана эффективность сочетанного действия специфических вакцин и иммуномодуляторов – ридостина (индуктор интерферонов рибонуклеат натрия), полирибоната, глюкозо-мурамилпептида и пептидогликана-160. Ридостин рекомендован для клинических испытаний на людях в очагах ВКЭ [6]. Иммуногенную активность вакцины против ВКЭ в экспериментах на мышах стимулировали монопрепараты рекомбинантных IL-1 $\beta$  и TNF $\alpha$ , комплекс рекомбинантных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-2, TNF $\alpha$ ), гибридный белок неотим (Г $\alpha$ -TNF-Г $\alpha$ ), а также иммуномодулятор имунофан, который усиливал иммуногенность вакцины в 1,3–1,5

раза. Исследуемые препараты цитокинов также повышали протективный эффект вакцины: мыши линии Balb/c более резистентны к заражению вирулентным штаммом возбудителя по сравнению с животными, иммунизированными одной вакциной [3].

В настоящее время экспериментально доказано адьювантное действие препаратов на основе рекомбинантных белков цитокинов – «Беталейкин (рчИЛ-1 $\beta$ )», «Ронколейкин (рчИЛ-2)», «Альнорин (рчФНО $\alpha$ )», «Аффинолейкин», а также препарата «Имунофан» на вакцины против гепатитов А и В, бешенства, клещевого энцефалита у животных. Интересно, что наиболее демонстративно действие этих иммуноадьювантов проявлялось на экспериментальной модели животных с иммуносупрессией (ответ на специфические антигены увеличивался в 1,5–7,3 раза), а также при использовании малых доз вакцин, на которые, в случае их использования без цитокинов, развивался слабый иммунный ответ [4].

При вакцинации против вирусного гепатита В вакциной «Энджерикс В» хорошо зарекомендовал себя иммуностимулятор рекомбинантный ИЛ-1 $\beta$ . Плейотропный тип биологического действия этого цитокина позволил повысить эффективность вакцинации у больных с вторичными иммунодефицитами и хроническим инфекционным синдромом: увеличивалось содержание зрелых Т-лимфоцитов в крови, соотношение CD4/CD8, нивелировалось отрицательное влияние вакцины на функциональную активность нейтрофилов. Кроме того, перспективное адьювантное действие этого цитокина выявлено при мукозальной вакцинации против различных типов патогенов: интраназальное введение ИЛ-1 совместно с растворимыми белковыми антигенами эффективно индуцировало специфические IgG антитела в сыворотке крови, IgA в секретах слизистых, а также антигенспецифический Т-клеточный ответ [34]. Цитокиновые препараты «Бестим» и «Беталейкин» также увеличивали эффективность вакцины «Энджерикс В» у особой группы пациентов с вторичными иммунодефицитами и хроническим инфекционным синдромом. Экспериментально подтверждено наличие стойкого поствакцинального иммунитета до 120 месяцев (у 83 % привитых лиц в эти сроки определяли антитела к HBs-антигену в протективной концентрации) [1, 38].

Рекомбинантные цитокины человека ИЛ-1 $\beta$  и TNF $\alpha$  в виде монопрепаратов, а также в виде комплекса цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, TNF $\alpha$ ) повышали протективное действие культуральной антирабической вакцины [2].

Учеными из НИИВС им. Мечникова РАМН (Москва) совместно с врачами инфекционистами (Ярославль) показано, что препарат «Аффинолейкин», введенный с вакциной АКДС, восстанавливает нарушенную иммунокомпетентность и иммунологическую память у детей из группы R75 (ВИЧ-негативные дети от ВИЧ-инфицированных матерей, слабо реагирующие на дифтерийный анатоксин и

коклюшный компонент вакцины). Эти результаты вносят вклад в решение одной из реальных проблем календарной вакцинации: ВИЧ-инфекция продолжает распространяться среди женщин репродуктивного возраста и на фоне их антиретровирусной химиопрофилактики по прогнозам к 2020 г. в России количество детей из группы R75, подлежащих вакцинации по национальному календарю, возрастет до 4 млн [23].

Включение препарата «Виферон» (на основе человеческого генно-инженерного ИФН- $\alpha_2\beta$ ) в комплекс противогриппозной вакцинации способствовало раннему формированию специфического иммунитета и снижало частоту и тяжесть заболевания в эпидемический сезон [37].

При оценке влияния препарата тимогена на эффективность и безопасность вакцинации детей против кори и паротита сделан вывод о том, что назначение этого иммуномодулятора способствует более интенсивному синтезу специфических антител в ранние сроки [36].

При ревакцинации против кори, гепатита В, краснухи, паротита детей, относящихся к группе длительно и часто болеющих, имеются положительные данные об использовании иммуномодуляторов имунофана, миелопида и полиоксидония [21]. Аналогичные результаты получены при использовании имунофана [22], миелопида и полиоксидония [21] при вакцинации данной группы детей против бактериальных инфекций, в частности, против дифтерии. И в том, и в другом случае отмечено увеличение антителообразования, а при сочетанном применении миелопида и полиоксидония наблюдалась активация клеточного звена иммунитета.

Анализ литературы свидетельствует также об эффективности применения иммуномодуляторов при специфической профилактике особо опасных инфекций.

Так, экспериментально доказано повышение иммуногенности живых сибирезвенных вакцин путем введения в схему вакцинации сальмозана [29]. О.И. Коготкова и соавт. показали, что применение липопида при вакцинации живой вакциной СТИ против сибирской язвы в большей степени стимулирует клеточное звено иммунитета и повышает выживаемость мышей после заражения, по сравнению с иммунизированными животными [16].

О.Б. Демьянова и соавт. обнаружили увеличение протективности антигенов возбудителя мелиоидоза посредством рекомбинантных цитокинов [10] и доказали, что эти препараты, воздействуя преимущественно на механизмы клеточного иммунитета, могут быть использованы для повышения иммуногенности и протективности антигенов возбудителя мелиоидоза. При этом для стимуляции первой фазы иммунного ответа целесообразно применение ИФН- $\gamma$ , инициирующего неспецифические клеточные факторы защиты, а для усиления вторичного иммунного ответа предпочтительно использовать ИЛ-2, усиливающий

механизмы специфического клеточного иммунитета [10]. Кроме того, иммуногенные свойства мелиоидозных препаратов повышали другие иммуномодуляторы – «Бестим» и «Имунофан», которые увеличивали выживаемость экспериментальных животных после их заражения высоковирулентными штаммами возбудителя мелиоидоза. Исследователями сделан вывод о целесообразности включения бестима в комплексную схему иммунизации против мелиоидоза.

Саратовские исследователи, изучая влияние иммуномодуляторов на реактивность клеток иммунной системы при моделировании противотуляремийного вакцинного процесса, установили положительное влияние полиоксидония на персистенцию вакцинного штамма в клетках макрофагально-фагоцитарной системы мышей. На фоне более длительной функциональной активации спленоцитов и пониженной интенсивности повреждения макрофагов в селезенке и брюшной полости существенно повышались титры специфических противотуляремийных антител [17]. Зарубежные ученые эффективно использовали ИЛ-12 для совершенствования специфической профилактики туляремии [39]. Обнаружено, что интраназальное введение экзогенного ИЛ-12 во время вакцинации обеспечивало выживание 90–100 % мышей после заражения летальной дозой возбудителя туляремии.

Применение ИЛ-12 в качестве адъюванта оказалось перспективным и при легочной чуме у иммунизированных мышей [40]. При изучении способности полиоксидония стимулировать выработку специфического иммунитета к возбудителю чумы, выявлено значительное усиление гуморального и клеточного ответа, что позволило снизить антигенную нагрузку на макроорганизм, что свидетельствует о возможности использования этого иммуномодулятора для создания высокоэффективных субъединичных противочумных вакцин [20]. В опытах на взрослых кроликах и морских свинках доказана адъювантная способность препаратов «Беталейкин» (рекомбинантный ИЛ-1 $\beta$ ) и «Полиоксидоний» в отношении иммуногенной и протективной активности живой противочумной вакцины [14, 31].

Благодаря появлению нового класса веществ – тиопоэтинов, являющихся метаболическими иммунокорректорами, стало возможным создание новых комплексных средств профилактики и лечения тяжелых инфекционных болезней и совершенствование имеющихся схем. В экспериментах уже получены свидетельства их системного цитопротекторного действия, а также способности повышать специфический иммунный ответ при вакцинации живой чумной вакциной и увеличивать протективность туляремийного С-комплекса в отношении возбудителей мелиоидоза и туляремии [11].

При изучении иммуногенных свойств антигенов холерного вибриона, кандидатов в новую отечественную противохолерную вакцину, сотрудниками Российского научно-исследовательского противочумного

института «Микроб», Иркутского научно-исследовательского противочумного института и Института иммунологии показано увеличение иммунологической эффективности деацелированных ЛПС-сероваров Инаба или Огава, а также В-субъединицы холерного токсина посредством их конъюгации с полимерным иммуноадъювантным носителем – полиоксидонием. Конъюгаты в большей степени стимулировали антибактериальный и антитоксический гуморальный (антительный) ответ против антигенов по сравнению с используемыми в то время противохолерными вакцинами. Кроме этого они снижали аллергические и другие побочные реакции на вакцинацию [27, 28].

О возможности использования ИМ при экспериментальной холере свидетельствуют результаты, полученные в лаборатории иммунологии ООИ Ростовского научно-исследовательского противочумного института. При изучении влияния имунофана на формирование поствакцинального противохолерного иммунитета, а также на течение и исход инфекционного процесса у экспериментальных животных было выявлено, что его применение предотвращает развитие транзитного поствакцинального апоптотического иммунодефицита и снижает степень выраженности инфекционного процесса, что доказывает перспективность использования препарата для совершенствования профилактики холеры [12, 13].

Таким образом, все вышеизложенное свидетельствует об эффективности сочетанного применения иммуномодуляторов со средствами специфической профилактики инфекционных болезней самой разной этиологии.

В настоящее время появляются дополнительные подходы к совершенствованию вакцинопрофилактики, связанные со стимуляцией системы врожденного иммунитета посредством иммуномодуляторов через активацию Толл-подобных рецепторов, локализуемых на различных иммунокомпетентных клетках. Это касается субъединичных и генетических ДНК-вакцин и векторных вакцин, с которыми связывают будущее вакцинологии. Обнаружено, что после связывания с распознающими эволюционно консервативными патоген-ассоциированными молекулярными структурами, Толл-подобные рецепторы передают внутриклеточный сигнал на активацию синтеза специфического сочетания цитокинов и костимулирующих факторов, что, в итоге, определяет тип и эффективность развивающегося приобретенного иммунного ответа. Раскрытие этого сложного механизма открывает путь для создания средств быстрой неспецифической защиты против многих патогенов [18].

Первостепенной задачей вакцинопрофилактики будущего является разработка дифференцированных подходов к вакцинации с целью создания эффективного иммунитета у каждого прививаемого человека с использованием разных доз и схем вакцинации, а также адъювантов и дополнительных средств имму-

номодуляции иммунного ответа [26].

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абрамова Н.Н., Симбирцев А.С., Долгушин И.И. Влияние бестима и беталейкина на иммунный статус больных с вторичными иммунодефицитными состояниями при вакцинации против вирусного гепатита В. *Цитокины и воспаление*. 2004; 3(4):29–35.
- Авдеева Ж.И., Акользина С.Е., Алпатова Н.А., Никитина Т.Н., Медунитцын Н.В. Показатели клеточного иммунного ответа при иммунизации мышей антирабической вакциной на фоне цитокинов. *Цитокины и воспаление*. 2008; 7(4):15–20.
- Авдеева Ж.И., Акользина С.Е., Алпатова Н.А., Никитина Т.Н., Ращепкина М.Н. Влияние цитокинов на иммуногенные свойства вакцины против клещевого энцефалита. *Цитокины и воспаление*. 2009; 8(2):25–9.
- Алпатова Н.А., Никитина Т.Н., Авдеева Ж.И. Иммуноадаптивное действие препаратов цитокинового ряда. *Биопрепараты*. 2010; 39(3):26–7.
- Афиногенова В.П., Лукачев И.В., Костинов М.П. Иммунотерапия: механизм действия и клиническое применение иммунокорректирующих препаратов. *Лечащий врач*. 2010; (4):1–5.
- Баринский И.Ф., Алимбарова Л.М., Лазаренко А.А., Давыдова А.А. Иммуномодуляторы и специфические инактивированные вакцины в экстренной профилактике экспериментальных арбовирусных инфекций. *Вопр. вирусол.* 2013; 58(4):35.
- Баринский И.Ф., Алимбарова Л.М., Лазаренко А.А., Махмудов Ф.Р., Сергеев О.В. Вакцины как средство специфической иммунокоррекции при герпетических инфекциях. *Вопр. вирусол.* 2014; 59(1):5–11.
- Воробьев А.А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. М.: МИА; 2004. 690 с.
- Горбунов М.А., Ельшина Г.А., Игнатъев Г.М., Шалунова Н.В., Карпович Л.Г., Бочарова Н.Г., Соловьёва М.В., Ермолаева Т.Н., Мусина Е.Е., Куслий А.Г., Мунтянова М.А., Андреев Ю.Л., Медунитцын Н.В. Характеристика комбинированной вакцины против гепатитов А и В с полиоксидием (ГепоЛ А+В) по результатам клинических испытаний. *Биопрепараты*. 2010; 39(3):14–5.
- Демьянова О.Б., Жукова С.И., Занкович А.А., Храпова Н.П., Ротов К.А., Синтюрина Н.Н., Снатенков Е.А. Использование цитокинов и синтетических пептидов для повышения иммуногенности мелиоидозных антигенов. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 3:83–5.
- Жемчугов В.И., Жукова С.И., Дятлов И.А., Волох О.А., Кутырев В.В., Авророва И.А., Дрефс Н.М. Использование метаболических иммунокорректоров для стимуляции иммунитета при некоторых особо опасных инфекциях. *Вестник ВолГМУ*. 2004; 12:29–31.
- Иванова И.А., Телесманич Н.Р., Кругликов В.Д., Ломов Ю.М. Современное состояние вопроса и перспективы развития неспецифической профилактики холеры. *Здоровье населения и среда обитания*. 2012; 4:15–7.
- Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Телесманич Н.Р., Васильева Г.И., Дорошенко Е.П., Беспалова И.А., Киселева А.К., Филлипенко А.В., Судына Л.В., Мишанькин Б.Н. Изучение роли апоптоза лимфоцитов, индуцированного антигенами *Vibrio cholerae*, в формировании вторичного иммунодефицита и возможности его коррекции. *Мед. вестник Юга России*. 2013; 1:24–7.
- 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.
- Караулов А.В. Иммуномодуляторы в профилактике и лечении респираторных инфекций у детей. *Фарматека*. 2012; 1:10–3.
- Ефременко В.И., Ерёменко Е.И., Буравцева Н.П., Коготкова О.И., Аксёнова Л.Ю. Сочетанное применение в эксперименте сибирезвеновой вакцины СТИ-ПР с липоидом. *Иммунология*. 2004; 2:109–11.
- Кравцов А.Л., Ключева С.Н., Бугоркова С.А. Влияние иммуномодуляторов на реактивность клеток иммунной системы при моделировании противотуберкулезного вакцинного процесса. *Эпидемиол. и вакцинопрофилактик.* 2016; 3(88):94–100.
- Логунов Д.Ю., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. Молекулярно-генетические технологии защиты от патогенов. *Ремедиум*. 2008; 2:30–3.
- Лусс Л.В. Место иммуномодуляторов в педиатрической практике. *Педиатрия. Прил. к журн. Consilium medicum*. 2010; 3:72–6.
- Ляпина А.М., Ляпина А.М., Полянина Т.И., Ульянова О.В., Елисеев Ю.Ю., Телепнев М.В., Мотин В.Л., Федорова В.А. Применение полиоксидония для получения специфических антител к бактериальным антигенам. *Совр. пробл. науки и образования*. 2012; 2. URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=5729> (дата обращения: 27.09.2016).
- Маркова Т.П., Харьянова М.Е. Форсификация поствакцинального иммунитета у длительно и часто болеющих детей. *Аллергия, астма и клин. иммунол.* 2001; 1:21–5.
- Маркова Т.П., Чувиров Д.Г. Клинико-иммунологическое обследование и отбор пациентов с дисфункциями иммунной системы для проведения форсифицированной вакцинации, определения уровня специфических антител. *Аллергия, астма и клин. иммунол.* 2003; 9:84–6.
- Мац А.Н., Кузьмина М.Н., Свиридов В.В., Николаева А.М. Нарушения иммунологической памяти на АКДС-вакцинацию вследствие перинатального ВИЧ-контакта и антиретровирусной химиопрофилактики. Коррекция аффинолейкином. *Биопрепараты*. 2010; 39(3):23–4.
- Медунитцын Н.В., Покровский В.И. Основы иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекционных болезней. М.: Гэотар-Медиа; 2005. 525 с.
- Медунитцын Н.В. Коррекция развития иммунитета при вакцинации. *Биопрепараты*. 2010; 39(3):9–10.
- Медунитцын Н.В., Яковлева Т.В. Совершенствование подходов к вакцинопрофилактике. *Эпидемиол. и вакцинопрофилактик.* 2012; 3(64):70–8.
- Петров Р.В., Хаитов Р.М., Некрасов А.В., Берестецкая Т.З., Голубинский Е.П., Урбанович Л.Я., Марков Е.Ю., Медведев С.А. Способ получения вакцины против холеры. Патент РФ № 2021817. 1991 г., опубл. 27.09.2000.
- Петров Р.В., Хаитов Р.М., Некрасов А.В., Берестецкая Т.З., Наумов А.В., Горькова А.В., Джапаридзе М.Н., Шуковская Т.Н. Способ получения вакцины против холеры. Патент РФ № 2021816. 1991 г., опубл. 30.10.1994.
- Пименов Е.В., Кожухов В.В., Строчков Ю.И. Создание вакцин против сибирской язвы. *Природа*. 2000; 10:12–9.
- Пинегин Б.В., Латышева Т.В. Иммунодефицитные состояния: возможности применения иммуномодуляторов. *Лечащий врач*. 2001; 3:101–6.
- Пономарева Т.С., Дерябин П.Н., Каральник Б.В., Денисова Т.Г., Тугамбаев Т.И., Атшабар Б.Б., Закарян С.Б., Мельникова Н.Н. Влияние беталейкина на показатели антиген-специфического иммунного ответа в модельных опытах иммунизации животных живой противочумной вакциной. *Цитокины и воспаление*. 2014; 13(1):57–62.
- Протасов А.Д., Тезиков Ю.В., Костинов М.П., Липатов И.С., Магаршак О.О., Рыжов А.А. Сочетанное применение вакцинации и иммунопрепарата в достижении длительной клинической ремиссии хронической ВПЧ-инфекции, проявляющейся остроконечными кондиломами аногенитальной области. *Эпидемиол. и вакцинопрофилактик.* 2016; 3(88):60–5.
- Рубаник Л.В. Механизмы противохламидийного иммунитета и конструирование противохламидийной вакцины. *Мед. новости*. 2006; 11:29–35.
- Симбирцев А.С., Петров А.В., Пигарева Н.В., Николаев А.Т. Новые возможности применения рекомбинантных цитокинов в качестве адъювантов при вакцинации. *Биопрепараты*. 2010; 39(3):22–3.
- Симбирцев А.С., Петров А.В., Пигарева Н.В., Николаев А.Т. Новые возможности применения рекомбинантных цитокинов в качестве адъювантов при вакцинации. *Биопрепараты*. 2011; 41(1):16–20.
- Харит С.М., Началова Е.П., Петленко С.В. Применение тимогена для повышения эффективности иммунизации против кори и паротита у детей, проживающих в экологически неблагоприятных регионах. *Эпидемиол. и вакцинопрофилактик.* 2005; 2:15–21.
- Чеботарева Т.А., Каряева С.К., Малиновская В.В., Мазанкова В.В., Калоева З.Д. Современные возможности повышения эффективности вакцинации против гриппа у детей высокого риска заболеваемости. *Иммунология*. 2011; 3:146–50.
- Шахгильдян И.В., Хухлович П.А., Ершова О.Н., Хасанова В.А., Сергеева Н.А., Кузина Л.Е., Брагинский Д.М., Лыткина И.Н., Шулакова Н.И., Романенко В.В., Патлусова В.В., Сармометов Е.В., Исаева Н.В., Попова И.В., Каира А.Н., Гунина О.М., Усачева Л.П. Результаты изучения эффективности массовой вакцинопрофилактики гепатита В в отдельных регионах Российской Федерации. *Биопрепараты*. 2010; 39(3):29–30.
- Baron S.D., Singh R., Metzger D.W. Inactivated *Francisella tularensis* live vaccine strain protects against respiratory tularemia by intranasal vaccination in an immunoglobulin A-dependent fashion. *Infect. Immun.* 2007; 75(5):2152–62. DOI: 10.1128/IAI.01606-06.
- Kumar D., Kirimanjeswara G., Metzger D.W. Intranasal administration of an inactivated *Yersinia pestis* vaccine with interleukin-12 generates protective immunity against pneumonic plague.

*Clin. Vaccine Immunol.* 2011; 18(11):1925–35. DOI: 10.1128/ CVI.05117-11.

**References**

1. Abramova N.N., Simbirtsev A.S., Dolgushin I.I. [Effect of bestim and betaleykin on the immune status of patients with secondary immune-deficient condition in case of vaccination against viral hepatitis B]. *Tsitokiny i Vospalenie.* 2004; 3(4):29–35.
2. Avdeeva Zh.I., Akol'zina S.E., Alpatova N.A., Nikitina T.N., Medunitsyn N.V. [Indices of cell immune response in case of immunization of mice with anti-rabies vaccine against the background of cytokines]. *Tsitokiny i Vospalenie.* 2008; 7(4):15–20.
3. Avdeeva Zh.I., Akol'zina S.E., Alpatova N.A., Nikitina T.N., Rashchepkina M.N. [Effect of cytokines on the immune properties of vaccine against tick-borne encephalitis]. *Tsitokiny i Vospalenie.* 2009; 8(2):25–9.
4. Alpatova N.A., Nikitina T.N., Avdeeva Zh.I. [Immune-adjuvant effect of cytokine-series preparations]. *Biopreparaty.* 2010; 39(3):26–7.
5. Afinogenova V.P., Lukachev I.V., Kostinov M.P. [Immune-therapy: mechanism of action and clinical application of immune-correctional preparations]. *Lechashchy vrach.* 2010; 4(4):1–5.
6. Barinsky I.F., Alimbarova L.M., Lazarenko A.A., Davydova A.A. [Immune-modulators and specific inactivated vaccines in emergency prophylaxis of experimental arboviral infections]. *Vopr. Virusol.* 2013; 58(4):35.
7. Barinsky I.F., Alimbarova L.M., Lazarenko A.A., Makhmudov F.R., Sergeev O.V. [Vaccines as a means of specific immune-correction in case of herpetic infections]. *Vopr. Virusol.* 2014; 59(1):5–11.
8. Vorob'ev A.A. [Medical Microbiology, Virology, and Immunology]. M.: "MIA", 2004. 690 p.
9. Gorbunov M.A., El'shina G.A., Ignati'ev G.M., Shalunova N.V., Karpovich L.G., Bocharova N.G., Solov'eva M.V., Ermolaeva T.N., Musina E.E., Kusly A.G., Muntyanova M.A., Andreev Yu.L., Medunitsyn N.V. [Characteristics of the combined vaccine against Hepatitis A and B, containing polyoxonium (Hepol A+B), based on the results of clinical trials]. *Biopreparaty.* 2010; 39(3):14–5.
10. Dem'yanova O.B., Zhukova S.I., Zankovich A.A., Khrapova N.P., Rotov K.A., Sintyurina N.N., Snatnikov E.A. [Application of cytokines and synthetic peptides for increase in immunogenicity of melioidosis antigens]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 3:83–5.
11. Zhemchugov V.I., Zhukova S.I., Dyatlov I.A., Volokh O.A., Kutryev V.V., Avrorova I.A., Drefs N.M. [Application of metabolic immune-correctors for stimulation of immunity in case of certain particular dangerous infections]. *Bulletin of the Volgograd State Medical University.* 2004; 12:29–31.
12. Ivanova I.A., Telesmanich N.R., Kruglikov V.D., Lomov Yu.M. [Current state of the issue and prospects of development of non-specific cholera prophylaxis]. *Zdor. Naseleniya i Sreda Obitaniya.* 2012; 4:15–7.
13. Ivanova I.A., Omel'chenko N.D., Telesmanich N.R., Vasil'eva G.I., Doroshenko E.P., Beshalova I.A., Kiseleva A.K., Filippenko A.V., Sud'ina L.V., Mishan'kin B.N. [Studies of the role of lymphocyte apoptosis induced by *Vibrio cholerae* antigens in generation of secondary immunodeficiency and possibility of its correction]. *Med. Bul. Yuga Rossii.* 2013; 1:24–7.
14. 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. [Effect of immune-modulation on immunogenic and protective activity of live plague vaccine]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2014; 6:108–12.
15. Karaulov A.V. [Immune-modulators in prophylaxis and treatment of respiratory infections in children]. *Pharmateka.* 2012; 1:10–3.
16. Efremenko V.I., Eremanko E.I., Buravtseva N.P., Kogotkova O.I., Aksenova L.Yu. [Combined application of anthrax vaccine STI-PR with lipoid *in vitro*]. *Immunologiya.* 2004; 2:109–11.
17. Kravtsov A.L., Klyueva S.N., Bugorkova S.A. [Effect of immune-modulators on immune system cell reactivity in simulation of anti-tularemia vaccine process]. *Epidemiol. Vaksino prof.* 2016; 3(88):94–100.
18. Logunov D.yu., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. [Molecular-genetic technologies for the protection against pathogens]. *Remedium.* 2008; 2:30–3.
19. Luss L.V. [Status and position of immune-modulators in practical pediatrics]. *Pediatriya. Pril. Consilium medicum.* 2010; 3:72–6.
20. Lyapina A.M., Polyamina T.I., Ul'yanova O.V., Eliseev Yu.Yu., Telepnev M.V., Motin V.L., Fedorova V.A. [Application of polyoxonium for the obtainment of specific antibodies to bacterial antigens]. *Sovr. Probl. Nauki i Obrazov.* 2012; 2. (cited: 27 Sept 2016). Available from: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=5729>.
21. Markova T.P., Khar'yanova M.E. [Enhancement of post-vaccinal immunity in children with durable and frequent illnesses]. *Allergiya, Astma, Klinich. Immunol.* 2001; 1:21–5.
22. Markova T.P., Chuvirov D.G. [Clinical-immunological examination and selection of patients with immune system dysfunctions for forced vaccination and determination of specific antibody levels]. *Allergiya, Astma,*

- Klinich. Immunol.* 2003; 9:84–6.
23. Mats A.N., Kuz'mina M.N., Sviridov V.V., Nikolaeva A.M. [Defect of immunologic memory of diphtheria and tetanus toxoids and pertussis vaccination due to perinatal HIV-contact and anti-retroviral chemoprophylaxis. Affinolekylin correction]. *Biopreparaty.* 2010; 39(3):23–4.
24. Medunitsyn N.V., Pokrovsky V.I. [Fundamental principles of immune-prophylaxis and immune-therapy of infectious diseases]. M.: "Geotard-Media"; 2005. 525 p.
25. Medunitsyn N.V. [Correction of immunity development under vaccination]. *Biopreparaty.* 2010; 39(3):9–10.
26. Medunitsyn N.V., Yakovleva T.V. [Improvement of the approaches to preventive vaccination]. *Epidemiol. Vaksino prof.* 2012; 3(64):70–8.
27. Petrov R.V., Khaitov R.M., Nekrasov A.V., Berestetskaya T.Z., Naumov A.V., Gor'kova A.V., Dzhaparidze M.N., Shchukovskaya T.N. [Method for the production of vaccine against cholera]. RF Patent No 2021817. 1991. Published: September 27, 2000.
28. Petrov R.V., Khaitov R.M., Nekrasov A.V., Berestetskaya T.Z., Naumov A.V., Gor'kova A.V., Dzhaparidze M.N., Shchukovskaya T.N. [Method for the production of vaccine against cholera]. RF Patent No 2021816. 1991. Published: October 30, 1994.
29. Pimenov E.V., Kozhukhov V.V., Strochkov Yu.I. [Construction of vaccine against anthrax]. *Priroda.* 2000; 10:12–9.
30. Pinegin B.V., Latysheva T.V. [Immune-deficient conditions: possibilities of immune-modulators application]. *Lechashchy vrach.* 2001; 3:101–6.
31. Ponomareva T.S., Deryabin P.N., Karal'nik B.V., Denisova T.G., Tugambaev T.I., Atshabar B.B., Zakaryan S.B., Mel'nikova N.N. [Effect of betaleykin on the indices of antigen-specific immune response in model experiments deploying immunized with live anti-plague vaccine animals]. *Tsitokiny i Vospalenie.* 2014; 13(1):57–62.
32. Protasov A.D., Tezikov Yu.V., Kostinov M.P., Lipatov I.S., Magarshak O.O., Ryzhov A.A. [Combined application of vaccination and immune preparation for long-lasting clinical remission of chronic HPV infection manifested in condyloma acuminatum in anogenital area]. *Epidemiol. Vaksino prof.* 2016; 3(88):60–5.
33. Rubanik L.V. [Mechanisms of chlamydial immunity and construction of chlamydial vaccine]. *Med. Novosti.* 2006; 11:29–35.
34. Simbirtsev A.S., Petrov A.V., Pigareva N.V., Nikolaev A.T. [New applications of recombinant cytokines as adjuvants in vaccination]. *Biopreparaty.* 2010; 39(3):22–3.
35. Simbirtsev A.S., Petrov A.V., Pigareva N.V., Nikolaev A.T. [New applications of recombinant cytokines as adjuvants in vaccination]. *Biopreparaty.* 2011; 41(1):16–20.
36. Kharit S.M., Nachalova E.P., Petlenko S.V. [Utilization of timogen for the enhancement of efficacy of immunization against measles and parotitis in children residing in ecologically unfavorable regions]. *Epidemiol. Vaksino prof.* 2005; 2:15–21.
37. Chebotareva T.A., Karyeva S.K., Malinovskaya V.V., Mazankova V.V., Kaloeva Z.D. [State-of-the-art capabilities to enhance the effectiveness of vaccination against flu in the children under high risk of infection]. *Immunologiya.* 2011; 3:146–50.
38. Shakhil'dyan I.V., Khukhlovich P.A., Ershova O.N., Khasanova V.A., Sergeeva N.A., Kuzina L.E., Braginsky D.M., Lytkina I.N., Shulakova N.I., Romanenko V.V., Patlusova V.V., Sarmometov E.V., Isaeva N.V., Popova I.V., Kaira A.N., Gunina O.M., Usacheva L.P. [Results of efficacy evaluation of mass vaccine hepatitis B prophylaxis in separate regions of the Russian Federation]. *Biopreparaty.* 2010; 39(3):29–30.
39. Baron S.D., Singh R., Metzger D.W. Inactivated *Francisella tularensis* live vaccine strain protects against respiratory tularemia by intranasal vaccination in an immunoglobulin A-dependent fashion. *Infect. Immun.* 2007; 75(5):2152–62. DOI: 10.1128/IAI.01606-06.
40. Kumar D., Kirimanjeswara G., Metzger D.W. Intranasal administration of an inactivated *Yersinia pestis* vaccine with interleukin-12 generates protective immunity against pneumonic plague. *Clin. Vaccine Immunol.* 2011; 18(11):1925–35. DOI: 10.1128/ CVI.05117-11.

**Authors:**

Omel'chenko N.D., Ivanova I.A., Beshalova I.A., Filippenko A.V. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: [plague@aaanet.ru](mailto:plague@aaanet.ru).

**Об авторах:**

Омельченко Н.Д., Иванова И.А., Беспалова И.А., Филиппенко А.В. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: [plague@aaanet.ru](mailto:plague@aaanet.ru).

Поступила 28.04.17.

Г.Г.Онищенко<sup>1</sup>, А.Ю.Попова<sup>2,3</sup>, Е.Б.Ежлова<sup>2</sup>, Ю.В.Демина<sup>2,3</sup>, Н.Д.Пакскина<sup>2</sup>, М.Н.Писцов<sup>4</sup>, В.В.Рубцов<sup>4</sup>,  
А.В.Суровяткин<sup>4</sup>, А.А.Петров<sup>4</sup>, А.В.Казанцев<sup>4</sup>, А.М.Бережной<sup>4</sup>, А.Ю.Зверев<sup>4</sup>, А.В.Маноскин<sup>4</sup>,  
В.Т.Кротков<sup>4</sup>, Д.А.Кутаев<sup>4</sup>, В.А.Максимов<sup>4</sup>, С.Л.Кузнецов<sup>4</sup>, Е.Ю.Вахнов<sup>4</sup>, М.А.Тимофеев<sup>4</sup>,  
А.А.Мовсесянц<sup>5</sup>, С.В.Борисевич<sup>4</sup>

## ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ОБСТАНОВКА И ВОПРОСЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСА БЕШЕНСТВА СРЕДИ ЛЮДЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В ПЕРИОД 2002–2015 гг.

<sup>1</sup>Российская академия наук, Москва; <sup>2</sup>Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва; <sup>3</sup>ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», Москва; <sup>4</sup>Центр специальной лабораторной диагностики особо опасных и экзотических инфекционных заболеваний, Сергиев Посад; <sup>5</sup>ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», Москва, Российская Федерация

В статье представлены результаты изучения биопроб специалистами Центра специальной лабораторной диагностики особо опасных и экзотических инфекционных болезней за период с 2002 по 2015 год, поступивших от погибших людей, подозрительных на инфицирование вирусом бешенства. Освещены основные трудности при работе с поступившими пробами биологического материала от погибших людей и пути их преодоления. Обозначены острые проблемы по бешенству эпизоотологической и эпидемиологической направленности, требующие комплексного решения со стороны органов здравоохранения и ветеринарной службы Российской Федерации. Подведены итоги лабораторно-диагностической работы Центра специальной лабораторной диагностики особо опасных и экзотических инфекционных заболеваний. Показано, что применяемые методы выделения и идентификации возбудителя бешенства позволяют качественно и своевременно диагностировать данное заболевание.

*Ключевые слова:* бешенство, уличный вирус бешенства, лабораторная диагностика.

*Корреспондирующий автор:* Борисевич Сергей Владимирович, e-mail: 48cnii@mil.ru.

G.G.Onishchenko<sup>1</sup>, A.Yu.Popova<sup>2,3</sup>, E.B.Ezhlova<sup>2</sup>, Yu.V.Demina<sup>2,3</sup>, N.D.Pakskina<sup>2</sup>, M.N.Pistsov<sup>4</sup>, V.V.Rubtsov<sup>4</sup>,  
A.V.Surovyatkin<sup>4</sup>, A.A.Petrov<sup>4</sup>, A.V.Kazantsev<sup>4</sup>, A.M.Berezhnoy<sup>4</sup>, A.Yu.Zverev<sup>4</sup>, A.V.Manoshkin<sup>4</sup>, V.T.Krotkov<sup>4</sup>,  
D.A.Kutaev<sup>4</sup>, V.A.Maksimov<sup>4</sup>, S.L.Kuznetsov<sup>4</sup>, E.Yu.Vakhnov<sup>4</sup>, M.A.Timofeev<sup>4</sup>, A.A.Movsesyants<sup>5</sup>,  
S.V.Borisevich<sup>4</sup>

## Epidemiological Situation on and Problems of Identification of Rabies Virus in Humans in the Territory of the Russian Federation During the Period of 2002–2015

<sup>1</sup>Russian Academy of Science, Moscow, Russian Federation; <sup>2</sup>Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation; <sup>3</sup>Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russian Federation; <sup>4</sup>Center for Special Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous and Exotic Infectious Diseases, Sergiev Possad, Russian Federation; <sup>5</sup>Scientific Center on Expertise of Medical Application Products, Moscow, Russian Federation

The article presents the results of bioassays investigation by the specialists of the Center for Special Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous and Exotic Infectious Diseases, isolated during 2002–2015, obtained from deceased people suspected for rabies virus infection. Outlined are the main challenges of working with the received samples of biological material from dead people and ways of handling these issues. Put forward are the pressing problems of epizootic and epidemiological bias that require comprehensive solutions on the part of healthcare authorities and the veterinary service of the Russian Federation. Given are the results of the laboratory-diagnostic activities of the Center for Special Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous and Exotic Infectious Diseases, which indicate that the applied methods of isolation and identification of the rabies pathogen allow for efficient and in-time diagnosis of the disease.

*Key words:* rabies, street rabies virus, laboratory diagnostics.

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

*Corresponding author:* Sergey V. Borisevich, e-mail: 48cnii@mil.ru.

*Citation:* Onishchenko G.G., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakskina N.D., Pistsov M.N., Rubtsov V.V., Surovyatkin A.V., Petrov A.A., Kazantsev A.V., Berezhnoy A.M., Zverev A.Yu., Manoshkin A.V., Krotkov V.T., Kutaev D.A., Maksimov V.A., Kuznetsov S.L., Vakhnov E.Yu., Timofeev M.A., Movsesyants A.A., Borisevich S.V. Epidemiological Situation on and Problems of Identification of Rabies Virus in Humans in the Territory of the Russian Federation During the Period of 2002–2015. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:27–32. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-27-32

Бешенство является зоонозной природно-очаговой инфекционной болезнью, общей для человека и животных. Ее абсолютная фатальность и эволюция придают чрезвычайный характер каждому случаю и ставят ветеринарно-медицинскую проблему бешенства в разряд первостепенных. Ежегодная инцидент-

ность регистрируемого в мире бешенства животных составляет от 30 до 45 тыс. [6]. Количество людей, погибающих от гидрофобии, достигает 55 тыс. человек, из них 45 % случаев относится к региону Южной и Юго-Восточной Азии [20, 21].

В Российской Федерации на протяжении по-

следних лет эпизоотолого-эпидемиологическая обстановка по бешенству оценивается как напряженная. Почти во всех регионах страны периодически отмечается активизация природных очагов бешенства, растет число случаев заболевания среди диких плотоядных животных, в эпизоотический процесс вовлекаются домашние (собаки, кошки) и сельскохозяйственные животные [15]. К новым особенностям распространения бешенства в России относят уменьшение роли лисицы в заражении людей и увеличение роли собаки, повышение случаев гибели людей от гидрофобии после контакта с кошками, расширение ареала вируса бешенства в северном и восточном направлениях [12, 13], а именно возможное формирование нового эколого-эпизоотологического феномена – центрально-европейского суперареала природно-очагового бешенства [6].

Бешенство относится к категории заразных болезней, опосредованных укусами и царапинами. В России до 80-х годов прошлого века число лиц, ежегодно обращающихся за антирабической помощью, не превышало 200 тыс. человек. С середины 90-х годов ситуация изменилась, число лиц, обращающихся за антирабической помощью, стало превышать 400 тыс. человек [17]. В последние годы (2013–2015 гг.) регистрировалось менее 400 тыс. человек, что указывает на небольшую тенденцию к уменьшению обращаемости среди взрослого населения. Число детей, пострадавших от укусов, оцарапываний, ослюнений животными, в течение 2004–2015 гг. колебалось в пределах около 115 тыс. человек (рис. 1), что за последние годы составляло в доле сегменте 28–30 % от общего числа людей, обратившихся за антирабической помощью.

Согласно Постановлению Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 01.02.2012 № 13, комплекс мер по предотвращению распространения бешенства от животных к человеку напрямую связан с профилактикой данной инфекции. Ежегодная потребность лечебно-профилактических учреждений в Российской Федерации в антирабических препаратах определяется в 1,5 млн доз (ампул по 1,0 мл) антирабической вакцины и 550 литров антирабического иммуноглобулина. Применяемые в нашей стране антирабические вакцины Российского производства являются высокоэффективными препа-

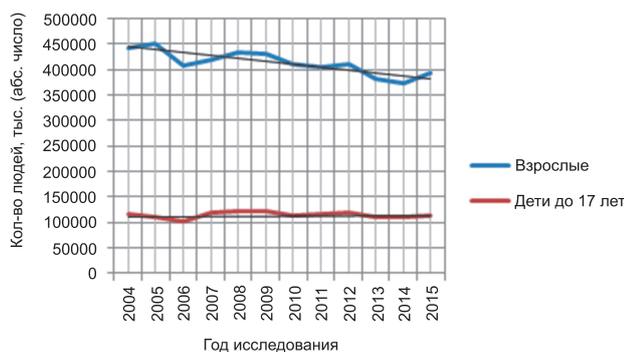


Рис. 1. Динамика числа лиц, обратившихся за антирабической помощью в 2004–2015 гг.

ратами, соответствующими всем требованиям ВОЗ.

Необходимо отметить, что только за период 2010–2012 гг. в Российской Федерации число лиц, подвергшихся профилактической вакцинации против бешенства, составило 59856 человек, а ревакцинированных – 41152 человека.

Производство антирабического гетерологического иммуноглобулина на территории Российской Федерации, налажено в ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» [1].

Особую актуальность на современном этапе борьбы с бешенством имеет система эпидемиологического надзора за гидрофобией, непосредственно связанная с качественной диагностикой данного заболевания. Диагностика бешенства проводится на основе эпидемиологических и эпизоотических данных, клинических, патологоанатомических и лабораторных методов. Среди лабораторных методов применяются микроскопический, иммунохимический, молекулярно-биологический и вирусологический с помощью биологической пробы на мышах. Последний является одним из обязательных при постановке диагноза согласно СП 3.1.7.2627-10 и ГОСТ 26075-2013 [5, 8]. Развивающиеся в настоящее время молекулярно-биологические методы, основанные на ПЦР (ОТ-ПЦР, ОТ-ПЦР-РВ, секвенирование ПЦР-продуктов), позволяют своевременно и эффективно выявлять возбудитель, вызывающий гидрофобию [4, 11], и получать данные по молекулярно-генетическому разнообразию рабдовирусов, циркулирующих на территории Российской Федерации, и возможных путях заноса, распространения инфекции, что имеет ключевое значение для мониторинга и профилактики бешенства [13, 18].

С ноября 1999 г. в системе Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и Министерства обороны Российской Федерации функционирует штатный Центр специальной лабораторной диагностики особо опасных и экзотических инфекционных заболеваний (далее Центр) (приказы Министра обороны РФ и Минздрава РФ № 558/416 от 20.11.1999, Министра обороны РФ и Роспотребнадзора № 588/873 от 14.08.2014), деятельность которого напрямую связана с противоэпидемической защитой территории России [9–11].

Одной из возложенных на Центр задач является проведение лабораторной диагностики на наличие вируса бешенства у людей, погибших от гидрофобии, а также выделение возбудителя из поступивших проб, с его последующей идентификацией, консервацией и депонированием.

Лабораторные диагностические исследования проводили в соответствии с СП 3.1.7.2627-10, СП 1.3.3118-13, ГОСТ 26075-2013. Объектом исследования служили пробы участков головного мозга: аммонов рог, мозжечок, кора больших полушарий, в некоторых случаях фрагменты гиппокампа, дна 3-го и 4-го желудочков, ствола мозга, лобной доли и

продолговатого мозга. Исследованию подвергались также пробы слюнных желез и в одном случае миндалины гортани. Выделение вируса и определение его биологической активности проводили на белых мышцах массой 6–8 г. Для идентификации возбудителя бешенства использовали медицинское изделие для диагностики *in vitro*, набор реагентов на основе метода одностадийной ОТ-ПЦР-РВ «ОМ-Скрин-Бешенство-РВ» (по ТУ 9398-011-46395995-2013, РЗН 2016/3575 от 25.01.2016) производства компании Синтол, Москва. Верификация результатов ОТ-ПЦР-РВ обязательно осуществлялась с помощью набора реагентов на основе метода ОТ-ПЦР «ВЦ-ПЦР-Бешенство», разработанного в 2002 г. специалистами ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. В некоторых случаях выполняли электронно-микроскопическое выявление вирионов вируса в ультратонких препаративных срезах.

Проведенные диагностические исследования 228 проб биологического материала, поступивших с 2002 по 2015 год из 60 лечебно-профилактических учреждений 25 субъектов Российской Федерации от 64 погибших людей с подозрением на гидрофобию, показали, что в 224 пробах от 63 человек выявлен и идентифицирован возбудитель бешенства. При этом общее количество людей, погибших от гидрофобии в Российской Федерации за указанный период, составляло 155 человек. Специалистами Центра подтверждено 40,6 % случаев смерти с диагнозом бешенство от их общего числа по стране за изучаемый временной интервал (рис. 2).

Единственный лабораторно неподтвержденный случай был зарегистрирован в 2015 г. при исследовании с помощью методов ОТ-ПЦР-РВ, биопробы и электронной микроскопии четырех проб головного мозга погибшей Щ., поступивших из ГБУЗ «Городская больница скорой медицинской помощи им. М.Ф.Владимирского» (Нижний Новгород). В анамнезе истории болезни Щ. говорилось, что во дворе собственного дома гражданка была исцарапана лисой. В этот же день она была госпитализирована, через сутки развился сильный психоз, а через шесть дней появилась регидность затылочных

мышц, гипотонус левой нижней конечности, на 11-е сутки наступила смерть.

Специалистами Центра для исключения ложноположительных результатов, обусловленных иммунизацией пострадавшей Щ. вакциной против бешенства, проведен полный комплекс лабораторных исследований, в результате чего возбудитель бешенства не выявили. Необходимо отметить, что международными органами не рекомендуется использование молекулярно-генетических методов при рутинной диагностике аутопсийных проб из-за высокого риска перекрестной контаминации [19]. Специалистами Центра накоплен значительный опыт использования ОТ-ПЦР-РВ при диагностической работе с аутопсийными пробами, который показывает, что единственным источником перекрестной контаминации является этап пробоподготовки и выделения нуклеиновой кислоты, что обусловлено значительной концентрацией вирусной РНК в пробах головного мозга. Строгое использование отрицательного контроля выделения РНК позволяет полностью исключить ложноположительный результат, поскольку отрицательные пробы на данном этапе не контактируют с положительными.

За период с 2002 по 2015 год биологический материал для лабораторной диагностики бешенства у людей, погибших от гидрофобии, поступил из семи федеральных округов Российской Федерации: Центрального, Южного, Приволжского, Северо-Западного, Северо-Кавказского, Уральского, Дальневосточного. Наибольшее количество (128 проб, 57,1 % от общего числа) проб, содержащих вирус бешенства, получили от 35 погибших людей из Центрального федерального округа, 40 (18 %) проб от 11 погибших из Приволжского федерального округа, 27 (12 %) – от 9 погибших из Южного федерального округа Российской Федерации. Из Уральского, Северо-Кавказского, Дальневосточного, Северо-Западного федеральных округов от 4, 2, 1, 1 погибшего человека соответственно поступило 16, 8, 3, 2 пробы биологического материала, что составляет 7,1, 3,6, 1,3, 0,9 % соответственно от общего числа поступивших проб, содержащих вирус бешенства. Полученные данные согласуются с ранее проведенными исследования-



Рис. 2. Участие Центра в исследованиях по выявлению и идентификации уличного вируса бешенства у погибших людей на территории Российской Федерации в 2002–2015 гг.

ми [12] по определению территории наибольшего риска заражения бешенством за период 2000–2014 гг., в которых говорится о лидирующем положении Центрального федерального округа – 35 % в общей структуре заболеваемости населения гидрофобией.

Поступление биопроб из Центрального федерального округа происходило из 10 субъектов, а именно: Московской, Тверской, Курской, Владимирской, Липецкой, Воронежской, Калужской, Ярославской, Рязанской областей и Москвы. Наибольшее число – 39 и 34 пробы – доставлено соответственно от 11 и 9 умерших людей, заболевших на территории Московской и Тверской области, что составляет 30,5 и 26,6 % соответственно от общего числа поступивших проб из Центрального федерального округа. Из Курской, Владимирской, Липецкой, Воронежской, Калужской, Ярославской, Рязанской областей и Москвы соответственно от 3, 3, 2, 2, 2, 1, 1, 1 погибшего человека поступило 11, 11, 8, 7, 7, 4, 4, 3 пробы, что составляет 8,6, 8,6, 6,2, 5,5, 5,5, 3,1, 3,1, 2,3 % соответственно от общего числа проб, содержащих вирус бешенства, из Центрального федерального округа. Создавшаяся опасная обстановка по рабической инфекции в Центральном федеральном округе естественно обусловлена ухудшением эпизоотической ситуации в дикой природе и проникновением возбудителя в черту сельских населенных пунктов и городов. Незатухающие очаги бешенства непрерывно угрожают экономически важным регионам и требуют решения по их купированию.

Отдельное внимание уделяется диагностике бешенства у детей. В течение 2002–2015 гг. в Центр поступили и дали положительный результат на наличие возбудителя рабической инфекции 29 проб от 9 погибших детей из четырех Федеральных округов Российской Федерации, а именно Центрального, Приволжского, Южного и Уральского. В 2013 г. для подтверждения либо исключения присутствия вируса бешенства поступали пробы образцов головного мозга собаки, которая нанесла множественные укусы ребенку в Архангельске, приведшие к его гибели. В результате определения специфических фрагментов геномной РНК вируса бешенства методом ОТ-ПЦР выявлено наличие возбудителя в пробах мозжечка собаки.

Анализ реальных событий 2000–2013 гг. свидетельствует [12], что среди видовой структуры животных собаки чаще всего заражали человека. Данные специалистов ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России в очередной раз подтверждают статистику по удельному весу случаев гибели людей от заражения вирусом бешенства, переданного разными видами животных: собака – 33,3 %, лиса – 19, кошка – 19, енот – 8, енотовидная собака – 5, другие дикие животные – 5, нет данных – 10,7 %.

На фоне выявленных данных по увеличению количества заразившихся людей после контактов с собаками и значительного участия кошек как источника инфекции особенно актуальным является вопрос об отсутствии отдельного федерального закона о содер-

жании животных на территории России (последнее положение приводится в докладе Уполномоченного по правам человека в Российской Федерации от 24.03.2016). При неопределенных нормах об ответственности за ненадлежащее содержание домашних животных и отсутствии полномочий в этой части у субъектов Российской Федерации эффективная борьба с бешенством на современном этапе затруднительна.

Анализ результатов исследований установил, что количество мужчин, заразившихся и погибших от бешенства, гораздо больше числа женщин (39 мужчин и 24 женщины, что в долевом соотношении составляет 62 и 38 % соответственно), что очевидно объясняется меньшим уровнем страха и настороженности по отношению к животным у лиц мужского пола. Оказалось, что средний возраст погибших мужчин составлял 44 года, а женщин – 48 лет. Люди данного возраста составляют костяк экономически активного населения в Российской Федерации.

При изучении данных анамнеза историй болезни погибших людей выявлено, что территория места заражения играет существенную роль в предотвращении риска угрозы инфицирования вирусом бешенства. Из 63 погибших от бешенства 25 человек заразились в сельской местности, 8 – в городе, 5 человек в лесу и 1 человек в степи (по остальным 24 погибшим данные отсутствуют). Причина заражения 25 человек в сельских населенных пунктах определяется большей вероятностью контакта с источником инфекции.

Результаты проведенных исследований подтверждают, что из 63 умерших от гидрофобии в 2002–2015 гг. 40 человек (63 %) не обращались по поводу укусов животными и не получили своевременное антирабическое лечение. В четырех случаях (6 %) пострадавшие люди обращались с опозданием. Поэтому на сегодняшний день злободневны вопросы просветительской работы в городах и населенных пунктах на предмет внимательности к подозрительным, бродячим животным и мерам личной и общественной профилактики бешенства. Не исключены также трудности в работе врачей, обусловленные безответственным поведением со стороны пострадавших от укусов людей, особенно родителей.

Необходимо заметить, что 6 человек (9,5 %), обратившись за медицинской помощью, впоследствии отказались от антирабического лечения. У двух человек (3 %) после укусов опасной локализации, нанесенных лисой и енотовидной собакой, не была назначена полная схема антирабической помощи, что, возможно, способствовало развитию заболевания. В одном случае лечение не проводилось, что привело к летальному исходу, а в другом заболевании возникло после укусов опасной локализации, на фоне антирабического лечения. Объяснением случаев отказов пострадавших от проведения им антирабического лечения, а также лечения по неполной схеме и в одном случае его не проведения может являться недостаточная подготовка медицинских работников

и их ошибки по вопросам оказания населению антирабической помощи.

Изложенные обстоятельства требуют совместных комплексных профилактических мер со стороны органов здравоохранения и ветеринарной службы на федеральном и муниципальном уровне.

Известно, что инкубационный период при гидрофобии зависит от локализации укуса и дозы заражения [14]. Анализ данных истории болезни погибших людей показал, что при заражении посредством укуса опасной локализации, а именно головы или лица, людей, не обратившихся за антирабической помощью, либо ее частично получавших, инкубационный период составлял от 14 до 56 суток (в среднем 26,6), а при укусах кистей и пальцев рук – от 21 до 180 суток (в среднем 57,6) и неопасной локализации – область предплечья, нижние конечности – от 31 до 245 суток (в среднем 91,8). В процентном соотношении преобладало число погибших людей от укусов опасной локализации 85,7 против 14,3 % – количества умерших лиц, имевших укусы неопасной локализации. За более чем 80-летний период наблюдения у циркулирующего в природе вируса бешенства некоторые биологические свойства не меняются, так как длительность инкубационного периода у людей, заразившихся и не обратившихся за медицинской помощью, стабильно колеблется около 60–65 сут [7]. Возможно, результаты настоящих исследований будут полезны при анализе изложенной взаимосвязи за более длительный период.

В период 2002–2015 гг. специалистами Центра лабораторно подтверждены случаи инфицирования вирусом бешенства иностранных граждан, а именно в 2006 и 2012 гг. в Московской области граждан Таджикистана, в 2007 г. в Мурманской области гражданина Украины, в 2010 г. в Московской области гражданина Молдавии и на территории Челябинской области гражданина Казахстана. При анализе историй болезни погибших людей выяснилось, что, как правило, заражение происходило на территории их страны. Данные факты в очередной раз подтверждают циркуляцию вируса бешенства в сопредельных с Россией странах [2–4]. В 2014 г. при исследовании двух поступивших проб от погибшего Г., гражданина Российской Федерации, укушенного собакой на отдыхе в Индии, подтверждено наличие искомого вируса. Необходимо заметить, что результаты прижизненной и постмортальной лабораторной диагностики по данному случаю приведены в статье [16].

В практике посмертного диагностического исследования в 2002, 2004, 2007 гг. некоторыми лечебно-профилактическими организациями для подготовки, хранения и транспортирования секционного материала в Центр использовался формалин, смесь Дюбоско, что приводило к полному разрушению фрагментов РНК вируса бешенства и не позволяло их выявлять методом ОТ-ПЦР. Допускались грубые ошибки при хранении отобранных проб в медицинских учреждениях. В данных тяжелых случаях для изучения поступивших проб использовали

метод электронной микроскопии, который позволял выявлять вирионы с «пулеподобной» морфологией, характерной для вируса уличного бешенства.

По итогам выявленных ошибок, в целях совершенствования надзора и профилактики бешенства, специалистами разработаны методические указания МУ 4.2.2839-11 «Порядок отбора, упаковки, хранения и транспортирования биологического материала для лабораторной диагностики бешенства у людей, погибших от гидрофобии», что в последующий период 2012–2015 гг. позволило исключить неправильную подготовку и транспортировку проб лечебно-профилактическими организациями, уменьшить временные сроки и повысить качество проводимых диагностических исследований.

Специалистами Центра получены поступившие с 2002 по 2015 год изоляты вируса уличного бешенства из проб секционного материала от погибших людей, с последующей паспортизацией и депонированием штаммов данного возбудителя в Государственную коллекцию микроорганизмов ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Проведенная работа, учитывая напряженную эпизоотологическую обстановку по бешенству в Российской Федерации, играет важную роль для дальнейшего филогенетического изучения вируса бешенства.

Таким образом, изложенные и проанализированные данные свидетельствуют об эффективной лабораторно-диагностической работе Центра по поступающим пробам биологического материала от лиц, инфицированных (подозрительных на инфицирование) вирусом бешенства. Используемые методы выделения и идентификации возбудителя позволяют качественно и своевременно проводить диагностику данной болезни. Отмеченные актуальные вопросы эпизоотологической и эпидемиологической направленности требуют комплексного решения со стороны органов здравоохранения и ветеринарной службы Российской Федерации. Выполненные исследования по выделению изолятов вируса уличного бешенства позволяют паспортизировать и депонировать новые штаммы данного возбудителя в Государственную коллекцию микроорганизмов ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, для их последующего филогенетического анализа, что имеет существенное значение для укрепления эпизоотологического надзора за бешенством на территории Российской Федерации.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамова Е.Г., Генералов С.В., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Никифоров А.К., Комиссаров А.В. Экспериментальное обоснование внедрения культуральных технологий в производство антирабического иммуноглобулина. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 2:95–101. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-95-101.
2. Ботвинкин А.Д., Отгонбаатар Д. Бешенство на сопредельных территориях России и Монголии (исторический обзор). *Сибир. мед. журн.* 2006; 7:8–10.
3. Богуцкий М.И., Басинский В.А., Цыркунов В.М., Шока А.И. Клинико-морфологическая характеристика летальных наблюдений бешенства. *Журн. Гродненского гос. мед. ун-та.* 2004; 1(5):83–5.

4. Кошметов Ж.К., Матвеева В.М., Строчков В.М., Богданова М.И., Оразымбетова Н.К., Сугирбаева Г.Д., Нурабаев С.Ш., Сырым Н.С. Оптимизация условий постановки полимеразной цепной реакции для диагностики бешенства. *Вестн. Алтайского гос. аграрного ун-та*. 2014; 11(121):121–6.

5. Макаров В.В. Бешенство: очерк мирового нозоареала и общие элементы контроля. *Ветеринарн. патол.* 2002; 1:12–20.

6. Макаров В.В., Гулюкин А.М., Гулюкин М.И. Бешенство: естественная история на рубеже столетий. М.: ЗооВетКнига, 2015. С. 5–13.

7. Мовсесянц А.А., Хадарцев О.С. Случаи гидрофобии в Российской Федерации. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2003; 5:112–6.

8. Недосеков В.В. Сравнительная оценка методов лабораторной диагностики бешенства. *Ветеринарн. патол.* 2002; 1:48–51.

9. Онищенко Г.Г., Васильев Н.Т., Максимов В.А., Марков В.И., Борисевич И.В., Федоров Ю.М. Центр специальной лабораторной диагностики и лечения особо опасных и экзотических инфекционных заболеваний в системе противоэпидемической защиты территории Российской Федерации. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2001; 6:114–5.

10. Онищенко Г.Г., Васильев Н.Т., Максимов В.А., Марков В.И., Меркулов В.А., Писцов М.Н., Бережной А.М., Сыромятникова С.И., Зубов В.В. Выделение и идентификация возбудителя тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС) от больного атипичной пневмонией. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2003; 5:109–12.

11. Онищенко Г.Г., Васильев Н.Т., Максимов В.А., Писцов М.Н., Степанов Н.Н., Борисевич С.В., Ручко С.В., Евстигнеев О.В., Хамитов Р.А., Зверев А.Ю., Меркулов В.А., Ионов С.Н., Марков В.И., Мовсесянц А.А. Идентификация «уличного» вируса бешенства из биопроб головного мозга погибшего ребенка. *Биопрепараты: профилактик., диагн., лечение*. 2009; 1–2(33–34):37–40.

12. Полещук Е.М., Броневец А.Д., Сидоров Г.Н. Современные особенности эпидемиологии бешенства в России. *Инф. бол.* 2016; 14(1):29–36.

13. Рудаков Н.В., Ястребов В.К., Шпынов С.Н., Якименко В.В., Старостина О.Ю., Рудакова С.А., Полещук Е.М., Самойленко И.Е. Актуальные вопросы эпидемиологии природно-очаговых инфекций. *Инф. и иммунитет*. 2012; 1, 2:189.

14. Селимов М.А. Бешенство. М.: Медицина, 1978. 336 с.

15. Топорков В.П., Величко Л.Н. Эпидемиологическая и эпизоотологическая ситуация по бешенству в федеральных округах Российской Федерации. *Пробл. особо опасных инф.* 2007; 2(94):37–40.

16. Хисматуллина Н.А., Гулюкин А.М., Гулюкин М.И., Иванов А.В., Сабирова В.В., Южаков А.Г., Александрова Н.М., Самерханов И.И., Алипер Т.И. Два случая гидрофобии в Республике Татарстан: прижизненная и постморальная лабораторная диагностика. *Вопр. вирусол.* 2015; 2:18–24.

17. Черкасский Б.Л., Хадарцев О.С., Мовсесянц А.А. Эпидемиологический надзор за бешенством в Российской Федерации. *Бюл. Вакцин. Бешенство*. 2005; 1(37):5.

18. Шпынов С.Н., Полещук Е.М., Рудаков Н.В., Самойленко И.Е., Решетникова Т.А., Кумпан Л.В., Коломеец А.Н., Сидоров Г.Н., Ткачев С.Е., Грибенча С.В. Применение молекулярных методов типирования при изучении штаммов риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки и вируса бешенства. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 111:77–80.

19. Aiello R., Zecchin B., Tiozzo Caenazzo S., Cattoli G., Benedictis P. Disinfection protocols for necropsy equipment in rabies laboratories: Safety of personnel and diagnostic outcome. *J. Virol. Methods*. 2016; 234:75–9. DOI: 10.1016/j.jviromet.2016.03.017.

20. Chowdhury F.R., Basher A., Amin M.R., Hassan N., Patwary M.I. Rabies in South Asia: fighting for elimination. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* 2015; 10(1):30–4. DOI: 10.2174/1574891X10666150410130024.

21. Kole A.K., Roy R., Kole D.C. Human rabies in India: a problem needing more attention. *Bull. World Health Organ.* 2014; 92:230. DOI: 10.2471/BLT.14.136044.

References

1. Abramova E.G., Generalov S.V., Matveeva Zh.V., Zhulidov I.M., Nikiforov A.K., Komissarov A.V. [Experimental substantiation of cultural technologies introduction into manufacturing of anti-rabies immunoglobulin]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 2:95–101. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-95-101.

2. Botvinkin A.D., Otgonbaatar D. [Rabies in the neighboring territories of Russia and Mongolia (historical review)]. *Sibir. Med. Zh.* 2006; 7:8–10.

3. Bogutsky M.I., Basinsky V.A., Tsyrukunov V.M., Shoka A.I. [Clinical-morphological characteristics of fatal rabies observations]. *Journal of Grodna State Medical University (Belarus)*. 2004; 1(5):83–5.

4. Koshemetov Zh.K., Matveeva V.M., Stochkov V.M., Bogdanova M.I., Orazymbetova N.K., Sugirbaeva G.D., Nurabaev S.Sh., Syrym N.S. [Optimization of polymerase chain reaction conditions for rabies diagnostics]. *Bulletin of Altai State Agrarian University*. 2014; 11(121):121–6.

5. Makarov V.V. [Rabies: an essay on world nozoareal and general control elements]. *Veterinar. Patol.* 2002; 1:12–20.

6. Makarov V.V., Gulyukin A.M., Gulyukin M.I. [Rabies: Natural History at the Turn of the Centuries]. M.: "ZooVetKniga". 2015. P. 5–13.

7. Movsesyants A.A., Khadartsev O.S. [Cases of hydrophobia in the Russian Federation]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2003; 5:112–6.

8. Nedosekov V.V. [Comparative evaluation of the methods for laboratory diagnostics of rabies]. *Veterinar. Patol.* 2002; 1:48–51.

9. Onishchenko G.G., Vasil'ev N.T., Maksimov V.A., Markov V.I., Borisevich I.V., Fedorov Yu.M. [Center for Special Laboratory Diagnostics and Treatment of Particularly Dangerous and Exotic Infectious Diseases as an element of anti-epidemic protection system in the territory of the Russian Federation]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2001; 6:114–5.

10. Onishchenko G.G., Vasil'ev N.T., Maksimov V.A., Markov V.I., Merkulov V.A., Pistsov M.N., Berezhnoy A.M., Syromyatnikova S.I., Zybov V.V. [Isolation and identification of the causative agent of severe acute respiratory syndrome (SARS) from a patient with atypical pneumonia]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2003; 5:109–12.

11. Onishchenko G.G., Vasil'ev N.T., Maksimov V.A., Pistsov M.N., Stepanov N.N., Borisevich S.V., Ruchko S.V., Evstigneev O.V., Khamitov R.A., Zverev A.Yu., Merkulov V.A., Ionov S.N., Markov V.I., Movsesyants A.A. [Identification of "street" rabies virus in bioassays of the brain tissues of a deceased child]. *Biopreparaty: Profilakt. Diagnost. Lechenie*. 2009; 1–2(33–34):37–40.

12. Poleshchuk E.M., Bronevets A.D., Sidorov G.N. [Modern peculiarities of epidemiology of rabies in Russia]. *Infek. Bol.* 2016; 14(1):29–36.

13. Rudakov N.V., Yastrebov V.K., Shpynov S.N., Yakimenko V.V., Starostina O.Yu., Rudaikova S.A., Poleshchuk E.M., Samoilenko I.E. [Current issues of natural focal infections, epidemiology]. *Infek. i Immunitet*. 2012; 1, 2:189.

14. Selimov M.A. [Rabies]. M.: "Meditsina"; 1978. 336 p.

15. Toporkov V.P., Velichko L.N. [Epidemiologic and Epizootologic Situation with Rabies in the Federal Districts of the Russian Federation]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2007; 2(94):37–40.

16. Khismatullina N.A., Gulyukin A.M., Gulyukin M.I., Ivanov A.V., Sabirova V.V., Yuzhakov A.G., Aleksandrova N.M., Samerkhanov I.I., Aliper T.I. [Two cases of hydrophobia in the Republic of Tatarstan: *in vivo* and post-mortem laboratory diagnosis]. *Vopr. Virusol.* 2015; 2:18–24.

17. Cherkassky B.L., Khadartsev O.S., Movsesyants A.A. [Epidemiological surveillance over rabies in the Russian Federation]. *Bulletin of Vaccines. Rabies*. 2005; 1(37):5.

18. Shpynov S.N., Poleshchuk E.M., Rudakov N.V., Samoilenko I.E., Reshetnikova T.A., Kumpan L.V., Kolomeets A.N., Sidorov G.N., Tkachev S.E., Grebencha S.V. [Application of Molecular Typing Methods for Analysis of Strains of Rickettsiae of the Spotted Fever Group and Rabies Virus]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 111:77–80.

19. Aiello R., Zecchin B., Tiozzo Caenazzo S., Cattoli G., Benedictis P. Disinfection protocols for necropsy equipment in rabies laboratories: Safety of personnel and diagnostic outcome. *J. Virol. Methods*. 2016; 234:75–9. DOI: 10.1016/j.jviromet.2016.03.017.

20. Chowdhury F.R., Basher A., Amin M.R., Hassan N., Patwary M.I. Rabies in South Asia: fighting for elimination. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* 2015; 10(1):30–4. DOI: 10.2174/1574891X10666150410130024.

21. Kole A.K., Roy R., Kole D.C. Human rabies in India: a problem needing more attention. *Bull. World Health Organ.* 2014; 92:230. DOI: 10.2471/BLT.14.136044.

Authors:

Onishchenko G.G. Russian Academy of Sciences. Moscow, Russian Federation.  
 Popova A.Yu., Demina Yu.V. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare; 18, Bld. 5 and 7, Vadkovsky Pereulok, Moscow, 127994, Russian Federation. Russian Medical Academy of Continuing Professional Education; 2/1, Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russian Federation.  
 Ezhlova E.B., 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.  
 Pistsov M.N., Rubtsov V.V., Surovyatkin A.V., Petrov A.A., Kazantsev A.V., Berezhnoy A.M., Zverev A.Yu., Manoshkin A.V., Krotkov V.T., Kutaev D.A., Maksimov V.A., Kuznetsov S.L., Vakhnov E.Yu., Timofeev M.A., Borisevich S.V. Center for Special Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous and Exotic Infectious Diseases. 11, Oktyabrskaya St., Sergiev Posad-6, 127051, Russian Federation. E-mail: 48cnii@mail.ru.  
 Movsesyants A.A. Scientific Center on Expertise of Medical Application Products. 8, Petrovsky Bulvar, Moscow, 127051, Russian Federation.

Об авторах:

Онищенко Г.Г. Российская академия наук. Российская Федерация, Москва.  
 Попова А.Ю., Демина Ю.В. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; Российская Федерация, 127994, Москва, Вадковский переулок, дом 18, строение 5 и 7. Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования; Российская Федерация, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1.  
 Ежлова Е.Б., 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.  
 Писцов М.Н., Рубцов В.В., Суrowяткин А.В., Петров А.А., Казанцев А.В., Бережной А.М., Зверев А.Ю., Маношкин А.В., Кротков В.Т., Кутаев Д.А., Максимов В.А., Кузнецов С.Л., Вахнов Е.Ю., Тимофеев М.А. Центр специальной лабораторной диагностики особо опасных и экзотических инфекционных заболеваний. Российская Федерация, 141306, Московская область, г. Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, д. 11. E-mail: 48cnii@mail.ru.  
 Мовсесянц А.А., Борисевич С.В. Научный центр экспертизы средств медицинского применения. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8.

Поступила 03.07.17.

О.Н.Подладчикова

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМАХ ПАТОГЕНЕЗА ЧУМЫ

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

В обзоре проведен краткий анализ опубликованных за последние десять лет результатов исследований, посвященных изучению молекулярных механизмов действия известных на сегодняшний день факторов вирулентности возбудителя чумы *Yersinia pestis*. Проанализированы разные компоненты *Y. pestis*, синтезирующиеся бактериями на четырех этапах инфекционного процесса при бубонной форме чумы: в коже, лимфоузлах, паренхиматозных органах и крови. Описаны факторы и механизмы, которые лежат в основе защиты микробов от бактерицидного действия гуморальных и клеточных факторов врожденного иммунитета хозяина, которые по-разному воздействуют на организм животных, стимулируя про- или противовоспалительную реакцию хозяина на инфекцию, и способствуют смене жизненного цикла бактерий внутри хозяина, обеспечивая переход от внутриклеточного размножения в фагоцитах на первых этапах инфекции к внеклеточному размножению в лимфоузле, селезенке, печени и крови на последующих. В обзоре рассматриваются только те факторы *Y. pestis*, взаимодействие которых с молекулами и клетками хозяина на разных этапах инфекционного процесса экспериментально доказано.

**Ключевые слова:** возбудитель чумы, *Yersinia pestis*, инфекционный процесс при бубонной чуме, факторы вирулентности, механизмы действия факторов вирулентности.

Корреспондирующий автор: Подладчикова Ольга Николаевна, e-mail: plague@aaanet.ru.

O.N.Podladchikova

## Modern Views on Molecular Mechanisms of Plague Pathogenesis

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

The review presents brief analysis of the published over the past decade results of investigations devoted to studies of currently known molecular action mechanisms of *Yersinia pestis* virulence factors. Analyzed are different *Y. pestis* components, synthesized by the bacteria at four stages of infectious process in case of bubonic plague: in derma, lymph nodes, parenchymal organs, and blood. Described are the factors and mechanisms that induce microbe protection from bactericidal action of humoral and cell factors of innate host immunity, which effect the organism of animals in different ways, stimulating pro- or anti-inflammatory reaction of a host to the infection, and contribute to the shift of bacterial life cycle inside the host, providing for the transfer from intracellular propagation in phagocytes at early stages to extracellular propagation in lymph node, spleen, liver and blood at later stages. Discussed are only those factors of *Y. pestis* the interaction of which with host molecules and cells at different stages of infectious process in case of bubonic plague is experimentally proved.

**Key words:** plague agent, *Yersinia pestis*, infectious process in case of bubonic plague, virulence factors, action mechanisms of virulence factors.

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

Corresponding author: Olga N. Podladchikova, e-mail: plague@aaanet.ru.

Citation: Podladchikova O.N. Modern Views on Molecular Mechanisms of Plague Pathogenesis. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:33–40. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-33-40

Возбудитель чумы *Yersinia pestis* имеет комплексный жизненный цикл с чередованием существования в простейших, обеспечивающих его сохранение в межэпизоотийный период в насекомых, передающих его млекопитающим, у которых он вызывает острое системное заболевание. В зависимости от входных ворот возбудителя инфекционный процесс в организме млекопитающих может протекать в разных формах (бубонной, септической и легочной), но наиболее распространенной в природе является бубонная форма чумы у грызунов, которые заражаются возбудителем от кормящихся на них блох. На модели этой формы чумы, которая в экспериментах воспроизводится с помощью подкожного или внутрикожного заражения лабораторных животных, получено много данных о факторах вирулентности *Y. pestis*. Многие годы исследования были сосредоточены главным

образом на факторах, которые кодируются нестабильными генетическими элементами (плазмидами pMT1, pCD1, pPCP1 и хромосомным *pgm*-локусом). Анализ этих данных опубликован в многочисленных обзорах. За последние годы методический арсенал изучения *Y. pestis* пополнился новыми методами, такими как полногеномное секвенирование, биоинформатика, точечный мутагенез, определение экспрессии генов *in vivo*, протеомный и транскриптомный анализ экспрессии генов *in vitro* и *in vivo*, применение биолюминесценции для анализа развития инфекции, использование нокаутных лабораторных животных. С помощью этих методов обнаружено много генов, утрата которых приводит к снижению вирулентности *Y. pestis*. Это не только гены, кодирующие известные или новые факторы вирулентности, но и гены, кодирующие регуляторные молекулы, которые

осуществляют строгий контроль экспрессии генов *Y. pestis* на транскрипционном, трансляционном и пост-трансляционном уровне в ответ на конкретные сигналы в организме хозяина. В данном обзоре приведен краткий анализ опубликованных за последние годы исследований, посвященных механизмам действия известных факторов *Y. pestis*, взаимодействие которых с молекулами и клетками хозяина на разных этапах инфекционного процесса при бубонной чуме экспериментально доказано.

Инфекционный процесс при бубонной чуме условно можно разделить на четыре этапа, на которых внутриклеточное размножение бактерий в начале процесса сменяется внеклеточным размножением на последующих этапах. На разных этапах бактерии синтезируют разные факторы, которые стимулируют провоспалительную или противовоспалительную реакцию хозяина на инфекцию.

*Первый этап инфекционного процесса в организме млекопитающих.* Передача возбудителя чумы блохами зависит от способности бактерий выживать в насекомых [8]. Известно, что этому способствует синтезирующийся при 21–30 °С гексаацилированный липополисахарид (ЛПС), содержащий модификацию фосфатной группы 4-аминоарабинозой, а также фосфолипаза D – мышинный токсин. Многие годы считалось, что в основе передачи чумы млекопитающим лежит способность бактерий синтезировать экзополисахарид биопленок и блокировать преджелудок блох. При этом повышению эффективности передачи чумы заблокированными блохами способствует наличие у бактерий генов *cafI/MIA1*, способных обеспечивать синтез бактериями капсульного антигена Caf1 [36]. Недавние исследования показали, что наиболее вероятным способом распространения *Y. pestis* среди грызунов является передача ранней фазы, при которой не заблокированные блохи, сохраняющие бактерии в течение четырех дней, могут передавать возбудителя грызунам [50].

Этап пребывания в блохах важен для подготовки бактерий к инфицированию теплокровного хозяина, в кожу которого они попадают с укусом. Кожный этап инфекционного процесса, прежде всего из-за методических сложностей, исследован гораздо меньше, чем последующие этапы. В то же время очевидно, что способность противостоять защитным механизмам врожденного иммунитета хозяина в коже определяет дальнейшую судьбу инфекционного процесса. Как выяснилось, различия в сроках гибели животных при экспериментальной чуме определяются продолжительностью именно этого этапа инфекционного процесса, на котором происходит размножение бактерий [28]. Размножаются ли бактерии на этом этапе внутри тканевых фагоцитов или внеклеточные бактерии также способны к размножению в коже не установлено.

Резистентность к действию гуморальных факторов врожденного иммунитета хозяина необходима для выживания *Y. pestis* на первом этапе инфекции.

Известно, что резистентность чумного микроба к комплементу обеспечивается интегральным белком наружной мембраны Ail, экспрессия и активность которого активируются при 37 °С [21]. Хотя механизм участия Ail в резистентности к сыворотке не исследован, по аналогии со сходными белками энтеропатогенных иерсиний (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*) предполагается, что Ail может связывать негативные регуляторы сборки комплемента (фактор H и белок, связывающий C4 компонент комплемента). Дополнительную роль в резистентности к комплементу играет поверхностная протеаза омпитинового типа, активатор плазминогена Pla, который разрушает C3 компонент комплемента. Для проявления активности Ail и Pla необходим характерный для *Y. pestis* слабоацилированный при 37 °С R-ЛПС [9].

ЛПС участвует и в резистентности бактерий к действию катионных антимикробных пептидов, с которыми микроб встречается не только в коже, но и внутри фагоцитов. Важную роль при этом играет наличие в ЛПС модификации фосфатных групп 4-аминоарабинозой, что приводит к уменьшению связывания бактерий с положительно заряженными пептидами [20]. Для осуществления этой модификации бактериям необходим белок GalU (уридилтрансфераза глюкозо-1-фосфата), отсутствие которой делает бактерии более чувствительными к антимикробным пептидам и менее способными выживать в макрофагах [19]. Резистентность бактерий к действию антимикробных пептидов связана и с наличием в олигосахаридном коре ЛПС концевой N-ацетилглюкозамина [17].

Еще одним гуморальным фактором врожденного иммунитета, с которым возбудитель чумы встречается на первом этапе инфекции, является липокалин-2, блокирующий размножение многих бактерий (но не *Y. pestis*), препятствуя ассимиляции ими железа за счет инактивации низкомолекулярных хелаторов железа – сидерофоров. Для ассимиляции железа, концентрация которого в организме хозяина резко снижается в ответ на инфекцию, возбудителю чумы необходим сидерофор иерсиниабактин (Ybt), который, в отличие от катехолятных сидерофоров энтеробактерий, не инактивируется липокалином-2. Благодаря этому на первых этапах инфекции Ybt эффективно обеспечивает бактерии железом [31]. Кроме того, Ybt принимает участие в ассимиляции меди [6] и цинка [5], которые необходимы для синтеза многих ферментов и размножения бактерий.

Возбудитель чумы обладает разной резистентностью к клеточным факторам врожденного иммунитета, причем бактерии, выделенные из блох, обладают большей резистентностью к фагоцитозу, чем бактерии, выращенные *in vitro* [47]. Попадая в кожу, бактерии привлекают к себе нейтрофилы, дендритные клетки и резидентные тканевые макрофаги [38, 39]. При этом бактерии не взаимодействуют с дендритными клетками, но активно поглощаются нейтрофилами и макрофагами.

В нейтрофилах, в отличие от макрофагов, основная часть бактерий погибает. Известно, что от фагоцитоза нейтрофилами на первом этапе инфекции бактерии защищают факторы, синтезирующиеся в блохах. Недавние исследования показали, что такими факторами могут быть белки мультимерного токсического комплекса, которые максимально синтезируются в блохах при температуре 21 °С [41]. Механизм действия этих белков, гомологичных по структуре, но не по функции, инсектицидному токсическому комплексу грамотрицательных бактерий, в настоящее время неизвестен, но предположительно комплекс может модифицировать актин клеточных мишеней, препятствуя их фагоцитарной активности. Способность снижать хемотаксис нейтрофилов в начале инфекции выявлена у поверхностных белков-аутопереносчиков, *YadB* и *YadC*, наличие которых у микроба способствует снижению экспрессии резидентными немиелоидными клетками хемоаттрактанта нейтрофилов *CXCL1* [46]. Предполагается, что эти белки действуют опосредованно, за счет экранирования ЛПС. Несмотря на эти защитные механизмы, на первом этапе инфекции бактерии все же попадают в нейтрофилы, и в этом участвует *iC3b* компонент комплемента, опсонизирующий бактерии, и его рецептор *CR3* на поверхности нейтрофилов [26]. За последние годы накопились сведения о том, что *Y. pestis* может не только выживать, но даже размножаться в нейтрофилах, бактерицидному действию которых микроб способен сопротивляться. Для этого бактериям важно иметь модифицированный 4-аминоарабинозой ЛПС [29], что необходимо для защиты бактерий от бактерицидного действия катионных пептидов нейтрофилов. Выжившие в нейтрофилах бактерии могут использовать их как временную нишу, обеспечивающую возможность микробам попасть в макрофаги путем эффероцитоза нейтрофилов [40].

Макрофаги являются репликативной нишей *Y. pestis*, поэтому на первом этапе инфекции бактериям важно попасть не в нейтрофилы, а в макрофаги. Что определяет выбор бактериями макрофагов не установлено. В прикреплении бактерий к макрофагам важную роль играют два синтезируемых микробом поверхностных белка – *Pla* и *Ail* [18]. Основным адгезином возбудителя чумы считается протеаза *Pla*, необходимая для взаимодействия бактерий с лектиновым рецептором *DEC-205* на поверхности макрофагов [52]. Механизм участия протеазы в адгезии к клеткам хозяина оставался неизвестным, пока не выяснили, что *Pla* осуществляет пост-трансляционный процессинг белка-аутопереносчика *YarE*, что приводит к появлению у последнего адгезивных свойств [25]. Поэтому можно предположить, что протеаза играет опосредованную роль в адгезии к макрофагам. Не менее важным адгезином является и белок *Ail*, у которого выявлена способность связывать *in vitro* эпителиальные клетки и моноциты [18]. Взаимодействие синтезирующих *Ail* бактерий с клетками хозяина зависит от структуры ЛПС, а так-

же от аутоагрегации бактерий. Механизм участия *Ail* в связи бактерий с макрофагами неизвестен, но предполагается, что этот процесс обусловлен способностью *Ail* связывать компоненты внеклеточного матрикса млекопитающих, обеспечивающие прикрепление бактерий к  $\beta$ -интегринам на поверхности фагоцитов и последующее поглощение бактерий [45].

Известно несколько синтезируемых микробом факторов, необходимых для выживания в макрофагах. Это и ЛПС, имеющий концевой *N*-ацетилглюкозамин в олигосахаридном коре [17] и содержащий модификацию фосфатных групп 4-аминоарабинозой [19], а также общий энтеробактериальный антиген [19]. Выживанию бактерий в макрофагах способствуют и белки, участвующие в прикреплении наружной мембраны к пептидогликану: *OmpA* [3], который у энтеробактерий образует неспецифические диффузионные каналы, и липопротеин Брауна (*Lpp*), способный тормозить апоптоз макрофагов [48]. Отсутствие у *Y. pestis* *Lpp* приводило к снижению экспрессии многих белков, в том числе и белка-шаперона теплового шока *HtrA*, который восстанавливал способность  $\Delta$ *lpp*-мутанта выживать в макрофагах [11]. Выживанию  $\Delta$ *lpp*-мутанта способствовала и протеаза *Pla*, хотя механизм ее действия не связан с активацией продукции *HtrA* [49].

Важным для выживания в макрофагах свойством *Y. pestis* является резистентность к бактерицидному действию фаголизосом, ацидификацию которых бактерии способны тормозить [34]. Какие продукты микроба обеспечивают нейтрализацию кислого pH фаголизосом в настоящее время неизвестно. Защиту бактерий от реактивных соединений азота обеспечивает белок *RipA*, бутирил-КоА-трансфераза, обеспечивающая образование масляной кислоты [44]. От реактивных соединений кислорода бактерии защищает сидерофор *Ybt* [30]. Кроме того, обнаруженная у *Ybt* способность связывать ионы меди [6] обуславливает толерантность бактерий к токсическому действию меди, накапливающейся в местах воспаления и внутри макрофагов. Влияние *Ybt* на внутриклеточное выживание бактерий может быть связано и с тем, что его комплекс с медью проявляет активность супероксид-дисмутазы, трансформирующей наиболее опасные радикалы в менее токсичную форму [7].

Резистентность к бактерицидным факторам макрофагов дает бактериям возможность размножаться в неактивированных макрофагах, вызывая их апоптоз, в то время как в активированных макрофагах на более поздних этапах инфекции бактерии индуцируют воспалительный механизм гибели фагоцитов путем пироптоза [4]. Способность вызывать гибель макрофагов обеспечивает распространение бактерий по лимфатическим сосудам из кожи в дренирующий лимфоузел, где живые бактерии могут наблюдаться уже через 10–60 мин после заражения животных [13, 38]. Сведения о том, каким образом происходит транспорт бактерий в лимфоузлы, противоречивы. Принято считать, что микробы попадают в лимфо-

узел в составе фагоцитов (макрофагов, дендритных клеток, нейтрофилов). Это мнение нашло подтверждение в экспериментах, продемонстрировавших участие в транспорте бактерий моноцитов и дендритных клеток, на поверхности которых присутствует рецептор сфингозин-1-фосфата [43]. Этот же рецептор необходим и для транспорта бактерий в составе этих хозяйских клеток во вторичные лимфоузлы, а его блокирование в фагоцитах приводит к торможению этого процесса и неспособности бактерий к диссеминации из дренирующего лимфоузла. Другие исследователи [12, 13] не получили экспериментального подтверждения того, что после внутрикожного заражения животных бактерии попадают в лимфоузел в составе фагоцитов, а регистрировали бактерии в свободном состоянии в лимфатических сосудах и в самом начале инфицирования дренирующего лимфоузла. Более того, установлено, что после размножения в коже лишь часть бактерий, способная попасть в лимфатические сосуды, транспортируется в дренирующий лимфоузел, и именно попавшие туда бактерии способствуют дальнейшему распространению инфекции [12]. Этими авторами высказана гипотеза, что сниженная адгезивная активность части микробов может способствовать их быстрому выходу из кожи. Для попадания в лимфоузел микробам необходима протеаза Pla, взаимодействующая с факторами коагуляции и фибринолиза в организме хозяина и способствующая диссеминации возбудителя чумы из кожи [22].

*Второй этап инфекционного процесса.* В лимфоузле бактерии *Y. pestis* активно поглощаются макрофагами, в которых происходит интенсивное размножение бактерий и синтез многих факторов вирулентности возбудителя чумы [13]. Во время внутриклеточного размножения в макрофагах бактерии синтезируют ряд анти-фагоцитарных факторов, которые защищают микробы от последующего поглощения фагоцитами (макрофагами, дендритными клетками, нейтрофилами) и обеспечивают дальнейшее внеклеточное существование микроба в организме хозяина [18]. Внутри макрофагов у бактерий индуцируется синтез капсульного антигена CafI, который препятствует попаданию бактерий внутрь фагоцитов за счет экранирования адгезинов (Ail, Pla) на поверхности бактерий. Еще один антиген, который синтезируется при 37 °С и кислом pH в фаголизосомах – PsaA (pH6 антиген), который образует пили на поверхности бактерий и связывает гликофинголипиды, присутствующие на разных типах клеток эукариотов. Хотя PsaA является адгезином и способствует связыванию бактерий с разными клетками хозяина, он обладает антифагоцитарными свойствами за счет связывания липопротеинов хозяина на поверхности бактерий и экранирования других адгезинов (Ail, Pla), необходимых для контакта бактерий с макрофагами.

Находясь внутри макрофагов, бактерии синтезируют компоненты системы секреции третьего типа (ТЗСС), которые многие годы были и остаются объ-

ектом пристального внимания ученых [32, 33]. ТЗСС, кодируемая плазмидой кальций-зависимости (pCD1), состоит из 25 белков, которые образуют подобную шприцу инъектисому, пронизывающую обе мембраны и образующую иглу на поверхности бактерий. На вершине иглы расположен «транслокон», образованный порообразующими белками YopB и YopD и белком LcrV, который регулирует и направляет действие белков ТЗСС, а также взаимодействует с TLR-2 рецептором на поверхности клеток хозяина [2]. Белки ТЗСС представлены структурными белками аппарата секреции (Ysc F, P, N, Q; Yop B, D; LcrV), белками-эффекторами (Yop E, H, T, J, M; YpkA) и регуляторными белками (VirF, YscB, SycN, TyeA и YopN). Сигналом для синтеза этих белков является температура 37 °С и сниженная концентрация кальция внутри фагоцитов. Транслокация эффекторов в цитоплазму клеток хозяина включается после контакта с клетками-мишенями, которыми служат фагоциты. В результате этого происходит модуляция иммунного ответа, блокировка фагоцитоза и гибель клеток хозяина. Токсичность эффекторов связана с их способностью нарушать сигнальные системы (Yop E, H, J, M, T и YpkA), цитоскелет (Yop E, H, T; YpkA) и цитокин-индуцирующую активность фагоцитов (Yop M, J). Одним из механизмов является ферментативная активность эффекторов (тирозин-фосфатазная у YopH и треонин-киназная у YpkA), действующих на белки фагоцитов, активность которых зависит от фосфорилирования. Другой механизм обнаружен у белка YopM, который не обладает ферментативной активностью, но образует внутри клеток хозяина комплексы со многими белками, которые в результате этого не выполняют свои функции [16].

Функционирование ТЗСС зависит от контакта бактерий с клетками-мишенями хозяина. Первичный контакт обеспечивается двумя полифункциональными поверхностными белками-адгезинами: белком Ail и протеазой Pla [18, 27]. Дополнительную роль в адгезии к фагоцитам для реализации антифагоцитарного действия ТЗСС могут играть и белки ауто-транспортеры YopC и YopE [10, 24], и гипотетические фимбрии, гены которых имеются в хромосоме *Y. pestis* [14]. В результате контакта с бактериями на клетках-мишенях формируется пора, через которую в фагоциты впрыскиваются токсичные эффекторные белки. Благодаря белкам, которые действуют на фагоциты извне, а также CafI и PsaA, которые препятствуют контакту бактерий с фагоцитами, не происходит дальнейшего поглощения микробов фагоцитами, и бактерии размножаются внеклеточно.

Размножение бактерий в макрофагах приводит к их разрушению. Является ли разрушение макрофагов пассивным процессом, связанным только с размножением бактерий, или же для этого необходим какой-либо продукт микроба, пока неизвестно. После выхода из макрофагов бактерии переходят от внутриклеточного к внеклеточному образу жизни. Таким образом, в регионарном лимфоузле происходит пе-

реход от фазы внутриклеточного к внеклеточному размножению бактерий, которое преимущественно сохраняется и на последующих этапах инфекции. Основной причиной смены образа жизни бактерий считается то, что после выхода из макрофагов бактерии экипированы антифагоцитарными факторами, защищающими их от поглощения фагоцитами (Caf1, PsaA) и разрушающими макрофаги, нейтрофилы и дендритные клетки (белки-эффекторы Yop).

В лимфоузле бактерии стимулируют синтез значительного количества провоспалительных цитокинов и фибрина, вызывают образование геморрагий, а также тромбоз сосудов и некротические изменения ткани узла. Эти изменения приводят к образованию бубона, более выраженного у крыс, чем у мышей. Какие факторы стимулируют провоспалительную реакцию организма на этом этапе в настоящее время неизвестно. Одним из возможных кандидатов является более токсичный гексаацилированный ЛПС, который синтезируется при низкой температуре в блохах (или при выращивании бактерий *in vitro*), и часть которого может присутствовать у бактерий в лимфоузле. Несмотря на провоспалительный характер второго этапа инфекции, в бубонах наблюдается мало нейтрофилов, количество которых резко возрастает у мутантов, не синтезирующих белок Ail [15]. Что лежит в основе действия этого белка на торможение хемотаксиса нейтрофилов неизвестно. Недавние исследования показали, что торможению миграции в лимфоузлы нейтрофилов способствует белок-эффектор T3SS, YopJ, который подавляет синтез интерлейкина-8 (IL-8), способствующего привлечению и активации нейтрофилов [42].

*Третий этап инфекционного процесса.* Третий этап инфекционного процесса начинается, когда в результате размножения и разрушения макрофагов бактерии из лимфоузла попадают в кровь. При этом резистентность микроба к действию комплемента, которая обеспечивается белками наружной мембраны Ail и Pla, способствует выживанию бактерий в крови. Из крови бактерии быстро фильтруются селезенкой и печенью. Транзитный этап инфекционного процесса в крови животных может быть важен для опсонизации микроба C3/iC3b компонентом комплемента. Недавние исследования показали, что связывание этого компонента белком Ail на поверхности бактерий способствует их адгезии к нейтрофилам [26]. Это определяет выбор бактериями нейтрофилов, на поверхности которых присутствует рецептор комплемента CR3, как основной мишени для инъекции эффекторов T3SS в селезенке.

В селезенке и печени не наблюдается видимых проявлений воспаления: отсутствует инфильтрация фагоцитов и снижен синтез провоспалительных цитокинов. Известную роль в снижении воспалительного ответа играет изменение структуры липида А при 37 °С с преобладанием тетра-ацилированной формы, которая обладает слабой способностью связываться с рецепторным комплексом TLR4/MD2

и стимулировать воспалительную реакцию [20]. Отсутствие инфильтрации провоспалительных клеток в печени и селезенке (активированных макрофагов, дендритных клеток, NK-клеток) также может быть связано с действием белка YopM, который способен попадать в фагоциты как с помощью T3SS, так и самостоятельно [16]. YopM подавляет миграцию провоспалительных дендритных клеток в селезенку, а в печени вызывает апоптоз нейтрофилов и макрофагов [51]. Одной из мишеней действия YopM является цистеиновая протеаза каспаза-1, инактивация которой препятствует созреванию инфламмосомы и освобождению провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и IL-18 [23]. Недавно установлено, что подавление экспрессии этих цитокинов обусловлено кооперативным действием белков YopM и YopJ [35].

Отсутствие воспалительной реакции хозяина во время пребывания *Y. pestis* в селезенке и печени приводит к массивному размножению бактерий. В результате клетки этих органов практически полностью разрушаются и служат питательной средой для бактерий. При этом высвобождается огромное количество микробов, которые попадают в кровь. По-видимому, на этом этапе происходит переход инфекционного процесса из противовоспалительной фазы в провоспалительную, приводящую к развитию инфекционно-токсического шока. Какие молекулярные механизмы лежат в основе этого перехода в настоящее время неизвестно.

*Четвертый, терминальный, этап инфекционного процесса.* На терминальной стадии инфекционного процесса возбудитель чумы попадает в кровь и развивается массивная септицемия ( $10^7$ – $10^8$  м.к./мл), которая необходима для передачи *Y. pestis* блохами следующему животному [8]. При этом наблюдается генерализованная воспалительная реакция организма, сопровождающаяся экстремально высокими концентрациями провоспалительных цитокинов. Молекулярные механизмы, лежащие в основе реализации этого этапа инфекции, исследованы гораздо меньше, чем другие этапы. Ранее многие ученые предполагали, что основной причиной гибели хозяина является дисфункция печени и селезенки, а также выброс большого количества провоспалительных цитокинов в ответ на продукты разрушения клеток хозяина. В настоящее время причиной гибели животных на терминальной фазе инфекционного процесса считается развитие инфекционно-токсического шока, в реализации которого, несомненно, принимают участие и продукты *Y. pestis*. Общеизвестно, что основным токсическим компонентом возбудителя чумы является ЛПС, однако механизм токсического действия ЛПС на терминальной фазе инфекции исследован слабо. Известно, что при температуре тела животных 37 °С ЛПС чумного микроба синтезируется в тетра- и три-ацилированной форме, обладающей слабой цитокин-индуцирующей активностью.

На модели ряда энтеробактерий показано, что компонент наружной мембраны, липопротеин Брауна

(Lpp), обладает синергичным действием с ЛПС при индукции септического шока. О возможном сходном действии этих молекул при чуме свидетельствуют результаты анализа двойных мутантов *Y. pestis*, не синтезирующих Lpp и MsbB, ацилтрансферазу, катализирующую присоединение к ЛПС лауриновой кислоты. Такие двойные мутанты на поздних этапах инфекции (72 ч) индуцировали гораздо меньше провоспалительных цитокинов, чем одиночные мутанты и родительские штаммы [37]. Механизм этого явления пока не ясен. Известно, что снижение при 37 °С количества и/или активности синтезируемого *Y. pestis* MsbB способствует синтезу бактериями малотоксичного гипоацилированного ЛПС, обладающего слабой цитокин-индуцирующей активностью. Вопрос о том, может ли продукция MsbB активироваться в животных на терминальной стадии инфекции и приводить к синтезу гексаацилированного ЛПС, стимулирующего продукцию провоспалительных цитокинов, нуждается в дальнейшем изучении.

Возможный механизм, который позволяет ЛПС из малотоксичной формы, синтезируемой бактериями при 37 °С, переходить в высокотоксичную форму продемонстрирован в ряде работ [1]. В модельных экспериментах с ЛПС, выделенным из выращенных при 37 °С бактерий, установлено, что этот переход связан с изменением конформации ЛПС, которое может происходить как под влиянием гликолипида, имеющегося в селезенке, печени и эритроцитах животных, так и при взаимодействии ЛПС с синтезируемым бактериями мышинным токсином Ymt. Предполагается, что такая активация ЛПС, приводящая к интенсивному синтезу провоспалительных цитокинов, может иметь место на терминальной фазе инфекционного процесса и вызывать токсический шок и гибель животных. Могут ли в процессе активации ЛПС принимать участие и другие компоненты *Y. pestis* (например Ail, Pla), которые связаны с ЛПС в клеточной стенке бактерий, пока неизвестно.

На терминальной фазе инфекции, близкой к гибели животного, септицемия приводит к распространению бактерий по всем органам. Так, у павших, но не у живых, животных бактерии присутствуют не только в лимфоузле, печени и селезенке, но и в тех органах, где их не было на предыдущих этапах (кишечник, легкие, почки) развития бубонной формы чумы [28]. Таким образом, высокая способность бактерий распространяться по вторичным лимфоидным органам способствует быстрому развитию инфекции, приводящему к смертельной септицемии.

Анализ публикаций последних десяти лет свидетельствует о том, что несмотря на интенсивные исследования молекулярных механизмов патогенеза чумы, остается еще много вопросов, особенно касающихся первой и последней фазы инфекционного процесса. Что определяет выбор бактериями макрофагов для внутриклеточного размножения на первом этапе инфекции? Каков механизм выхода бактерий из макрофагов? Что способствует переключению ин-

фекции из противовоспалительной фазы в селезенке и печени в провоспалительную фазу в крови на терминальном этапе инфекционного процесса? Ответы на эти вопросы, несомненно, будут найдены в будущих исследованиях.

**Конфликт интересов.** Автор подтверждает отсутствие конфликта интересов, связанных с написанием данного обзора.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тынянова В.И., Зюзина В.П., Демидова Г.В., Соколова Е.П. Специфичность иммуномодулирующего действия эндотоксина *Yersinia pestis*. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2016; 3:104–12.
2. Abramov V.M., Khlebnikov V.S., Vasiliev A.M., Kosarev I.V., Vasilenko R.N., Kulikova N.L., Khodyakova A.V., Evstigneev V.I., Uversky V.N., Motin V.L., Smirnov G.B., Brubaker R.R. Attachment of LcrV from *Yersinia pestis* at dual binding sites to human TLR-2 and human IFN-gamma receptor. *J. Proteome Res.* 2007; 6:2222–31.
3. Bartra S.S., Gong X., Lorica C.D., Jain C., Nair M.K., Schifferli D., Qian L., Li Z., Plano G.V., Schesser K. The outer membrane protein A (OmpA) of *Yersinia pestis* promotes intracellular survival and virulence in mice. *Microb. Pathog.* 2012; 52(1):41–6. DOI: 10.1016/j.micpath.2011.09.009.
4. Bergsbaken T., Cookson B.T. Macrophage activation redirects *Yersinia*-infected host cell death from apoptosis to caspase-1-dependent pyroptosis. *PLoS Pathog.* 2007; 3(11):e161.
5. Bobrov A.G., Kirillina O., Fetherston J.D., Miller M.C., Burlison J.A., Perry R.D. The *Yersinia pestis* siderophore, yersiniabactin, and the ZnuABC system both contribute to zinc acquisition and the development of lethal septicemic plague in mice. *Mol. Microbiol.* 2014; 93:759–75. DOI: 10.1111/mmi.12693.
6. Chaturvedi K.S., Hung C.S., Crowley J.R., Stapleton A.E., Henderson J.P. The siderophore yersiniabactin binds copper to protect pathogens during infection. *Nat. Chem. Biol.* 2012; 8:731–6. DOI: 10.1038/nchembio.
7. Chaturvedi K.S., Hung C.S., Giblin D.E., Urushidani S., Austin A.M., Dinauer M.C., Henderson J.P. Cupric yersiniabactin is a virulence-associated superoxide dismutase mimic. *ACS Chem. Biol.* 2014; 9:551–6. DOI: 10.1021/cb400658k.
8. Chouikha I., Hinnebusch B.J. *Yersinia*-flea interactions and the evolution of the arthropod-borne transmission route of plague. *Curr. Opin. Microbiol.* 2012; 15(3):239–46. DOI: 10.1016/j.mib.2012.02.003.
9. Eren E., van den Berg B. Structural basis for activation of an integral membrane protease by lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(28):23971–76. DOI: 10.1074/jbc.M112.376418.
10. Felek S., Lawrenz M.B., Krukons E.S. The *Yersinia pestis* autotransporter YapC mediates host cell binding, autoaggregation and biofilm formation. *Microbiology.* 2008; 154(6):1802–12. DOI: 10.1099/mic.0.2007/010918-0.
11. Galindo C.L., Sha J., Moen S.T., Agar S.L., Kirtley M.L., Foltz S.M., McIver L.J., Kozlova E.V., Garner H.R., Chopra A.K. Comparative global gene expression profiles of wild-type *Yersinia pestis* CO2 and its braun lipoprotein mutant at flea and human body temperatures. *Comp. Funct. Genomics.* 2010; 342168. DOI:10.1155/2010/342168.
12. Gonzalez R.J., Miller V.L. A Deadly path: bacterial spread during bubonic plague. *Trends Microbiol.* 2016; 24(4):239–41. DOI:10.1016/j.tim.2016.01.010.
13. Gonzalez R.J., Lane M.C., Wagner N.J., Weening E.H., Miller V.L. Dissemination of a highly virulent pathogen: tracking the early events that define infection. *PLoS Pathog.* 2015; 11(1):e1004587. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004587. eCollection 2015.
14. Hatkoff M., Runco L.M., Pujol C., Jayatilaka I., Furie M.B., Bliska J.B., Thanassi D.G. Roles of chaperone/usher pathways of *Yersinia pestis* in a murine model of plague and adhesion to host cells. *Infect. Immun.* 2012; 80(10):3490–500. DOI: 10.1128/IAI.00434-12.
15. Hinnebusch B.J., Jarrett C.O., Callison J.A., Gardner D., Buchanan S.K., Plano G.V. Role of the *Yersinia pestis* Ail protein in preventing a protective polymorphonuclear leukocyte response during bubonic plague. *Infect. Immun.* 2011; 79(12):4984–89. DOI: 10.1128/IAI.05307-11.
16. Höfling S., Grabowski B., Norkowski S., Schmidt M.A., Rüter C. Current activities of the *Yersinia* effector protein YopM. *Int. J. Med. Microbiol.* 2015; 305(3):424–32. DOI: 10.1016/j.ijmm.2015.03.009.
17. Houppert A.S., Bohman L., Merritt P.M., Cole C.B., Caulfield A.J., Latham W.W., Marketon M.M. RfaL is required for

- Yersinia pestis* type III secretion and virulence. *Infect. Immun.* 2013; 81(4):1186–97. DOI: 10.1128/IAI.01417-12.
18. Ke Y., Chen Z., Yang R. *Yersinia pestis*: mechanisms of entry into and resistance to the host cell. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013; 3:106. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00106. eCollection 2013.
19. Klein K.A., Fukuto H.S., Pelletier M., Romanov G., Grabenstein J.P., Palmer L.E., Ernst R., Bliska J.B. A transposon site hybridization screen identifies galU and wecBC as important for survival of *Yersinia pestis* in murine macrophages. *J. Bacteriol.* 2012; 194(3):653–62. DOI: 10.1128/JB.06237-11.
20. Knirel Y.A., Anisimov A.P. Lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*, the cause of plague: structure, genetics, biological properties. *Acta Naturae.* 2012; 4:46–58.
21. Kolodziejek A.M., Hovde C.J., Minnich S.A. *Yersinia pestis* Ail: multiple roles of a single protein. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2012; 2:103. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00103. eCollection 2012.
22. Korhonen T.K., Haiko J., Laakkonen L., Jarvinen H.M., Westerlund-Wikstrom B. Fibrinolytic and coagulative activities of *Yersinia pestis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013; 3:35. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00035. eCollection 2013.
23. LaRock C.N., Cookson B.T. The *Yersinia* virulence effector YopM binds caspase-1 to arrest inflammasome assembly and processing. *Cell Host Microbe.* 2012; 12(6):799–805. DOI: 10.1016/j.chom.2012.10.020.
24. Lawrenz M.B., Lenz J.D., Miller V.L. A novel autotransporter adhesin is required for efficient colonization during bubonic plague. *Infect. Immun.* 2009; 77(1):317–26. DOI: 10.1128/IAI.01206-08.
25. Lawrenz M.B., Pennington J., Miller V.L. Acquisition of ompTin reveals cryptic virulence function of autotransporter YapE in *Yersinia pestis*. *Mol. Microbiol.* 2013; 89(2):276–87. DOI: 10.1111/mmi.12273.
26. Merritt P.M., Nero T., Bohman L., Felek S., Krukonsis E.S., Marketon M.M. *Yersinia pestis* targets neutrophils via complement receptor 3. *Cell. Microbiol.* 2015; 17(5):666–87. DOI: 10.1111/cmi.12391.
27. Mikula K.M., Kolodziejczyk R., Goldman A. *Yersinia* infection tools – characterization of structure and function of adhesins. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013; 2:169. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00169. eCollection 2012.
28. Nham T., Filali S., Danne C., Derbise A., Carniel E. Imaging of bubonic plague dynamics by *in vivo* tracking of bioluminescent *Yersinia pestis*. *PLoS ONE.* 2012; 7(4):e34714. DOI: 10.1371/journal.pone.0034714.
29. O'Loughlin J.L., Spinner J.L., Minnich S.A., Kobayashi S.D. *Yersinia pestis* two-component gene regulatory systems promote survival in human neutrophils. *Infect. Immun.* 2010; 78(2):773–82. DOI: 10.1128/IAI.00718-09.
30. Paauw A., Leverstein-van Hall M.A., van Kessel K.P.M., Verhoef J., Fluit A.C. Yersiniabactin reduces the respiratory oxidative stress response of innate immune cells. *PLoS ONE.* 2009; 4(12):e8240. DOI: 10.1371/journal.pone.0008240.
31. Perry R., Fetherston J. Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. *Microbes Infect.* 2011; 13(10):808–17. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.04.008.
32. Pha K., Navarro L. *Yersinia* type III effectors perturb host innate immune responses. *World J. Biol. Chem.* 2016; 7(1):1–13. DOI: 10.4331/wjbc.v7.i1.1.
33. Plano G.V., Schesser K. The *Yersinia pestis* type III secretion system: expression, assembly and role in the evasion of host defenses. *Immunol. Res.* 2013; 57(1–3):237–45. DOI: 10.1007/s12026-013-8454-3.
34. Pujol C., Klein K.A., Romanov G.A., Palmer L.E., Cirotta C., Zhao Z., Bliska J.B. *Yersinia pestis* can reside in autophagosomes and avoid xenophagy in murine macrophages by preventing vacuole acidification. *Infect. Immun.* 2009; 77(6):2251–61. DOI: 10.1128/IAI.00068-09.
35. Ratner D., Orning M.P., Starheim K.K., Marty-Roix R., Proulx M.K., Goguen J.D., Lien E. Manipulation of interleukin-1 $\beta$  and interleukin-18 production by *Yersinia pestis* effectors YopJ and YopM and redundant impact on virulence. *J. Biol. Chem.* 2016; 291(19):9894–905. DOI: 10.1074/jbc.M115.697698.
36. Sebbane F., Jarrett C., Gardner D., Long D., Hinnebusch B.J. The *Yersinia pestis* caf1M1A1 fibrillar capsule operon promotes transmission by flea bite in a mouse model of bubonic plague. *Infect. Immun.* 2009; 77(3):1222–29. DOI: 10.1128/IAI.00950-08.
37. Sha J., Kirtley M.L., van Lier C.J., Wang S., Erova T.E., Kozlova E.V., Cao A., Cong Y., Fitts E.C., Rosenzweig J.A., Chopra A.K. Deletion of the Braun lipoprotein-encoding gene and altering the function of lipopolysaccharide attenuate the plague bacterium. *Infect. Immun.* 2013; 81(3):815–28. DOI: 10.1128/IAI.01067-12.
38. Shannon J.G., Bosio C.F., Hinnebusch B.J. Dermal neutrophil, macrophage and dendritic cell responses to *Yersinia pestis* transmitted by fleas. *PLoS Pathog.* 2015; 11(3):e1004734. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004734.
39. Shannon J.G., Hasenkrug A.M., Dorward D.W., Nair V., Carmody A.B., Hinnebusch B.J. *Yersinia pestis* subverts the dermal neutrophil response in a mouse model of bubonic plague. *mBio.* 2013; 4(5):e00170–13. DOI: 10.1128/mBio.00170-13.
40. Spinner J.L., Winfree S., Starr T., Shannon J.G., Nair V., Steele-Mortimer O., Hinnebusch B.J. *Yersinia pestis* survival and replication within human neutrophil phagosomes and uptake of infected neutrophils by macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 2014; 95(3):389–98. DOI: 10.1189/jlb.1112551.
41. Spinner J.L., Carmody A.B., Jarrett C.O., Hinnebusch B.J. Role of *Yersinia pestis* toxin complex family proteins in resistance to phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 2013; 81(11):4041–52. DOI: 10.1128/IAI.00648-13.
42. Spinner J.L., Hasenkrug A.M., Shannon J.G., Kobayashi S.D., Hinnebusch B.J. Role of the *Yersinia* YopJ protein in suppressing interleukin-8 secretion by human polymorphonuclear leukocytes. *Microbes Infect.* 2016; 18(1):21–9. DOI: 10.1016/j.micinf.2015.08.015.
43. St John A.L., Ang W.X., Huang M.N., Kunder C.A., Chan E.W., Gunn M.D., Abraham S.N. S1P-Dependent trafficking of intracellular *Yersinia pestis* through lymph nodes establishes Buboes and systemic infection. *Immunity.* 2014; 41(3):440–50. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.07.013.
44. Torres R., Lan B., Latif Y., Chim N., Goulding C.W. Structural snapshots along the reaction pathway of *Yersinia pestis* RipA, a putative butyryl-CoA transferase. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2014; 70(4):1074–85. DOI: 10.1107/S1399004714000911.
45. Tsang T.M., Felek S., Krukonsis E.S. Ail binding to fibronectin facilitates *Yersinia pestis* binding to host cells and Yop delivery. *Infect. Immun.* 2010; 78(8):3358–68. DOI: 10.1128/IAI.00238-10.
46. Uittenbogaard A.M., Myers-Morales T., Gorman A.A., Welsh E., Wulff C., Hinnebusch B.J., Korhonen T.K., Straley S.C. Temperature-dependence of yadBC phenotypes in *Yersinia pestis*. *Microbiolgy.* 2014; 160(2):396–405. DOI: 10.1099/mic.0.073205-0.
47. Vadyvaloo V., Jarrett C., Sturdevant D.E., Sebbane F., Hinnebusch B.J. Transit through the flea vector induces a pretransmission innate immunity resistance phenotype in *Yersinia pestis*. *PLoS Pathog.* 2010; 6(2):e1000783. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000783.
48. van Lier C.J., Sha J., Kirtley M.L., Cao A., Tiner B.L., Erova T.E., Cong Y., Kozlova E.V., Popov V.L., Baze W.B., Chopra A.K. Deletion of Braun lipoprotein and plasminogen-activating protease-encoding genes attenuates *Yersinia pestis* in mouse models of bubonic and pneumonic plague. *Infect. Immun.* 2014; 82(6):2485–503. DOI: 10.1128/IAI.01595-13.
49. van Lier C.J., Tiner B.L., Chauhan S., Motin V.L., Fitts E.C., Huante M.B., Endsley J.J., Ponnusamy D., Sha J., Chopra A.K. Further characterization of a highly attenuated *Yersinia pestis* CO92 mutant deleted for the genes encoding Braun lipoprotein and plasminogen activator protease in murine alveolar and primary human macrophages. *Microb. Pathog.* 2015; 80:27–38. DOI: 10.1016/j.micpath.2015.02.005.
50. Vetter S.M., Eisen R.J., Schotthoefer A.M., Monteneri J.A., Holmes J.L., Bobrov A.G., Bearden S.W., Perry R.D., Gage K.L. Biofilm formation is not required for early-phase transmission of *Yersinia pestis*. *Microbiology.* 2010; 56(7):2216–25. DOI: 10.1099/mic.0.037952-0.
51. Ye Z., Gorm A.A., Uittenbogaard A.M., Myers-Morales T., Kaplan A.M., Cohen D.A., Straley S.C. Caspase-3 mediates the pathogenic effect of *Yersinia pestis* YopM in liver of C57BL/6 mice and contributes to YopM's function in spleen. *PLoS ONE.* 2014; 9(11):e110956. DOI: 10.1371/journal.pone.0110956. eCollection 2014.
52. Zhang S., Park C.G., Zhang P., Bartra S.S., Plano G.V., Klens J.D., Skurnik M., Hinnebusch B.J., Chen T. The plasminogen activator Pla of *Yersinia pestis* utilizes murine DEC-205 (CD205) as a receptor to promote dissemination. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(46):31511–21. DOI: 10.1074/jbc.M804646200.

## References

1. Tynyanova V.I., Zyuzina V.P., Demidova G.V., Sokolova E.P. [Specificity of immune-modulating effect of *Yersinia pestis* endotoxin]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2016; 3:104–12.
2. Abramov V.M., Khlebnikov V.S., Vasiliev A.M., Kosarev I.V., Vasilenko R.N., Kulikova N.L., Khodyakova A.V., Evstigneev V.I., Uversky V.N., Motin V.L., Smirnov G.B., Brubaker R.R. Attachment of LcrV from *Yersinia pestis* at dual binding sites to human TLR-2 and human IFN-gamma receptor. *J. Proteome Res.* 2007; 6:2222–31.
3. Bartra S.S., Gong X., Lorica C.D., Jain C., Nair M.K., Schifferli D., Qian L., Li Z., Plano G.V., Schesser K. The outer membrane protein A (OmpA) of *Yersinia pestis* promotes intracellular survival and virulence in mice. *Microb. Pathog.* 2012; 52(1):41–6. DOI: 10.1016/j.micpath.2011.09.009.
4. Bergsbaken T., Cookson B.T. Macrophage activation redirects *Yersinia*-infected host cell death from apoptosis to caspase-1-dependent pyroptosis. *PLoS Pathog.* 2007; 3(11):e161.
5. Bobrov A.G., Kirillina O., Fetherston J.D., Miller M.C., Burlison J.A., Perry R.D. The *Yersinia pestis* siderophore, yersiniabactin, and the ZnuABC system both contribute to zinc acquisition and the development of lethal septicemic plague in mice. *Mol. Microbiol.* 2014; 93:759–75. DOI: 10.1111/mmi.12693.

6. Chaturvedi K.S., Hung C.S., Crowley J.R., Stapleton A.E., Henderson J.P. The siderophore yersiniabactin binds copper to protect pathogens during infection. *Nat. Chem. Biol.* 2012; 8:731–6. DOI: 10.1038/nchembio.
7. Chaturvedi K.S., Hung C.S., Giblin D.E., Urushidani S., Austin A.M., Dinauer M.C., Henderson J.P. Cupric yersiniabactin is a virulence-associated superoxide dismutase mimic. *ACS Chem. Biol.* 2014; 9:551–6. DOI: 10.1021/cb400658k.
8. Chouikha I., Hinnebusch B.J. *Yersinia*-flea interactions and the evolution of the arthropod-borne transmission route of plague. *Curr. Opin. Microbiol.* 2012; 15(3):239–46. DOI: 10.1016/j.mib.2012.02.003.
9. Eren E., van den Berg B. Structural basis for activation of an integral membrane protease by lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(28):23971–76. DOI: 10.1074/jbc.M112.376418.
10. Felek S., Lawrenz M.B., Krukoni E.S. The *Yersinia pestis* autotransporter YopC mediates host cell binding, autoaggregation and biofilm formation. *Microbiology*. 2008; 154(6):1802–12. DOI: 10.1099/mic.0.2007/010918-0.
11. Galindo C.L., Sha J., Moen S.T., Agar S.L., Kirtley M.L., Foltz S.M., McIver L.J., Kozlova E.V., Garner H.R., Chopra A.K. Comparative global gene expression profiles of wild-type *Yersinia pestis* CO92 and its braun lipoprotein mutant at flea and human body temperatures. *Comp. Funct. Genomics*. 2010; 342168. DOI: 10.1155/2010/342168.
12. Gonzalez R.J., Miller V.L. A Deadly path: bacterial spread during bubonic plague. *Trends Microbiol.* 2016; 24(4):239–41. DOI: 10.1016/j.tim.2016.01.010.
13. Gonzalez R.J., Lane M.C., Wagner N.J., Weening E.H., Miller V.L. Dissemination of a highly virulent pathogen: tracking the early events that define infection. *PLoS Pathog.* 2015; 11(1):e1004587. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004587. eCollection 2015.
14. Hatkoff M., Runco L.M., Pujol C., Jayatilaka I., Furie M.B., Bliska J.B., Thanassi D.G. Roles of chaperone/usher pathways of *Yersinia pestis* in a murine model of plague and adhesion to host cells. *Infect. Immun.* 2012; 80(10):3490–500. DOI: 10.1128/IAI.00434-12.
15. Hinnebusch B.J., Jarrett C.O., Callison J.A., Gardner D., Buchanan S.K., Plano G.V. Role of the *Yersinia pestis* Ail protein in preventing a protective polymorphonuclear leukocyte response during bubonic plague. *Infect. Immun.* 2011; 79(12):4984–89. DOI: 10.1128/IAI.05307-11.
16. Höfling S., Grabowski B., Norkowski S., Schmidt M.A., Rüter C. Current activities of the *Yersinia* effector protein YopM. *Int. J. Med. Microbiol.* 2015; 305(3):424–32. DOI: 10.1016/j.ijmm.2015.03.009.
17. Houppert A.S., Bohman L., Merritt P.M., Cole C.B., Caulfield A.J., Latham W.W., Marketon M.M. RfaL is required for *Yersinia pestis* type III secretion and virulence. *Infect. Immun.* 2013; 81(4):1186–97. DOI: 10.1128/IAI.01417-12.
18. Ke Y., Chen Z., Yang R. *Yersinia pestis*: mechanisms of entry into and resistance to the host cell. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013; 3:106. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00106. eCollection 2013.
19. Klein K.A., Fukuto H.S., Pelletier M., Romanov G., Grabenstein J.P., Palmer L.E., Ernst R., Bliska J.B. A transposon site hybridization screen identifies galU and wecBC as important for survival of *Yersinia pestis* in murine macrophages. *J. Bacteriol.* 2012; 194(3):653–62. DOI: 10.1128/JB.06237-11.
20. Klinkner Y.A., Anisimov A.P. Lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*, the cause of plague: structure, genetics, biological properties. *Acta Naturae*. 2012; 4:46–58.
21. Kolodziejek A.M., Hovde C.J., Minnich S.A. *Yersinia pestis* Ail: multiple roles of a single protein. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2012; 2:103. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00103. eCollection 2012.
22. Korhonen T.K., Haiko J., Laakkonen L., Jarvinen H.M., Westerlund-Wikstrom B. Fibrinolytic and coagulative activities of *Yersinia pestis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013; 3:35. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00035. eCollection 2013.
23. LaRock C.N., Cookson B.T. The *Yersinia* virulence effector YopM binds caspase-1 to arrest inflammasome assembly and processing. *Cell Host Microbe*. 2012; 12(6):799–805. DOI: 10.1016/j.chom.2012.10.020.
24. Lawrenz M.B., Lenz J.D., Miller V.L. A novel autotransporter adhesin is required for efficient colonization during bubonic plague. *Infect. Immun.* 2009; 77(1):317–26. DOI: 10.1128/IAI.01206-08.
25. Lawrenz M.B., Pennington J., Miller V.L. Acquisition of omptin reveals cryptic virulence function of autotransporter YopE in *Yersinia pestis*. *Mol. Microbiol.* 2013; 89(2):276–87. DOI: 10.1111/mmi.12273.
26. Merritt P.M., Nero T., Bohman L., Felek S., Krukoni E.S., Marketon M.M. *Yersinia pestis* targets neutrophils via complement receptor 3. *Cell. Microbiol.* 2015; 17(5):666–87. DOI: 10.1111/cmi.12391.
27. Mikula K.M., Kolodziejczyk R., Goldman A. *Yersinia* infection tools – characterization of structure and function of adhesins. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013; 2:169. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00169. eCollection 2012.
28. Nham T., Filali S., Danne C., Derbise A., Carniel E. Imaging of bubonic plague dynamics by *in vivo* tracking of bioluminescent *Yersinia pestis*. *PLoS ONE*. 2012; 7(4):e34714. DOI: 10.1371/journal.pone.0034714.
29. O'Loughlin J.L., Spinner J.L., Minnich S.A., Kobayashi S.D. *Yersinia pestis* two-component gene regulatory systems promote survival in human neutrophils. *Infect. Immun.* 2010; 78(2):773–82. DOI: 10.1128/IAI.00718-09.
30. Paauw A., Leverstein-van Hall M.A., van Kessel K.P.M., Verhoef J., Fluit A.C. Yersiniabactin reduces the respiratory oxidative stress response of innate immune cells. *PLoS ONE*. 2009; 4(12):e8240. DOI: 10.1371/journal.pone.0008240.
31. Perry R., Fetherston J. Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. *Microbes Infect.* 2011; 13(10):808–17. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.04.008.
32. Pha K., Navarro L. *Yersinia* type III effectors perturb host innate immune responses. *World J. Biol. Chem.* 2016; 7(1):1–13. DOI: 10.4331/wjbc.v7.i1.1.
33. Plano G.V., Schesser K. The *Yersinia pestis* type III secretion system: expression, assembly and role in the evasion of host defenses. *Immunol. Res.* 2013; 57(1–3):237–45. DOI: 10.1007/s12026-013-8454-3.
34. Pujol C., Klein K.A., Romanov G.A., Palmer L.E., Ciota C., Zhao Z., Bliska J.B. *Yersinia pestis* can reside in autophagosomes and avoid xenophagy in murine macrophages by preventing vacuole acidification. *Infect. Immun.* 2009; 77(6):2251–61. DOI: 10.1128/IAI.00068-09.
35. Ratner D., Orning M.P., Starheim K.K., Marty-Roix R., Proulx M.K., Goguen J.D., Lien E. Manipulation of interleukin-1 $\beta$  and interleukin-18 production by *Yersinia pestis* effectors YopJ and YopM and redundant impact on virulence. *J. Biol. Chem.* 2016; 291(19):9894–905. DOI: 10.1074/jbc.M115.697698.
36. Sebbane F., Jarrett C., Gardner D., Long D., Hinnebusch B.J. The *Yersinia pestis* caf1M1A1 fimbrial capsule operon promotes transmission by flea bite in a mouse model of bubonic plague. *Infect. Immun.* 2009; 77(3):1222–29. DOI: 10.1128/IAI.00950-08.
37. Sha J., Kirtley M.L., van Lier C.J., Wang S., Erova T.E., Kozlova E.V., Cao A., Cong Y., Fitts E.C., Rosenzweig J.A., Chopra A.K. Deletion of the Braun lipoprotein-encoding gene and altering the function of lipopolysaccharide attenuate the plague bacterium. *Infect. Immun.* 2013; 81(3):815–28. DOI: 10.1128/IAI.01067-12.
38. Shannon J.G., Bosio C.F., Hinnebusch B.J. Dermal neutrophil, macrophage and dendritic cell responses to *Yersinia pestis* transmitted by fleas. *PLoS Pathog.* 2015; 11(3):e1004734. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004734.
39. Shannon J.G., Hasenkrug A.M., Dorward D.W., Nair V., Carmody A.B., Hinnebusch B.J. *Yersinia pestis* subverts the dermal neutrophil response in a mouse model of bubonic plague. *mBio*. 2013; 4(5):e00170–13. DOI: 10.1128/mBio.00170-13.
40. Spinner J.L., Winfree S., Starr T., Shannon J.G., Nair V., Steele-Mortimer O., Hinnebusch B.J. *Yersinia pestis* survival and replication within human neutrophil phagosomes and uptake of infected neutrophils by macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 2014; 95(3):389–98. DOI: 10.1189/jlb.1112551.
41. Spinner J.L., Carmody A.B., Jarrett C.O., Hinnebusch B.J. Role of *Yersinia pestis* toxin complex family proteins in resistance to phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.* 2013; 81(11):4041–52. DOI: 10.1128/IAI.00648-13.
42. Spinner J.L., Hasenkrug A.M., Shannon J.G., Kobayashi S.D., Hinnebusch B.J. Role of the *Yersinia* YopJ protein in suppressing interleukin-8 secretion by human polymorphonuclear leukocytes. *Microbes Infect.* 2016; 18(1):21–9. DOI: 10.1016/j.micinf.2015.08.015.
43. St John A.L., Ang W.X., Huang M.N., Kunder C.A., Chan E.W., Gunn M.D., Abraham S.N. S1P-Dependent trafficking of intracellular *Yersinia pestis* through lymph nodes establishes Buboes and systemic infection. *Immunity*. 2014; 41(3):440–50. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.07.013.
44. Torres R., Lan B., Latif Y., Chim N., Goulding C.W. Structural snapshots along the reaction pathway of *Yersinia pestis* RipA, a putative butyryl-CoA transferase. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 2014; 70(4):1074–85. DOI: 10.1107/S1399004714000911.
45. Tsang T.M., Felek S., Krukoni E.S. Ail binding to fibronectin facilitates *Yersinia pestis* binding to host cells and Yop delivery. *Infect. Immun.* 2010; 78(8):3358–68. DOI: 10.1128/IAI.00238-10.
46. Uittenbogaard A.M., Myers-Morales T., Gorman A.A., Welsh E., Wulff C., Hinnebusch B.J., Korhonen T.K., Straley S.C. Temperature-dependence of yadBC phenotypes in *Yersinia pestis*. *Microbiol. J.* 2014; 160(2):396–405. DOI: 10.1099/mic.0.073205-0.
47. Vadyvaloo V., Jarrett C., Sturdevant D.E., Sebbane F., Hinnebusch B.J. Transit through the flea vector induces a pretransmission innate immunity resistance phenotype in *Yersinia pestis*. *PLoS Pathog.* 2010; 6(2):e1000783. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000783.
48. van Lier C.J., Sha J., Kirtley M.L., Cao A., Tiner B.L., Erova T.E., Cong Y., Kozlova E.V., Popov V.L., Baze W.B., Chopra A.K. Deletion of Braun lipoprotein and plasminogen-activating protease-encoding genes attenuates *Yersinia pestis* in mouse models of bubonic and pneumonic plague. *Infect. Immun.* 2014; 82(6):2485–503. DOI: 10.1128/IAI.01595-13.
49. van Lier C.J., Tiner B.L., Chauhan S., Motin V.L., Fitts E.C., Huante M.B., Endsley J.J., Ponnusamy D., Sha J., Chopra A.K. Further characterization of a highly attenuated *Yersinia pestis* CO92 mutant deleted for the genes encoding Braun lipoprotein and plasminogen activator protease in murine alveolar and primary human macrophages. *Microb. Pathog.* 2015; 80:27–38. DOI: 10.1016/j.micpath.2015.02.005.
50. Vetter S.M., Eisen R.J., Schotthoefner A.M., Monteneri J.A., Holmes J.L., Bobrov A.G., Bearden S.W., Perry R.D., Gage K.L. Biofilm formation is not required for early-phase transmission of *Yersinia pestis*. *Microbiology*. 2010; 56(7):2216–25. DOI: 10.1099/mic.0.037952-0.
51. Ye Z., Gorm A.A., Uittenbogaard A.M., Myers-Morales T., Kaplan A.M., Cohen D.A., Straley S.C. Caspase-3 mediates the pathogenic effect of *Yersinia pestis* YopM in liver of C57BL/6 mice and contributes to YopM's function in spleen. *PLoS ONE*. 2014; 9(11):e110956. DOI: 10.1371/journal.pone.0110956. eCollection 2014.
52. Zhang S., Park C.G., Zhang P., Bartra S.S., Plano G.V., Klena J.D., Skurnik M., Hinnebusch B.J., Chen T. The plasminogen activator Pla of *Yersinia pestis* utilizes murine DEC-205 (CD205) as a receptor to promote dissemination. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(46):31511–21. DOI: 10.1074/jbc.M804646200.

#### Authors:

Podladchikova O.N. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aanet.ru.

#### Об авторах:

Подладошкова О.Н. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aanet.ru.

Получила 14.06.17.

Л.П.Базанова, Е.Г.Токмакова, Г.А.Воронова, С.В.Балахонов, Т.И.Иннокентьева

## ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОТНОШЕНИЙ БЛОХИ *CITELLOPHILUS TESQUORUM ALTAICUS* (IOFF, 1936) И *YERSINIA PESTIS* С РАЗЛИЧНЫМ ПЛАЗМИДНЫМ СОСТАВОМ

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

**Цель исследований.** Изучение в эксперименте влияния штаммов *Yersinia pestis* с различным плазмидным составом на алиментарную активность и смертность *Citellophilus tesquorum altaicus*, частоту и динамику формирования биопленки в их организме. **Материалы и методы.** В опытах с *C. tesquorum altaicus* использованы штаммы: вирулентные трехплазмидный И-3230, изолированный в Монголии, и референтный для Тувинского очага И-2638, имеющий четыре плазмиды (pYT, pYV, pYP, pTP 33), а также селекционированный от него авирулентный изогенный клон И-3480, утративший две плазмиды (pYV, pYP). **Результаты и выводы.** Установлено, что штаммы И-2638 и И-3480, несущие плазмиду pTP33, более активно формировали биопленку в организме блох, а смертность была выше среди насекомых, инфицированных штаммом И-3230. Четырехплазмидный штамм И-2638 по всем исследуемым показателям превосходил трехплазмидный И-3230 и двухплазмидный И-3480, что может свидетельствовать о коадаптации возбудителя чумы и *C. tesquorum altaicus* из Тувинского очага и возможности функциональной роли плазмиды pTP33 в усилении формирования биопленки *in vivo*.

**Ключевые слова:** блоха *Citellophilus tesquorum altaicus*, *Yersinia pestis*, плазмиды, биопленка *in vivo*.

Корреспондирующий автор: Базанова Любовь Петровна, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

L.P.Bazanova, E.G.Tokmakova, G.A.Voronova, S.V.Balakhonov, T.I.Innokent'eva

## Peculiarities of Interaction between *Citellophilus tesquorum altaicus* (Ioff, 1936) Flea and *Yersinia pestis* with Various Plasmid Composition

Irkutsk Research Anti-Plague Institute, Irkutsk, Russian Federation

**Objective** of the study is *in vitro* investigation of mutual relations between *Citellophilus tesquorum altaicus* and *Yersinia pestis* with various plasmid composition: influence of the strain on flea alimentary activity and mortality rate, frequency and dynamics of biofilm formation. **Materials and methods.** *C. tesquorum altaicus* were infected by three *Yersinia pestis* strains: virulent triple-plasmid I-3230 isolated in Mongolia, referential for the Tuva focus I-2638 carrying four plasmids (pYT, pYV, pYP, pTP 33) and also selected from it avirulent isogenic clone I-3480 that lost two plasmids (pYV, pYP). Peculiarities of interaction between fleas and *Y. pestis* strains were estimated through the lens of specimens with «conglomerates» and «blocks» for feeding, the period from infection prior to the beginning of conglomerates' formation, alimentary activity, and mortality rate of the infected fleas. **Results and conclusions.** It was revealed that alimentary activity of the infected insects was higher than that of the control group, and the highest – in fleas infected with I-2638 strain. Greater numbers of dead fleas at feeding was noted in specimens inoculated with I-3230 strain. Predominant significance of I-2638 strain was established in *C. tesquorum altaicus* biofilm formation both as «conglomerates» and «blocks». I-3480 strain also formed the conglomerates in fleas more actively than I-3230 lacking pTP33 plasmid. Thus, four-plasmid I-2638 strain surpassed triple-plasmid I-3230 and two-plasmid I-3480 strains in reference to all tested indicators except flea mortality rates. It may testify to co-adaptation of *Y. pestis* and *C. tesquorum altaicus* from the Tuva plague focus and to the possibility of a pTP33 functional role in enhancement of a biofilm formation *in vivo*.

**Key words:** *Citellophilus tesquorum altaicus* flea, *Yersinia pestis*, plasmid, *in vivo* biofilm.

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

Corresponding author: Lubov P. Bazanova, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Citation: Bazanova L.P., Tokmakova E.G., Voronova G.A., Balakhonov S.V., Innokent'eva T.I. Peculiarities of Interaction between *Citellophilus tesquorum altaicus* (Ioff, 1936) Flea and *Yersinia pestis* with Various Plasmid Composition. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:41–44. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-41-44

Специфичная блоха длиннохвостого суслика (*Spermophilus undulatus*) – *Citellophilus tesquorum altaicus* (Ioff, 1936) – является не только основным переносчиком возбудителя чумы в Тувинском природном очаге во время активизации эпизоотического процесса, но и его хранителем в межэпизоотический сезон [2, 3]. Циркулирующий в очаге возбудитель по своим морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам относится к основному подвиду *Yersinia pestis* subsp. *pestis* и имеет высокую

вирулентность [2]. Уникальной особенностью тувинских штаммов является наличие в геноме дополнительной четвертой плазмиды pTP33 с молекулярной массой 22 МДа (~33 тыс. п.н.). Полная нуклеотидная последовательность четвертой маркерной плазмиды, специфической для тувинских штаммов, определена, но ее функциональная роль только предполагается [1, 6]. Значение отдельных плазмид, детерминирующих основные факторы вирулентности возбудителя чумы для его существования в блохе-

переносчике, оценивалось на *Xenopsylla cheopis* [4, 8] и *Frontopsylla luculenta* [7].

Цель данной работы – изучить в эксперименте особенности взаимоотношений *C. tesquorum altaicus* и *Y. pestis* с различным плазмидным составом, оценить влияние штаммов на алиментарную активность, смертность блох и динамику формирования биопленки.

### Материалы и методы

Опыты проведены на базе Иркутского научно-исследовательского противочумного института с лабораторной культурой блох *C. tesquorum altaicus*, началом которой послужили насекомые из Каргинской популяции Тувинского природного очага чумы. Эктопаразитов инфицировали тремя штаммами *Y. pestis*: вирулентными трехплазмидным штаммом И-3230, изолированным в Монголии (Хэнтейский аймак, Омнодэлгэр сомон), и референтным для Тувинского очага штаммом И-2638, имеющим четыре плазмиды (pYT, pYV, pYP, pTP 33), а также селекционированным от него авирулентным изогенным клоном И-3480, утратившим две плазмиды (pYV, pYP). Заражение, содержание и кормление инфицированных блох проведено аналогично опыту с *F. luculenta* [7]. Исходная зараженность насекомых для штаммов И-3230 и И-3480 составила 90 %, для штамма И-2638 – 100 %. Опыт продолжительностью 37 дней поставлен в осенне-зимний период. Проведено по 8 подкормок инфицированных и незараженных (контрольная группа) эктопаразитов, использована 441 блоха (272 ♀ и 169 ♂). Особенности взаимоотношений блох со штаммами возбудителя оценивали по доле особей с бактериальными «глыбками», полными и частичными блоками за подкормку, периоду от заражающего кормления до начала их формирования. Алиментарную активность определяли по доле пивших имаго от числа живых, а смертность – по доле мертвых от общего их количества при каждой подкормке. Статистическую обработку провели общепринятыми методами [5] с применением программы «Excel». Влияние различных факторов (штамм *Y. pestis*, пол блох) на изучаемые показатели оценивали с помощью одно- и двухфакторного дисперсионных анализов.

### Результаты и обсуждение

Однофакторный дисперсионный анализ показал влияние зараженности блох возбудителем чумы на активность их кровососания ( $F=4,84$ ;  $P<0,01$ ). Доля пивших за подкормку инфицированных насекомых во всех трех случаях была выше, чем в контрольной группе, при этом – наиболее высокой у эктопаразитов, зараженных штаммом И-2638 (табл. 1).

Достоверного влияния фактора «штамм» на смертность инфицированных насекомых не выявлено. Однако у зараженных штаммом И-3230 отмечали большее число погибших за подкормку особей, как среди самок, так и среди самцов (табл. 1). При этом влияние фактора «пол» на исследуемый показатель значительно ( $F=13,89$ ;  $P<0,001$ ).

Среди блох, инфицированных штаммом И-3230, после пятой подкормки (16-е сутки) отмечены одна самка с полным и две с частичным «блоком». Первые особи с «глыбками» как среди самок, так и среди самцов отмечены после второй подкормки (5-е сутки). Доля заблокированных блох составила 2,3 % от взятых в опыт.

Среди самок, инфицированных штаммом И-2638, особи с частичным и полным «блоками» зарегистрированы после пятой (17-е сутки), шестой (21), седьмой (25) и восьмой (28) подкормок. Один самец с полностью сформировавшимся «блоком» отмечен после пятой подкормки (17-е сутки). Первые особи с «глыбками» выявлены среди самок и самцов после первой (4-е сутки) подкормки и далее таких особей отмечали во все последующие. Всего доля особей с полным и частичным «блоками» составила 11,6 % от взятых в опыт блох.

В группе блох, инфицированных штаммом И-3480, с полным «блоком» отмечены одна самка после третьей подкормки (8-е сутки) и самец после пятой подкормки (16-е сутки). С частичным «блоком» выявлена одна самка после восьмой подкормки (26-е сутки). Всего доля особей с полными и частичными «блоками» составила 1,9 % от числа взятых в опыт. Самки и самцы с «глыбками» отмечены при первой подкормке, на вторые сутки после заражения.

Различия в блокообразовании между штаммами значимы, если учитывать общее количество блох с полными и частичными «блоками». Так, четырех-

Таблица 1

Влияние штаммов чумного микроба с различным плазмидным составом на алиментарную активность и смертность блох *C. tesquorum altaicus*

Штамм чумного микроба	Самки			Самцы		
	Всего в опыте	Доля особей за подкормку, %		Всего в опыте	Доля особей за подкормку, %	
		пивших	погибших		пивших	погибших
И-3230	80	92,9±1,99	6,9±3,41	48	92,3±3,05	21,5±6,52
И-2638	108	95,1±2,03	4,2±1,01	56	98,0±1,32	10,7±2,70
И-3480	84	92,3±1,35	4,6±1,47	65	94,9±2,05	9,4±1,77
Контроль	62	87,0±3,86	4,7±0,99	40	88,3±2,61	10,6±2,14

Таблица 2

Влияние штамма чумного микроба и пола блохи на формирование конгломератов в организме *C. tesquorum altaicus*. Двухфакторный дисперсионный анализ

Источник вариации	df	MS	F
Пол	1	141,70	1,06
Штамм	2	6883,21	51,62**
Взаимодействие	2	776,16	5,82*
Случайная	42	133,34	

Примечание. \*P<0,01; \*\*P<0,001

плазмидный референтный штамм И-2638 по частоте образования «блоков» у *C. tesquorum altaicus* превосходил как трехплазмидный И-3230 (t=2,97; P<0,01), так и двухплазмидный И-3480 (t=3,14; P<0,001).

В формировании биопленки (конгломератов всех визуализируемых форм) у *C. tesquorum altaicus* выявлено преобладающее значение четырехплазмидного штамма И-2638. Среди блох, инфицированных штаммом И-2638, доля содержащих биопленку особей в среднем за подкормку составила (46,8±5,35) %. Данный показатель у селекционированного от него штамма И-3480 также выше (22,6±3,51), чем у И-3230 (8,2±1,95), не имеющего плазмиды рТР33. Кроме того, особи с «глыбками» среди блох, инфицированных штаммами И-2638 и И-3480, выявлены уже на вторые сутки, а среди зараженных трехплазмидным штаммом И-3230 только на пятые сутки после заражающего кормления.

Двухфакторный дисперсионный анализ показал достоверное влияние фактора «штамм» на формирование биопленки в организме *C. tesquorum altaicus* (табл. 2). Установлено взаимодействие факторов «пол блохи» и «штамм». Так, штамм И-3230 более активно формировал конгломераты в организме самок, а штаммы И-2638 и И-3480 – в организме самцов.

Выявлены половые различия в динамике формирования биопленки чумным микробом в организме *C. tesquorum altaicus* по доле особей с конгломератами за подкормку и максимумах их выявления (рисунок). У зараженных трехплазмидным штаммом И-3230 самцов формирование «глыбок» отмечали только после второй и третьей подкормок, а у самок – начиная со второй подкормки до конца опыта, причем с возрастанием доли таких особей. У самцов,

инфицированных штаммами И-2638 и 3480, наблюдалась примерно аналогичная динамика образования конгломератов, в то время как у самок она была прямо противоположна. Так, если доля самок, зараженных штаммом И-2638, со сформировавшимися «глыбками» к концу опыта шла на снижение, то среди зараженных штаммом И-3480 доля таких особей увеличивалась.

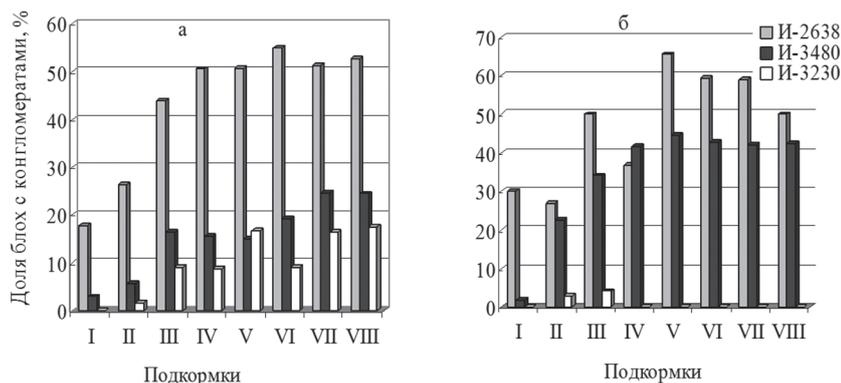
Блохи, инфицированные штаммом И-2638, осуществили трансмиссию возбудителя чумы пяти зверькам из восьми. В одном случае передача зарегистрирована бактериологическим методом (на 6-е сутки после заражения блох), в четырех других – серологическим. Эктопаразиты, зараженные штаммами И-3480 и И-3230, передали возбудителя в одном случае из восьми (И-3480 на 12-е сутки, И-3230 на 16-е сутки), что выявлено серологическим методом.

Таким образом, в результате проведенных опытов установлено, во-первых, существенное влияние зараженности эктопаразитов *Y. pestis* на активность их кровососания. Доля пивших за подкормку насекомых была выше во всех трех случаях среди инфицированных блох, причем наиболее высокой у эктопаразитов, зараженных четырехплазмидным штаммом И-2638.

Во-вторых, выявлены значимые различия между штаммами в блокообразовании. Так, референтный для Тувинского природного очага четырехплазмидный штамм И-2638 по частоте формирования «блоков» у *C. tesquorum altaicus*, превосходил как трехплазмидный И-3230, так и двухплазмидный И-3480, и блохи, инфицированные этим штаммом, чаще осуществляли передачу возбудителя.

В-третьих, четырехплазмидный штамм И-2638 формировал биопленку (конгломераты всех форм) в организме блох, происходящих от эктопаразитов с территории этого же очага, почти в пять раз, а селекционированный от него двухплазмидный штамм И-3480 в три раза чаще, чем трехплазмидный И-3230, и в более ранние сроки. В предыдущем исследовании отмечено, что штаммы, имеющие плазмиду рТР33, по способности формировать биопленку в среднем более, чем в пять раз превосходили трехплазмидный штамм И-3230 и в организме блох *F. luculenta* [6].

Ранее наблюдали ускоренную гибель блох *F. luculenta* из Забайкальского природного очага



Динамика формирования биопленки (конгломератов) возбудителя чумы с различным плазмидным составом в организме блох *C. tesquorum altaicus*: а – самки; б – самцы

чумы, зараженных вирулентным четырехплазмидным штаммом И-2638 [6]. В то время как в анализируемом эксперименте более высокая смертность *C. tesquorum altaicus* имела место в группе особей, инфицированных штаммом И-3230 из Монголии. Приведенные факты могут свидетельствовать о коадаптации возбудителя чумы и блох *C. tesquorum altaicus* из Тувинского природного очага и возможности функциональной роли плазмиды rTP33 в усилении формирования биопленки *in vivo*.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афанасьев М.В., Балахонов С.В., Токмакова Е.Г., Половинкина В.С., Сидорова Е.А., Синьков В.В. Анализ нуклеотидной последовательности плазмиды rTP33 *Yersinia pestis* из Тувинского природного очага чумы. *Генетика*. 2016; 9:1012–20.
2. Балахонов С.В., Вержуцкий Д.Б., Корзун В.М., Вершинин Е.А., Немченко Л.С., Чипанин Е.В., Шестопалов М.Ю., Иннокентьева Т.И., Попков А.Ф., Михайлов Е.П., Ооржак Л.М., Вахрушева З.П., Агапов В.А. Современное состояние природных очагов чумы Сибири. *Журн. инф. патол.* 2009; 3(16):16–20.
3. Вержуцкий Д.Б., Ткаченко В.А., Попов В.В., Колосов В.М. О сохранении возбудителя чумы в Тувинском природном очаге. *Журн. инф. патол.* 2003; 4(10):31–2.
4. Воронова Г.А., Токмакова Е.Г., Балахонов С.В., Базанова Л.П. Взаимоотношения штаммов чумного микроба с различным плазмидным составом и блох *Xenopsylla cheopis* (Roths, 1903). *Мед. паразитол. и паразитарн. бол.* 2011; 2:15–8.
5. Елисеєва И.И., Юзбашев М.М. Общая теория статистики. М.: Финансы и статистика; 2006. 656 с.
6. Оглодин Е.Г., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Одинокоев Г.Н., Гусева Н.П., Кутырев В.В. Структурно-функциональный анализ криптических плазмид штаммов *Yersinia pestis* из двух природных очагов чумы России. *Пробл. особо опасных инф.* 2015; 4:82–5.
7. Токмакова Е.Г., Базанова Л.П., Воронова Г.А., Балахонов С.В. Особенности взаимоотношений блохи *Frontopsylla luculenta luculenta* (Jordan et Rothschild, 1923) и возбудителя чумы с различным плазмидным составом. *Мед. паразитол. и паразитарн.*

*бол.* 2016; 1:38–41.

8. Hinnebusch B.J., Ficher E.R., Schwan T.G. Evaluation of the role *Yersinia pestis* plasminogen activator and other plasmid-encoded factors in temperature-dependent blockage of the flea. *J. Infect. Dis.* 1998; 178(5):1406–15.

#### References

1. Afanas'ev M.V., Balakhonov S.V., Tokmakova E.G., Polovinkina V.S., Sidorova E.A., Sin'kov V.V. [Analysis of nucleotide sequence of *Yersinia pestis* rTP33 plasmid from Tuva natural plague focus]. *Genetika*. 2016; 9:1012–20.
2. Balakhonov S.V., Verzhutsky D.B., Korzun V.M., Vershinin E.A., Nemchenko L.S., Chipanin E.V., Shestopalov M.Yu., Innokent'eva T.I., Popkov A.F., Mikhailov E.P., Oorzhak L.M., Vakhrusheva Z.P., Agapov V.A. [Present status of natural plague foci in Siberia]. *Zh. Infek. Patol.* 2009; 3(16):16–20.
3. Verzhutsky D.B., Tkachenko V.A., Popov V.V., Kolosov V.M. [Concerning plague agent persistence in Tuva natural focus]. *Zh. Infek. Patol.* 2003; 4(10):31–2.
4. Voronova G.A., Tokmakova E.G., Balakhonov S.V., Bazanova L.P. [Interaction between *Yersinia pestis* strains with different plasmid structure and *Xenopsylla cheopis* fleas]. *Med. Parazitol. i Parazitarn. Bol.* 2011; 2:15–8.
5. Eliseeva I.I., Yuzbashev M.M. [General Theory of Statistics]. M.: Finansy i statistika; 2006. 656 p.
6. Oglodin E.G., Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Odiнокоев G.N., Guseva N.P., Kutyrev V.V. [Structural-functional analysis of cryptic plasmids in *Yersinia pestis* strains from two natural plague foci of Russia]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2015; 4:82–5.
7. Tokmakova E.G., Bazanova L.P., Voronova G.A., Balakhonov S.V. [Peculiarities of interaction between *Frontopsylla luculenta luculenta* (Jordan et Rothschild, 1923) and *Yersinia pestis* with different plasmid structure]. *Med. Parazitol. i Parazitarn. Bol.* 2016; 1:38–41.
8. Hinnebusch B.J., Ficher E.R., Schwan T.G. Evaluation of the role *Yersinia pestis* plasminogen activator and other plasmid-encoded factors in temperature-dependent blockage of the flea. *J. Infect. Dis.* 1998; 178(5):1406–15.

#### Authors:

Bazanova L.P., Tokmakova E.G., Voronova G.A., Balakhonov S.V., Innokent'eva T.I. 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:

Базанова Л.П., Токмакова Е.Г., Воронова Г.А., Балахонов С.В., Иннокентьева Т.И. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилисера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Поступила 24.04.17.

В.В.Евдокимова, Л.П.Алексеева, В.П.Зюзина, О.Ф.Кретенчук, М.Э.Яговкин

**ИЗУЧЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ВОЗМОЖНОСТЕЙ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, СПЕЦИФИЧНЫХ К МЕМБРАННОМУ БЕЛКУ ВОЗБУДИТЕЛЯ ХОЛЕРЫ, В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ***ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация*

**Цель** – разработка пероксидазного конъюгата на основе МКА H2F6 и изучение возможности его использования для выявления *tcp*<sup>+</sup> штаммов холерных вибрионов O1/O139 серогрупп в прямых методах ИФА. **Материалы и методы.** В работе использовали гибридный клон H2F6, синтезирующий в культуральную среду моноклональные антитела, специфичные к белку наружной мембраны холерного вибриона. **Результаты и выводы.** На основе МКА сконструирован пероксидазный конъюгат, позволяющий выявлять *tcp*<sup>+</sup> штаммы *V. cholerae* O1 и O139 в прямом ТИФА и дот-ИФА. Испытания препарата на наборе штаммов холерных вибрионов и гетерологичных микроорганизмов показали его специфичность в отношении *V. cholerae* O1 и O139. Моноклональный пероксидазный конъюгат H2F6 может быть использован для детекции в иммуноферментных методах эпидемически значимых штаммов холерных вибрионов O1/O139 серогрупп.

**Ключевые слова:** холерный вибрион, моноклональные антитела, иммуноблоттинг, твердофазный иммуноферментный анализ, дот-иммуноанализ, пероксидазный конъюгат.

*Корреспондирующий автор:* Евдокимова Вероника Вячеславовна, e-mail: nika-evd@yandex.ru.

V.V.Evdokimova, L.P.Alekseeva, V.P.Zyuzina, O.F.Kretenchuk, M.E.Yagovkin

**The Study of Diagnostic Potential of Monoclonal Antibodies Specific to the Membrane Protein of Cholera Agent in Enzyme-Linked Immunoassay***Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation*

**Objective** of the study was to develop peroxidase conjugate on the base of monoclonal antibodies (MCA) H2F6 and to study the possibility of its application for the detection of *tcp*<sup>+</sup> *Vibrio cholerae* O1/O139 strains using direct ELISA methods. **Materials and methods.** Utilized for the investigation was the hybrid H2F6 clone, which synthesized monoclonal antibodies specific to the outer membrane protein of cholera vibrio into culture medium. **Results and conclusions.** Peroxidase conjugate was designed on the base of MCA which allows for the detection of *tcp*<sup>+</sup> *V. cholerae* O1 and O139 strains in direct solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay and dot-ELISA. The preparation was tested on a group of strains of *V. cholerae* and heterologous microorganisms and showed specificity in relation to *V. cholerae* O1 and O139. Monoclonal peroxidase conjugate H2F6 can be used for the detection of epidemiologically significant *V. cholerae* O1/O139 strains by means of immune-enzyme methods.

**Key words:** cholera vibrio; monoclonal antibodies; immunoblotting; solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay; dot-immunoassay; peroxidase conjugate.

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

**Corresponding author:** Veronika V. Evdokimova, e-mail: nika-evd@yandex.ru.

**Citation:** Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Zyuzina V.P., Kretenchuk O.F., Yagovkin M.E. The Study of Diagnostic Potential of Monoclonal Antibodies Specific to the Membrane Protein of Cholera Agent in Enzyme-Linked Immunoassay. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:45–48. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-45-48

Возбудитель холеры продолжает представлять угрозу для общественного здравоохранения, что диктует необходимость разработки новых методов и средств диагностики. Создание современных иммунодиагностических препаратов невозможно без высокоактивных специфических антител. Уникальными преимуществами обладают моноклональные антитела (МКА) – они направлены к строго определенной антигенной детерминанте, имеют один изотип, обладают одинаковыми физико-химическими характеристиками и сродством к антигену, при наличии гибридом-продуцентов их можно получать по мере необходимости в неограниченном количестве. На сегодняшний день известно много зарубежных и отечественных публикаций, касающихся получения моноклональных антител к различным

поверхностным структурам холерного вибриона и его факторам патогенности. На основе МКА сконструированы высокоэффективные тест-системы: иммуноферментные [1, 2, 4, 16, 20], иммунохроматографические [11, 17, 18] и иммуносенсорные [12]. Нами на базе Ростовского-на-Дону противочумного института получен гибридный клон H2F6, продуцирующий в культуральную среду МКА, специфичные к мембранному белку OmpU и/или OmpT холерных вибрионов O1, O139 [5]. При оценке в иммуноферментном анализе диагностической значимости МКА H2F6 на наборе штаммов холерных вибрионов O1/O139 серогрупп, а также гетерологичных и близкородственных микроорганизмов, установлено, что антитела взаимодействуют только с *tcp*<sup>+</sup> штаммами *V. cholerae* O1 и O139. По данным Референс-центра

по мониторингу за холерой, за период с 2007 по 2015 год в субъектах Российской Федерации из воды поверхностных водоемов изолированы 33 штамма *V. cholerae* O1 ctxA<sup>-</sup> tcpA<sup>+</sup> в Ростовской области (2007 и 2015 гг.), Республике Калмыкия (2007, 2011–2015 гг.), Алтайском (2011 г.) и Хабаровском (2013 г.) краях. Такие штаммы холерных вибрионов не обладают эпидемическим потенциалом, но могут вызывать спорадические случаи и локальные вспышки [9] за счет продукции ТСП, кодируемых кластером генов в составе острова патогенности VPI, и других факторов патогенности, детерминанты которых обнаружены в их геномах в различных сочетаниях [8]. Ежегодное выделение атоксигенных холерных вибрионов указывает на необходимость выявления потенциальных и реальных рисков контаминации холерными вибрионами O1/O139 серогрупп водных объектов и их устранения [10]. Цель данной работы – получение пероксидазного конъюгата на основе МКА H2F6 и изучение возможности его использования для выявления tcp<sup>+</sup> штаммов холерных вибрионов O1/O139 серогрупп в прямых методах ИФА.

### Материалы и методы

В работе использовали штаммы, полученные из коллекции Музея живых культур института: 32 штамма *V. cholerae* O1, 12 штаммов *V. cholerae* O139, 4 – *V. cholerae* не O1/не O139, 2 – *E. coli*, 2 – *Salmonella spp.*, 4 – *Aeromonas*. Взвеси холерных вибрионов и гетерологичных микроорганизмов готовили в 0,9 % растворе хлорида натрия (рН 7,2±0,1) по стандартным образцам мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича 10 единиц (ОСО 42-28-85П), соответствующего года выпуска, эквивалентных концентрации 1·10<sup>9</sup> м.к./мл. Взвеси культур инактивировали на водяной бане в течение 30 мин.

Источником МКА служили культуральные жидкости, накопленные при многократном пассировании *in vitro* гибридомы-продуцента H2F6. Выделение иммуноглобулиновой фракции из культуральных жидкостей осуществляли преципитацией сульфатом аммония [6] с последующим диализом.

Электрофорез образцов проводили по методике U.K.Laemmli [14] в пластинах 12,5 % полиакриламидного геля размером 70×100×0,7 мм в денатурирующих условиях (SDS-PAGE) при постоянном напряжении на приборе Mini-Protean Tetra System (Bio-Rad Laboratories, inc., США). Полусухой перенос образцов из геля на нитроцеллюлозную мембрану (НЦМ) с диаметром пор 0,45 мкм проводили на приборе Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories inc., США). Для окрашивания белковых фракций на мембране использовали краситель Ponceau S (Reanal, Budapest). Постановку иммуноблоттинга осуществляли как описано Н. Towbin *et al.* [19]; мембрану обрабатывали МКА, а затем инкубировали в рабочем растворе антимишиного конъюгата (Goat Anti-mouse IgG H+L, HRP-conjugated, MP

Biomedicals), специфические полосы проявляли диаминобензидином (Aldrich).

Метку МКА ферментом проводили по методу P.K.Nakane *et al.* [15] в соотношении 2:1, используя пероксидазу хрена (ПХ) с RZ (Reinheitszahl – показатель чистоты) не менее 3,0 (активность >250 ед/мг, хроматографически чистая, обессоленная, для иммунологии, «ДИА-М»). Очистку конъюгатов от несвязавшейся пероксидазы проводили путем диализа против 0,01 М фосфатного буфера. Рабочее разведение ПХ-конъюгатов определяли методом шахматного титрования в двухкомпонентной реакции: контрольный антиген (АГ) АГ+МКА, меченные ферментом.

Постановку прямого твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА) в полистироловых планшетах осуществляли по общепринятой методике [7]. В качестве хромогена использовали 3,3'-5,5'-тетраметилбензидин (AppliChem, Германия). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре BioTek EL\*800 (BioTek Instruments, США) при длине волны 450 нм (референс-волна 630 нм).

Для постановки дот-ИФА по стандартной методике [7] использовали НЦМ с диаметром пор 0,45 мкм (Bio-Rad). После проведения реакции специфические пятна проявляли хромогеном диаминобензидином (Aldrich), активированным 0,1 мл 3,5 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Все исследования проводили не менее чем в трех повторностях. При анализе и обобщении результатов планшетного ИФА использованы методы, описанные И.П.Ашмариным [3].

### Результаты и обсуждение

На первом этапе работы для приготовления препаративных количеств МКА клетки гибридомы H2F6, стабильно продуцирующей специфические иммуноглобулины, тиражировали *in vitro* в чашках Петри и культуральных матрасах. Оценку интенсивности антителопродукции проводили с помощью тестирования в ТИФА образцов среды из лунок с гибридомой. После накопления культуральной жидкости (КЖ) гибридомы H2F6 проводили выделение МКА с помощью метода сульфатного осаждения (при 50 % насыщения). В полученных препаратах определили содержание белка равное 5–8 мг/мл и методом непрямого ТИФА установили специфическую активность, которая составляла 1:4000–1:8000.

Эпитопную направленность МКА определяли в иммуноблоттинге, используя лизаты клеток холерных вибрионов (рис. 1). В результате обработки мембраны МКА H2F6 специфические белковые полосы обнаружены на уровне маркерных белков 38–42 кДа у штаммов *V. cholerae cholerae*, *V. cholerae* El Tor (tcp<sup>+</sup>) и *V. cholerae* O139 (tcp<sup>+</sup>), что соответствует мембранным белкам OmpU и/или OmpT холерного вибриона.

Затем очищенные специфические моноклональ-

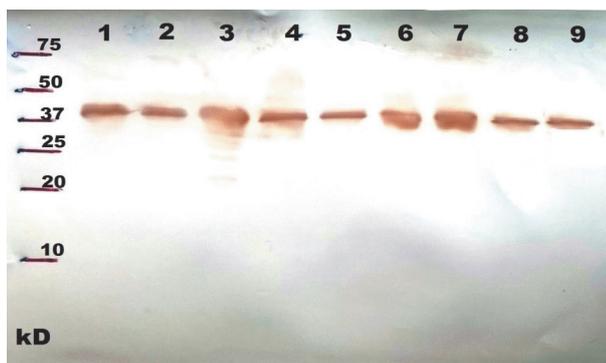


Рис. 1. Иммуноблоттинг клеточных лизатов холерных вибрионов с МКА Н2F6:

1–3 – штаммы *Vibrio cholerae cholerae*: 1401, 10353, 13571; 4–6 – штаммы *Vibrio cholerae* El Tor (*tcp*<sup>+</sup>): 13020, 18895, 18780; 7–9 – штаммы *Vibrio cholerae* O139 (*tcp*<sup>+</sup>): 16064, 16485, 17916

ные иммуноглобулины Н2F6 конъюгировали с пероксидазой хрена, в результате чего получено две серии препаратов. Для каждой серии конъюгатов проверяли способность связываться со специфическим антигеном и возможность неспецифической сорбции. Методом прямого ТИФА определили максимальное разведение конъюгатов, при котором наблюдалось положительное взаимодействие клеток холерного вибриона с МКА, а именно, препараты титровались до разведения 1:64–1:128. Для дальнейших экспериментов использовали их в рабочем титре 1:32 при отсутствии неспецифической сорбции.

Специфичность полученных конъюгатов оценивали на наборе штаммов холерных вибрионов, а также близкородственных и гетерологичных микроорганизмов. Подобраны культуры *V. cholerae* O1 и O139 с генотипами *tcp*<sup>+</sup> и *tcp*<sup>-</sup>. В таблице приведены результаты прямого ТИФА, которые подтверждают установленную в предыдущих опытах [5] специфичность МКА Н2F6 в отношении *tcp*<sup>+</sup> штаммов *V. cholerae* O1, O139. Кроме того, исследуемые антитела взаимодействуют как с клетками El Tor штаммов, так и классических холерных вибрионов, что указывает на сходство у этих биоваров антигенной структуры мембранного порина, к которому направлены МКА Н2F6.

Взаимодействие холерных вибрионов O1/O139 серогрупп с пероксидазным конъюгатом Н2F6 в прямом ТИФА

Бактериальные штаммы (обеззараженные кипячением)	Количество исследуемых штаммов	Количество штаммов, положительно взаимодействующих в ТИФА с ПХ-МКА Н2F6
<i>V. cholerae cholerae tcp</i> <sup>+</sup>	8	8
<i>V. cholerae</i> El Tor <i>tcp</i> <sup>+</sup>	16	16
<i>V. cholerae</i> El Tor <i>tcp</i> <sup>-</sup>	8	0
<i>V. cholerae</i> O139 <i>tcp</i> <sup>+</sup>	6	6
<i>V. cholerae</i> O139 <i>tcp</i> <sup>-</sup>	6	0
<i>E. coli</i>	2	0
<i>V. cholerae</i> не O1/не O139	4	0
<i>Aeromonas spp.</i>	4	0
<i>Salmonella spp.</i>	2	0



Рис. 2. Дот-ИФА исследуемых культур с ПХ-МКА Н2F6:

Штаммы микроорганизмов: 1–13 – *V. cholerae* El Tor *tcp*<sup>+</sup>, 14–21 – *V. cholerae* El Tor *tcp*<sup>-</sup>, 22–26 – *V. cholerae cholerae tcp*<sup>+</sup>, 27–29 – *V. cholerae* не O1/не O139, 30 – *E. coli*, 31–34 – *Aeromonas spp.*, 35–40 – *V. cholerae* O139 *tcp*<sup>+</sup>, 41–43 – *V. cholerae* O139 *tcp*<sup>-</sup>

Конъюгаты ПХ-МКА Н2F6 также исследовали в прямом дот-иммуоферментном анализе (рис. 2). Результаты дот-ИФА показали, что препараты взаимодействуют только с холерными вибрионами O1 и O139 серогрупп, имеющими ген *tcp*. Положительная реакция на нитроцеллюлозной мембране проявляется в виде четко окрашенных коричневых пятен-дотов. Отрицательная реакция (отсутствие окрашенных пятен или еле заметные пятна) зарегистрирована в отношении *tcp*<sup>-</sup> штаммов *V. cholerae* O1, O139, близкородственных и гетерологичных микроорганизмов.

Результаты проведенной работы показывают, что из культуральной жидкости гибридомы Н2F6, накопленной при пассировании *in vitro*, возможно выделить специфические моноклональные иммуноглобулины, на основе которых могут быть приготовлены пероксидазные конъюгаты с титром 1:64 для постановки прямого ТИФА и дот-ИФА. Экспериментальные серии препаратов разливали на аликвоты и хранили при -20 °С. Часть препаратов стабилизировали путем лиофильного высушивания, в качестве криопротектора добавляли 1 % БСА (Albumin bovine, Amresco). Результаты испытаний препаратов после хранения их в лиофилизированном состоянии в течение 12 месяцев показали, что они сохраняют специфическую активность на исходном уровне.

Таким образом, полученные моноклональные пероксидазные конъюгаты на основе МКА Н2F6 имеют диагностическую значимость, т.к. способны выявлять в прямых методах ИФА *tcp*<sup>+</sup> штаммы *V. cholerae* O1, O139, в том числе и нетоксигенные. Как известно, наличие пилей адгезии у нетоксигенных штаммов холерных вибрионов создает потенциальную возможность адсорбции на них фага СТХφ, в результате чего может произойти формирование нового клона. Адгезируясь на клетках тонкого кишечника с помощью *tcp*-пилей, холерные вибрионы образуют микроколонии с филаментозным матриксом, который окружает бактериальные клетки и защищает их от антибактериальных компонентов [13]. В связи с этим штаммы *ctx*<sup>-</sup> *tcp*<sup>+</sup> могут обладать определенным патогенетическим

потенциалом и возможностью выжить в условиях кишечника хозяина.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева Л.П., Козлова Г.А., Маркина О.В., Кретенчук О.Ф., Яговкин М.Э., Бурша О.С. Использование моноклональных пероксидазных конъюгатов для идентификации холерных вибрионов O1, O139 в реакции дот-иммуноанализа. *Клин. лаб. диагн.* 2013; 3:26–9.
2. Алексеева Л.П., Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М., Храмов М.В., Кругликов В.Д., Агафонова В.В., Фатеева О.Ф., Чеботарев Д.А., Керманов А.В. Сравнительная оценка методов дот-иммуноанализа и иммунохроматографии при выявлении холерных вибрионов O1 серогруппы. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2010; 6:88–93.
3. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. 180 с.
4. Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Бурша О.С. Иммуноферментные методы анализа в диагностике холеры. *Клин. лаб. диагн.* 2016; 5:303–7. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-5-303-307.
5. Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф., Кругликов В.Д., Архангельская И.В. Моноклональные антитела к термостабильным поверхностным антигенам холерных вибрионов O1- и O139-серогруппы. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2015; 3:51–7.
6. Кэтти Д., редактор. Антитела. Методы. Т. 1. М.: Мир; 1991. 384 с.
7. Кэтти Д., редактор. Антитела. Методы. Т. 2. М.: Мир; 1991. 382 с.
8. Монахова Е.В. Стратегия вирулентности холерных вибрионов и пути ее реализации. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 4:60–8.
9. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Подосинникова Л.С., Водяницкая С.Ю., Прометной В.И., Монахова Е.В., Водопьянов С.О., Телесманич Н.Р., Дудина Н.А. Холера, обусловленная *Vibrio cholerae* O1 ctxAB<sup>-</sup>tcpA<sup>+</sup>. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2007; 1:23–9.
10. Титова С.В., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Самородова А.В., Тюленева Е.Г., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Архангельская И.В., Иванова С.М., Ковалева Т.В., Водопьянов С.О. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2006–2015 гг. Прогноз на 2016 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 1:20–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-20-27.
11. Chen W., Lu J.Zh.G., Yuan Z., Wu Q., Li J., Xu G., He A., Zheng Ji., Zhang Ju. Development of an immunochromatographic lateral flow device for rapid diagnosis of *Vibrio cholerae* O1 serotype Ogawa. *Clinical Biochemistry.* 2014; 47(6):448–54. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.12.022.
12. Jyoung J.Y., Hong S., Lee W., Choi J.W. Immunosensor for the detection of *Vibrio cholerae* O1 using surface plasmon resonance. *Siosens. Bioelectron.* 2006; 21(12):2315–9. DOI: 10.1016/j.bios.2005.10.015.
13. Krebs S.J., Taylor R.K. Protection and attachment of *Vibrio cholerae* mediated by the toxin-coregulated pilus in the infant mouse model. *J. Bacteriol.* 2011; 193(19):5260–70. DOI: 10.1128/JB.00378-11.
14. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259): 680–5.
15. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation. *J. Histochem Cytochem.* 1974; 22:1084–91.
16. Pengsuk C., Longyant S., Rukpratanporn S., Chaivisuthangkura P., Sridulyakul P., Sithigorngul P. Differentiation among the *Vibrio cholerae* serotypes O1, O139, O141 and non-O1, non-O139, non-O141 using specific monoclonal antibodies with dot blotting. *J. Microbiol Methods.* 2011; 87(2):224–33. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.07.022.
17. Pengsuk Ch., Chaivisuthangkura P., Longyant S., Sithigorngul P. Development and evaluation of a highly sensitive immunochromatographic strip test using gold nanoparticle for direct detection of *Vibrio cholerae* O139 in seafood samples. *Biosen. Bioelectron.* 2013; 42:229–35. DOI: 10.1016/j.bios.2012.10.011.
18. Thattiyaphong A., Okada K., Khangrang S., Nispa W., Sawanpanyalert P., Honda T. Development of a 5-minute rapid test for detecting *Vibrio cholerae* O139. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2013; 44(3):448–55.
19. Towbin H., Gordon J. Immunoblotting and dot immu-

nobinding – Current status and outlook. *J. Immunol. Methods.* 1984; 72:313–40.

20. Tuteja U., Kumar S., Shukla J., Kingston J., Batra H.V. Simultaneous direct detection of toxigenic and non-toxigenic *Vibrio cholerae* from rectal swabs and environmental samples by sandwich ELISA. *J. Med. Microbiol.* 2007; 56(Pt 10):1340–5. DOI: 10.1099/jmm.0.47166-0.

#### References

1. Alekseeva L.P., Kozlova G.A., Markina O.V., Kretenchuk O.F., Yagovkin M.E., Bursha O.S. [Usage of monoclonal peroxidase conjugates for identification of cholera vibrios O1, O139 in dot-immunoassay]. *Klin. Lab. Diagnost.* 2013; 3: 26–9.
2. Alekseeva L.P., Telesmanich N. R., Lomov Yu.M., Khranov M.V., Kruglikov V.D., Agafonova V.V., Fateeva O.F., Chebotarev D.A., Kermanov A.V. [Comparative evaluation of dot-immunoassay and immune-chromatographic methods in case of cholera vibrio O1 detection]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2010; 6: 88–93.
3. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. Leningrad: "Medgiz"; 1962: 180 p.
4. Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Kretenchuk O.F., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaya I.V., Bursha O.S. [Immune-enzyme analysis in cholera diagnostics]. *Klin. Lab. Diagnost.* 2016; 5:303–7. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-5-303-307.
5. Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Kretenchuk O.F., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaya I.V. [Monoclonal antibodies to thermo-resistant surface antigens of cholera vibrio O1 and O139]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2015; 3:51–7.
6. Ketty D., editor. [Antibodies. Methods]. Vol. 1. M.: "Mir"; 1991. 384 p.
7. Ketty D., editor. [Antibodies. Methods]. Vol. 2. M.: "Mir"; 1991. 382 p.
8. Monakhova E.V. [Cholera vibrio virulence strategy and ways of its realization (Scientific review)]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 4:60–8.
9. Onishchenko G.G., Lomov Yu.M., Moskvitina E.A., Podosinnikova L.S., Vodyanitskaya S.Yu., Prometnoy V.I., Monakhova E.V., Vodop'yanov S.O., Telesmanich N.R., Dudina N.A. [Cholera caused by *Vibrio cholerae* O1 ctxAB<sup>-</sup>tcpA<sup>+</sup>]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2007; 1:23–9.
10. Titova S.V., Moskvitina E.A., Kruglikov V.D., Samorodova A.V., Tyuleneva E.G., Monakhova E.V., Pisanov R.V., Vodop'yanov A.S., Arkhangel'skaya I.V., Ivanova S.M., Kovaleva T.V., Vodop'yanov S.O. [Cholera: analysis of epidemiological situation across the world and in Russia within a period of 2006–2015]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 1:20–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-20-27.
11. Chen W., Lu J.Zh.G., Yuan Z., Wu Q., Li J., Xu G., He A., Zheng Ji., Zhang Ju. Development of an immunochromatographic lateral flow device for rapid diagnosis of *Vibrio cholerae* O1 serotype Ogawa. *Clinical Biochemistry.* 2014; 47(6):448–54. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2013.12.022.
12. Jyoung J.Y., Hong S., Lee W., Choi J.W. Immunosensor for the detection of *Vibrio cholerae* O1 using surface plasmon resonance. *Siosens. Bioelectron.* 2006; 21(12):2315–9. DOI: 10.1016/j.bios.2005.10.015.
13. Krebs S.J., Taylor R.K. Protection and attachment of *Vibrio cholerae* mediated by the toxin-coregulated pilus in the infant mouse model. *J. Bacteriol.* 2011; 193(19):5260–70. DOI: 10.1128/JB.00378-11.
14. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259): 680–5.
15. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation. *J. Histochem Cytochem.* 1974; 22:1084–91.
16. Pengsuk C., Longyant S., Rukpratanporn S., Chaivisuthangkura P., Sridulyakul P., Sithigorngul P. Differentiation among the *Vibrio cholerae* serotypes O1, O139, O141 and non-O1, non-O139, non-O141 using specific monoclonal antibodies with dot blotting. *J. Microbiol Methods.* 2011; 87(2):224–33. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.07.022.
17. Pengsuk Ch., Chaivisuthangkura P., Longyant S., Sithigorngul P. Development and evaluation of a highly sensitive immunochromatographic strip test using gold nanoparticle for direct detection of *Vibrio cholerae* O139 in seafood samples. *Biosen. Bioelectron.* 2013; 42:229–35. DOI: 10.1016/j.bios.2012.10.011.
18. Thattiyaphong A., Okada K., Khangrang S., Nispa W., Sawanpanyalert P., Honda T. Development of a 5-minute rapid test for detecting *Vibrio cholerae* O139. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2013; 44(3):448–55.
19. Towbin H., Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding – Current status and outlook. *J. Immunol. Methods.* 1984; 72:313–40.
20. Tuteja U., Kumar S., Shukla J., Kingston J., Batra H.V. Simultaneous direct detection of toxigenic and non-toxicogenic *Vibrio cholerae* from rectal swabs and environmental samples by sandwich ELISA. *J. Med. Microbiol.* 2007; 56(Pt 10):1340–5. DOI: 10.1099/jmm.0.47166-0.

#### Authors:

Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Zyuzina V.P., Kretenchuk O.F., Yagovkin M.E. 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:

Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Зюзина В.П., Кретенчук О.Ф., Яговкин М.Э. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.

Поступила 11.08.17.

Е.В.Король, Л.К.Мерина, Е.В.Шубникова, О.А.Мерина, Т.В.Сенина, Н.Г.Плеханова

## ВЫЖИВАЕМОСТЬ *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* В КЛЕТКАХ РЕСНИЧНОЙ ИНФУЗОРИИ *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*: ВЛИЯНИЕ МИКРООРГАНИЗМА НА ИНЦИСТИРУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ ТЕТРАХИМЕН

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

Цель исследования заключалась в моделировании взаимодействия *Burkholderia pseudomallei* с *Tetrahymena pyriformis* *in vitro* и изучении изменений в популяционном составе простейших при совместном культивировании с микроорганизмом. **Материалы и методы.** В работе использовали штаммы *B. pseudomallei* 110, C141, 57576, 107, отличающиеся по вирулентности для мышей линии BALB/c. Аксеническую культуру *T. pyriformis* выращивали в LB-бульоне при температуре 28 °С. Буркгольдерии соединяли с тетрахименами в соотношении 100:1. Сокультуры инкубировали при температуре 28 °С в LB на протяжении срока наблюдения. Образцы сокультур просматривали при световой микроскопии, оценивая изменения в популяционном составе тетрахимен по количественному соотношению трофозоитов и цист. Для определения динамики размножения культур *B. pseudomallei*, ассоциированных с *T. pyriformis*, из сокультур ежедневно производили высев на плотную питательную среду для подсчета выросших колоний. **Результаты и выводы.** В ассоциации с тетрахименами *B. pseudomallei* поглощаются клетками простейших, размножаются в них и индуцирует инцистирующую активность тетрахимен. При этом вирулентный штамм *B. pseudomallei* 110 осуществляет переход клеток *T. pyriformis* в состояние цист на 2–4-е сутки и их полное разрушение на 7–8-е сутки. Авирулентный штамм *B. pseudomallei* 107 вызывает полное инцистирование простейших не ранее 7 суток, и значительная часть цист остается неразрушенной на 10-е сутки. Динамика роста *B. pseudomallei* в сокультуре с *T. pyriformis* характеризуется в первые сутки отчетливым снижением количества жизнеспособных клеток, которое через 24 ч возрастает и постепенно достигает показателей, близких к исходным. Кривые подъема концентрации микроорганизмов зависят от вирулентности штамма: максимальное размножение культуры *B. pseudomallei* 110 наблюдается спустя 48 ч, тогда как для штамма *B. pseudomallei* 107 это время составляет не менее 7–8 сут.

**Ключевые слова:** *Burkholderia pseudomallei*, *Tetrahymena pyriformis*, мелиоидоз, вирулентность, внутриклеточное выживание, инцистирование.

Корреспондирующий автор: Король Екатерина Васильевна, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

E.V.Korol', L.K.Merina, E.V.Shubnikova, O.A.Merina, T.V.Senina, N.G.Plekhanova

### Survival of *Burkholderia pseudomallei* in cells of *Tetrahymena pyriformis* Ciliate Infuzorian: Effect on *Tetrahymena* Encystment Activity

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation

**Objective** of the study was to model the interaction of *Burkholderia pseudomallei* with *Tetrahymena pyriformis* *in vitro* and investigate the changes in the population composition of the protozoa when co-cultured with a microorganism. **Materials and methods.** *B. pseudomallei* 110, C141, 57576, 107 strains differing in virulence for BALB/c mice were used. The axenic culture of *T. pyriformis* was incubated with microorganisms in 100 to 1 ratio, at 28 °C, in LB. Samples of co-cultures were examined using light microscopy, by counting the number of trophozoites and cysts in the population. Dynamics of multiplication of *B. pseudomallei* cultures associated with *T. pyriformis* was determined through seeding bacteria on a dense nutrient medium to count the grown colonies. **Results and conclusions.** *B. pseudomallei* in association with *T. pyriformis* is ingested by protozoan cells; it multiplies in them and stimulates protozoa encystment. Hereby virulent strain *B. pseudomallei* 110 induces encystment of *T. pyriformis* on days 2–4 and complete cell destruction within 7–8 days. Avirulent strain, *B. pseudomallei* 107, induces full encystment on day 7; significant part of the cysts remains intact on day 10. Dynamics of *B. pseudomallei* growth, co-cultured with *T. pyriformis* is characterized on day 1 by distinct decrease in the number of viable bacterial cells and increase in it within following 24 hours. Bacteria concentration curves depend on the virulence of the strain: maximum level of *B. pseudomallei* 110 replication is observed after 48 hours, while that of *B. pseudomallei* 107 – not less than after 7–8 days.

**Key words:** *Burkholderia pseudomallei*, *Tetrahymena pyriformis*, melioidosis, virulence, intracellular survival, encystment.

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

**Corresponding author:** Ekaterina V. Korol', e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

**Citation:** Korol' E.V., Merina L.K., Shubnikova E.V., Merina O.A., Senina T.V., Plekhanova N.G. Survival of *Burkholderia pseudomallei* in cells of *Tetrahymena pyriformis* Ciliate Infuzorian: Effect on *Tetrahymena* Encystment Activity. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2017; 3:49–52. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-49-52

*Burkholderia pseudomallei* – возбудитель мелиоидоза – факультативный внутриклеточный патоген человека и многочисленных видов животных [3, 8]. Он может выживать и размножаться в фагоцитарных и нефагоцитарных клетках человека *in vitro*, что рассматривается в качестве главного фактора длитель-

ного персистирувания возбудителя в макроорганизме, приводящего к формированию латентных и хронических форм инфекции [7].

В эндемичных регионах естественной средой обитания *B. pseudomallei* являются почвенные, водные экосистемы и ризосфера растений [2, 6].

В настоящее время сохранение *B. pseudomallei* во внешней среде связывают со способностью образовывать биопленки, а также инвазировать свободноживущие в почве и воде амёбы (*Acanthamoeba spp.*) и персистировать в них [5, 6]. В сокультуре с *Acanthamoeba spp.* буркхольдерии, интернированные простейшими, остаются жизнеспособными в амёбных вакуолях, размножаются в них, а после разрушения трофозоитов элиминируются в окружающее пространство [5].

Помимо амёб в процессах внутриклеточного выживания и распространения различных патогенных микроорганизмов принимают участие цилиарные инфузории вида *Tetrahymena pyriformis*. Отмечено, что бактерии разных видов (*Legionella pneumophilla*, *Mycobacteria spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*) обладают способностью избегать переваривания фагоцитарными вакуолями тетрахимен, сохраняться и распространяться во внешней среде в экскретируемом остатке вакуолей или в цистах [1, 9, 10].

Особенности взаимодействия *B. pseudomallei* с *T. pyriformis* не описаны. *T. pyriformis* является убиквитарным видом, обычным для среды обитания возбудителя мелиоидоза и может представлять интерес для изучения процессов его внутриклеточного выживания как в объектах внешней среды, так и в макроорганизме.

Цель данной работы заключалась в моделировании взаимодействия *B. pseudomallei* с *T. pyriformis* *in vitro* и изучении изменений в популяционном составе простейших при совместном культивировании с микроорганизмом.

### Материалы и методы

Аксеническая культура *T. pyriformis* получена из Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Тетрахимены выращивали в LB-бульоне (HiMedia) при температуре 28 °С.

В работе использовали дикие штаммы *B. pseudomallei* 110, С141, 57576, 107, отличающиеся по вирулентности для мышей линии BALB/c ( $LD_{50}$  –  $1 \cdot 10^3$ ,  $2,5 \cdot 10^4$ ,  $5 \cdot 10^4$ ,  $5 \cdot 10^8$  м.к. соответственно), а также штамм *B. pseudomallei* 110 PAS, вирулентность которого была повышена путем пассирования на золотистых хомячках ( $LD_{50}$  для хомячков 5 м.к.).

Буркхольдерии, выращенные на агаре Luria-Bertani (LB) при 32 °С, 24 ч, суспендировали в стерилизованной автоклавированием речной воде и соединяли с тетрахидами в соотношении 100:1 ( $1 \cdot 10^6$  м.к./мл бактерий и  $1 \cdot 10^4$  кл/мл тетрахимен) в LB-бульоне.

Сокультуры микроорганизма и тетрахимен инкубировали в климатической камере (Сапуо, Япония) при температуре 28 °С на протяжении срока наблюдения (от 24 ч до 10–15 сут). Образцы сокультур после предварительного обеззараживания в течение 1 ч 10 % формалином просматривали в камере Горяева при световой микроскопии (микроскоп Lomo Micmed 6, увеличение  $\times 400$ ), оценивая

изменения в популяционном составе тетрахимен по количественному соотношению трофозоитов и цист. Морфологические изменения клеток *T. pyriformis* визуализировали на экране компьютера с использованием программы Scope Photo.

Для определения динамики размножения культур *B. pseudomallei*, ассоциированных с *T. pyriformis*, из сокультур ежедневно производили высев на плотную питательную среду LB-агар для подсчета выросших колоний. Параллельно определяли динамику размножения культур *B. pseudomallei* в LB-бульоне.

Для статистической обработки полученных данных использовали методы определения средних величин и доверительных границ к ним ( $p < 0,05$ ).

### Результаты и обсуждение

Для первоначальной характеристики морфологических изменений клеток тетрахимен в сокультуре с буркхольдериями использовали штамм *B. pseudomallei* 110. Как показано на рис. 1, при совместном инкубировании микроорганизма с тетрахидами в течение 24 ч в трофозоитах наблюдалось появление фагоцитарных вакуолей (рис. 1, Б). Через 48–72 ч выявлялись существенно увеличенные в размере клетки тетрахимен, содержащие множество вакуолей и расположенные в них, а также вне клеток трофозоитов, микроорганизмы (рис. 1, В). На 2-е–3-и сутки в сокультуре с буркхольдериями тетрахимены начинали образовывать цисты (рис. 1, Г), которые в течение последующих дней подвергались разрушению.

Дальнейшее наблюдение за изменениями в популяционном составе тетрахимен в сокультуре с *B. pseudomallei* показало, что присутствие микроорганизма ограничивает размножение трофозоитов и оказывает влияние на их инцистирующую активность. Динамика отмеченных изменений имеет различия, зависящие от штамма.

Так, в сокультуре с *B. pseudomallei* 110 в тече-

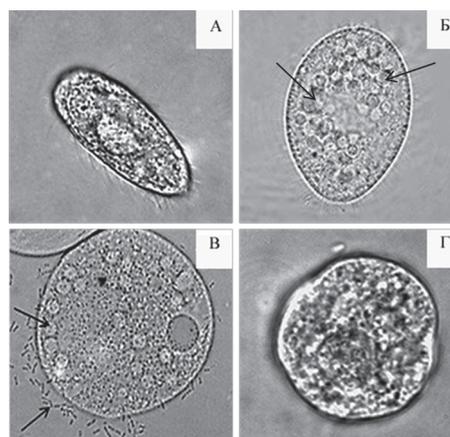


Рис. 1. Морфология клеток *T. pyriformis*, ассоциированных с *B. pseudomallei* 110:

А – интактный трофозоит *T. pyriformis*; Б – трофозоит в сокультуре с *B. pseudomallei* 110 через 24 ч совместного культивирования в LB-бульоне при 28 °С; В – трофозоит в сокультуре с *B. pseudomallei* 110 через 48–72 ч, стрелками показаны вакуоли, а также внутри и внеклеточно расположенные бактерии; Г – циста *T. pyriformis*. Световая микроскопия, увеличение  $\times 400$

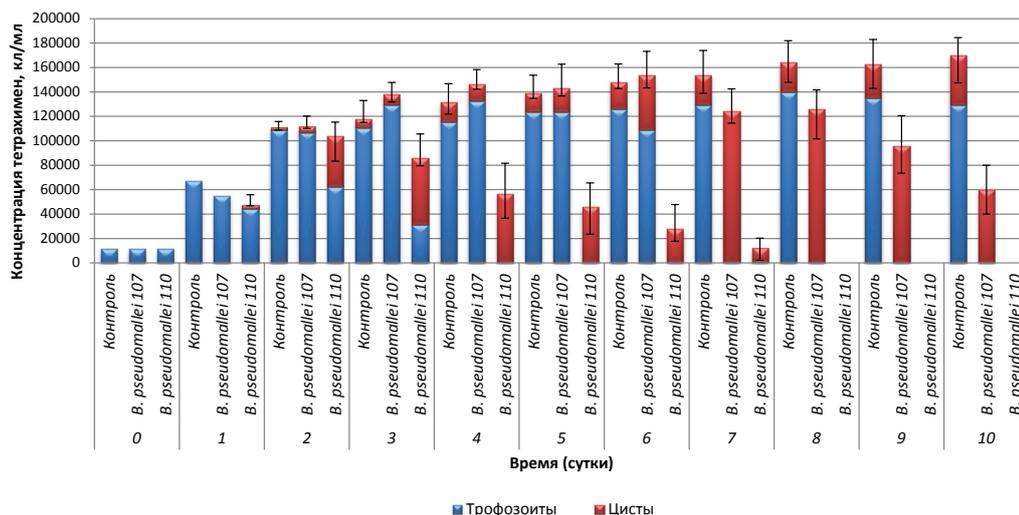


Рис. 2. Динамика образования цист клетками тетрахи- мен в сокультуре со штамма- ми *B. pseudomallei*

ние 24–48 ч наблюдается размножение трофозоитов, менее интенсивное, чем в контроле, но уже на вторые сутки часть из них (40 %) подвергается инцистированию, на третьи – количество образовавшихся цист при взаимодействии с этим штаммом достигает максимума (рис. 2). Далее происходит постепенное исчезновение трофозоитов из сокультуры и снижение количества выявляемых цист, вызванное их разрушением. На 7–8-е сутки в образцах тетрахи- мен с *B. pseudomallei* 110 определяются только разрушающиеся цисты и их фрагменты.

Пассированный в организме золотистых хомяч- ков штамм *B. pseudomallei* 110 PAS проявлял более выраженное действие на жизнедеятельность тетра- хи- мен, индуцируя инцистирование основной массы клеток (более 70 %) уже на вторые сутки.

В отличие от них, штамм *B. pseudomallei* 107, имевший существенно сниженную вирулентность для экспериментальных животных, в ассоциации с тетрахи- менами вызывал полное инцистирование про- стейших не ранее 7 суток, значительная часть образо- вавшихся цист оставалась неразрушенной на 9–10-е сутки и сохранялась в последующие 5 сут (рис. 2).

Что касается влияния двух других штаммов *B. pseudomallei* С 141 и 57576, то в сравнении с *B. pseudomallei* 110, оно проявлялось в более замед- ленной динамике инцистирования *T. pyriformis*. На 4–5-е сутки в сокультуре с ними можно было наблю- дать присутствующие в различном количестве тро- фозоиты и цисты, интенсивное разрушение которых отмечалось не ранее, чем через 8–10 сут.

При этом, как показано на рис. 2, в контрольных образцах *T. pyriformis* в LB-бульоне при 28 °С в те- чение 10 сут происходило активное размножение тро- фозоитов (от 10000 до 140000 кл/мл), которые посте- пенно подвергались спонтанному инцистированию. Однако и после 30 сут (срок наблюдения) общее ко- личество клеток в культуре *T. pyriformis* составляло более 150000 кл/мл, из них около 60 % приходилось на долю цист.

Определение динамики роста культур *B. pseudo- mallei* в LB-бульоне обнаружило, что кривые размно- жения микроорганизма в сокультуре с *T. pyriformis*

характеризуются у всех исследованных штаммов от- четливым снижением количества жизнеспособных клеток (на два порядка и более), наблюдающимся в первые сутки. Но уже спустя 24 ч концентрация бактерий начинает возрастать и постепенно достигает показателей, близких к исходным ( $\approx 10^6$  м.к./мл). Кривые подъема концентрации имеют штаммовые различия: размножение *B. pseudomallei* 110 дости- гает максимума через 48 ч, тогда как для штамма *B. pseudomallei* 107 это время составляет не менее 6–7 сут (рис. 3). Следует отметить, что проявление инцистирующей активности штамма в отношении тетрахи- мен находится в соответствии со временем его размножения в клетках простейших: штамм, ко- торый с наибольшей скоростью размножается вну- три *T. pyriformis* (*B. pseudomallei* 110), вызывает их инцистирование в более короткий срок, чем штамм, характеризующийся меньшей скоростью размноже- ния (*B. pseudomallei* 107).

Таким образом, как следует из приведенных дан- ных, *B. pseudomallei* при взаимодействии с *T. pyri- formis* проявляет резистентность к фагоцитарной ак- тивности их вакуолей. После поглощения клетками тетрахи- мен происходит гибель значительной части микроорганизма, но оставшиеся бактерии, устой- чивые к фагоцитозу, восстанавливают свою числен- ность в различные промежутки времени в зависимо- сти от штамма. Первоначальное переваривание ча- сти бактерий позволяет размножиться трофозоитам, однако начавшееся внутриклеточное размножение микроорганизма подавляет жизнеспособность тро- фозоитов и ускоряет их инцистирование по сравне- нию со спонтанным цистообразованием. Очевидно, что избегание фагоцитарной активности тетрахи- мен и ускорение их инцистирования в гораздо большей степени выражено у вирулентного штамма *B. pseudo- mallei* 110 по сравнению с менее вирулентными куль- турами, особенно с *B. pseudomallei* 107.

Способность к выживанию возбудителя мелиои- доза в фагоцитарных вакуолях простейших, установ- ленная нами в ассоциации с *T. pyriformis*, отмечена ра- нее в работе Inglis T.J. et al. при взаимодействии этого микроорганизма с *Acanthamoeba* spp. [5]. В отличие от

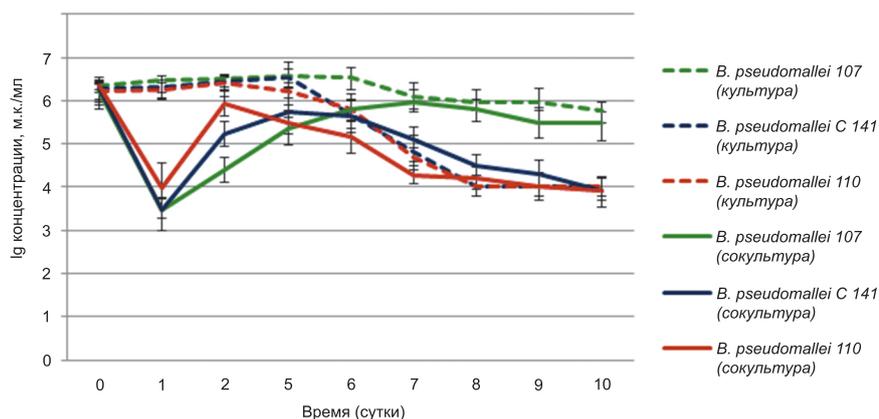


Рис. 3. Динамика размножения штаммов *B. pseudomallei* в контроле и в сокультуре с *T. pyriformis*

данных, представленных этими авторами, мы наблюдали другой характер фагоцитоза, связанный с особенностями физиологии самой модели, которая спонтанно поглощает бактерии, а не захватывает их путем coiling-фагоцитоза. Кроме того, в цитируемой работе не установлено влияние *B. pseudomallei* на цистообразование амёб. Результатом их взаимодействия, как показано Inglis T.J. *et al.*, являлось наступающее после поглощения *B. pseudomallei* разрушение трофозоитов и выход бактерий во внешнюю среду.

Индуктирующее влияние на инцистирование тетрахимен описано Pushkareva V.I. *et al.* при взаимодействии с простейшими этого вида *Listeria monocytogenes*. Показано также, что устойчивые к фагоцитозу листерии оставались жизнеспособными в цистах на протяжении 14 сут, сохраняя в них основные биологические свойства [9]. Как следует из наших данных, продолжительность сохранения цист в сокультуре *B. pseudomallei* с тетрахименами зависела от вирулентности штамма, но, в конечном итоге, даже при взаимодействии со слабовирулентным штаммом, каким является *B. pseudomallei* 107, наступало их разрушение и выход микроорганизма во внешнюю среду.

В общем виде эффект влияния *B. pseudomallei* на инцистирование *T. pyriformis* может быть связан с цитотоксическим действием на клетки тетрахимен продуктов размножения бактерий. В работе Pushkareva V.I. *et al.* непосредственная роль в этом процессе отводится основному фактору вирулентности *L. monocytogenes* – листериолизину (LLO), обладающему гемолитической активностью [9]. Известно, что возбудитель мелиоидоза продуцирует различные токсические факторы (протеазы, гемолизины, фосфолипазы), значение которых в реализации патогенности до конца не изучено [4]. С этой точки зрения оценить их роль как факторов вирулентности и одновременно факторов, индуцирующих инцистирование тетрахимен, не представляется возможным. Тем не менее, вполне возможно, что быстро размножающиеся вирулентные штаммы *B. pseudomallei*, которые в короткий срок вызывали инцистирование тетрахимен, внутриклеточно продуцировали в большом количестве токсические вещества, способные оказывать подавляющее действие на жизнедеятельность простейших, тогда как эти же самые вещества

в макроорганизме других хозяев могли не иметь решающего значения для вирулентности.

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

#### References / СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Berk S.G., Faulkner G., Garduno E., Joy M.C., Ortiz-Jimenez M.A., Garduno R.A. Packaging of live *Legionella pneumophila* into pellets expelled by *Tetrahymena* spp. does not require bacterial replication and depends on a dot/lcm-mediated survival mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74:2187–99. DOI: 10.1128/AEM.01214-07.
- Chen Y.S., Lin H.H., Mu J.J., Chiang C.S., Chen C.H., Buu L.M., Lin Y.E., Chen Y.L. Distribution of melioidosis cases and viable *Burkholderia pseudomallei* in soil: evidence for emerging melioidosis in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1432–4. DOI: 10.1128/JCM.01720-09.
- Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(2):383–416. DOI: 10.1128/CMR.18.2.383-416.2005.
- Galayov E.E., Brett P.J., DeShazer D. Molecular insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 2010; 64:495–517. DOI: 10.1146/annurev.micro.112408.134030.
- Inglis T.J., Rigby P., Robertson T.A., Dutton N.S., Henderson M., Chang B.J. Interaction between *Burkholderia pseudomallei* and *Acanthamoeba* spp. results in coiling phagocytosis, endamebic bacterial survival, and escape. *Infect. Immun.* 2000; 68(3):1681–6. DOI: 10.1128/IAI.68.3.1681-1686.2000.
- Inglis T.J., Sagripanti J.L. Environmental factors that affect the survival and persistence of *Burkholderia pseudomallei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72:6865–75. DOI: 10.1128/AEM.01036-06.
- Jones A.L., Beveridge T.J., Woods D.E. Intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*. *Infect. Immun.* 1996; 64:782–90.
- Limmathurotsakul D., Thammasart S., Warrasuth N., Thapanagulsak P., Jatapai A., Pengreungrojanachai V., Anun S., Joraka W., Thongkamkoon P., Saiyen P., Wongratanchewin S., Day N.P., Peacock S.J. Melioidosis in animals, Thailand, 2006–2010. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(2):325–7. DOI: 10.3201/eid1802.111347.
- Pushkareva V.I., Ermolaeva S.A. *Listeria monocytogenes* virulence factor Listeriolysin O favors bacteria growth in co-culture with the ciliate *Tetrahymena pyriformis*, causes protozoan encystment and promotes bacterial survival inside cysts. *BMC Microbiol.* 2010; 10:26. DOI: 10.1186/1471-2180-10-26.
- Strahl E.D., Gillaspay G.E., Falkinham J.O. Fluorescent acid-fast microscopy for measuring phagocytosis of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* by *Tetrahymena pyriformis* and their intracellular growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67:4432–9. DOI: 10.1128/AEM.67.10.4432-4439.2001.

#### Authors:

Korol' E.V., Merinova L.K., Shubnikova E.V., Merinova O.A., Senina T.V., Plekhanova N.G. Volgogradskiy nauchno-issledovatel'skiy protivochumnyy institut. Rossiyskaya Federatsiya, 400131, Volgograd, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

#### Об авторах:

Король Е.В., Меринова Л.К., Шубникова Е.В., Меринова О.А., Сенина Т.В., Плеханова Н.Г. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Поступила 16.06.17.

А.А.Крицкий, Н.Б.Челдышова, И.В.Тучков, Н.И.Смирнова

**РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *CTXA* И *TOXR* *VIBRIO CHOLERAЕ* МЕТОДОМ ОТ-ПЦР С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

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

**Цель.** Создание алгоритма оценки экспрессии структурных и регуляторных генов вирулентности *Vibrio cholerae* на модели генов *ctxA* и *toxR*, кодирующих и контролирующих биосинтез холерного токсина. **Материалы и методы.** В работе использовано 10 штаммов *Vibrio cholerae* классического и Эль Тор биоваров. Клонирование фрагментов генов проводили путем лигирования и трансформации. ОТ-ПЦР проводили на амплификаторах «БИС M112» и «Rotor-GeneQ». Обработку результатов осуществляли с помощью программного обеспечения к прибору Rotor-GeneQ (Software 1.8.17.5). **Результаты и выводы.** Разработан алгоритм оценки уровня экспрессии генов *ctxA* и *toxR* *V. cholerae* методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени. Указанный алгоритм позволяет быстро и эффективно проводить статистически значимое определение экспрессии структурных и регуляторных генов вирулентности *V. cholerae* и может быть использован для оценки вновь выделяемых штаммов холерного вибриона.

**Ключевые слова:** *V. cholerae*, холерный токсин, гены *ctxA* и *toxR*, ОТ-ПЦР, уровень экспрессии.

Корреспондирующий автор: Крицкий Андрей Александрович, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

A.A.Kritsky, N.B.Cheldyshova, I.V.Tuchkov, N.I.Smirnova

**Development of the Algorithm for Identification of the Level of *Vibrio cholerae ctxA* and *toxR* Gene Expression Using RT-PCR with Real-Time Hybridization-Fluorescent Registration of Results**

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

**Objective** of the study is to design the algorithm for assessment of expression of the structural and regulatory virulence *Vibrio cholerae* genes by the model of *ctxA* and *toxR* genes encoding and controlling biosynthesis of cholera toxin. **Materials and methods.** Utilized were 10 strains of *Vibrio cholerae*, classical and El Tor biovars. Cloning of gene fragments was carried out through transformation and ligation. RT-PCR was done in "BIS M112" and "Rotor-GeneQ" amplifiers. Processing of the results was performed by means of the software package in set with Rotor-GeneQ (Software 1.8.17.5). **Results and conclusions.** Developed has been the algorithm for evaluation of the level of expression of *V. cholerae ctxA* and *toxR* genes applying RT-PCR with real-time hybridization-fluorescent registration of results. The stated algorithm allows for rapid and effective statistically significant specification of the expression of structural and regulatory virulence *V. cholerae* genes and can be used for evaluation of newly discovered cholera vibrio strains.

**Key words:** *V. cholerae*, cholera toxin, *ctxA* and *toxR* genes, RT-PCR, level of expression.

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

Corresponding author: Andrey A. Kritsky, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

**Citation:** Kritsky A.A., Cheldyshova N.B., Tuchkov I.V., Smirnova N.I. Development of the Algorithm for Identification of the Level of *Vibrio cholerae ctxA* and *toxR* Gene Expression Using RT-PCR with Real-Time Hybridization-Fluorescent Registration of Results. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:53–57. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-53-57

Возбудителем седьмой пандемии холеры, продолжающейся в настоящее время, является *Vibrio cholera* O1 биовара Эль Тор. Для генома данного возбудителя характерна высокая пластичность, обусловленная входящими в его состав мобильными генетическими элементами (МГЭ), которые несут гены вирулентности, пандемичности и антибиотикорезистентности. Одним из таких генов, расположенных в геноме профага СТХφ, является ген *ctxA*, ответственный за синтез А-субъединицы холерного токсина (ХТ), вызывающего основной клинический симптом холеры – профузную диарею. Регуляция экспрессии гена *ctxA*, согласно последним исследованиям, осуществляется генной сетью вирулентности, состоящей из нескольких регуляторных генов. Одним из глобальных генов-регуляторов, координирующих работу указанной генной сети, является ген *toxR* [6].

Следует отметить, что экспрессия гена *toxR* и регулируемого им через генную сеть гена *ctxA* не является постоянной и зависит от ряда факторов внешней среды (температуры, аэрации, наличия питательных веществ и др.). В то же время уровень экспрессии указанных структурных и регуляторных генов определяет степень вирулентности того или иного штамма *V. cholerae*. В связи с этим, исследование экспрессии генов, ответственных за вирулентность, представляет особый интерес.

На сегодняшний день существует большое количество различных методов оценки уровня экспрессии генов. Большинство из них основаны на количественном определении транскриптов. Среди них можно выделить гибридационные (гибридизация *in situ*, Нозерн-блот гибридизация, микрочипы и др.), амплификационные методы (NASBA, ОТ-ПЦР, лигазная цепная реакция и др.) и методы секвени-

рования (высокопроизводительное параллельное секвенирование РНК). Одним из наиболее распространенных является метод обратной транскрипции с последующим проведением полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ОТ-ПЦР). Преимущества данного метода заключаются в его высокой чувствительности (на 3–4 порядка выше, чем Нозерн-блот гибридизация), специфичности, способности определять единичные копии транскрипта, отсутствии дополнительных манипуляций с продуктом амплификации, а также в относительной дешевизне проводимого исследования [4, 8, 11].

Метод ОТ-ПЦР предусматривает последовательное использование ОТ и ПЦР. При этом экспрессия гена оценивается по количеству молекул кДНК, полученных в результате обратной транскрипции из молекул РНК исследуемого гена, относительно ПЦР-стандартов с установленной концентрацией. Для повышения точности полученных результатов окончательная оценка уровня экспрессии генов осуществляется методом  $2^{-\Delta\Delta CT}$  [3], который учитывает уровень экспрессии какого-либо гена «домашнего хозяйства», считающийся постоянным.

Указанный метод оценки относительной экспрессии генов, широко используемый зарубежными и отечественными исследователями, сравнительно прост в выполнении и более экономически выгоден, чем вышеназванные методы при той же точности и воспроизводимости результатов [5, 7, 9, 10]. Однако до настоящего момента четкого алгоритма исследования экспрессии структурных и регуляторных генов у штаммов *V. cholerae* этим методом не разработано.

В связи с этим целью данной работы явилось создание алгоритма оценки уровня экспрессии структурных и регуляторных генов вирулентности холерного вибриона на модели генов *ctxA* и *toxR*, полностью адаптированного для работы с возбудителем холеры, относящимся ко II группе патогенности.

### Материалы и методы

В работе использовали 20 штаммов *V. cholerae* классического (10 штаммов) и Эль Тор (10) биоваров, выделенных на территории России и зарубежных стран в различные временные периоды, и коммерческий штамм *Escherichia coli* TOP10. Штаммы культивировали на агаре и бульоне LB и АК1 при 30 или 37 °С. Все работы, связанные с культурами *V. cholerae* и *E. coli*, проводились в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)», СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней», СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности».

Выделение тотальной (тДНК) и плазмидной ДНК (пДНК) проводили с использованием коммер-

ческих наборов «AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit» (для тДНК) и «Invitrogen PureLink Quick Plasmid DNA Miniprep Kit» (для пДНК) в соответствии с протоколом производителя и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». Для выделения и очистки РНК использовали набор «Promega Total RNA Isolation System». Качество выделенной плазмидной ДНК и РНК оценивали с помощью спектрофотометра «Biowave DNA» («Biochrom Ltd», Великобритания), проводя измерение оптической плотности при разной длине волн и оценивая соотношения результатов измерений.

ПЦР для наработки фрагментов ДНК проводили в объеме 25 мкл ПЦР-смеси, содержащей по 6 п/моль каждого праймера, 1,5 ед. Taq-pol, 2,5 мкл 10-кратного ПЦР-буфера (рН 8,4), 25 мМ раствора MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ дНТФ, деионизованную воду и 10 мкл ДНК. ПЦР осуществляли на амплификаторе с горячей крышкой «БИС M112» («БИС-Н», Россия) по следующей программе: шаг 1: 95 °С – 5 мин (1 цикл), шаг 2: 95 °С – 30 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 30 с (35 циклов). После последнего цикла амплификации пробирки прогревали при 72 °С в течение 6 мин 2 цикла для образования «липких концов». Качество наработанного продукта оценивали методом электрофореза в 2 % агарозном геле.

Клонирование фрагментов генов проводили в два этапа (лигирование и трансформация) с помощью набора «Invitrogen TOPO® TA Cloning® Kit» в соответствии с инструкцией. Колонии трансформантов, содержащих плазмиду, отбирали путем посева на LB-агар, содержащий ампициллин (50 мкг/мл).

Для подготовки ПЦР-стандарта рассчитывали количество копий плазмиды на единицу объема в соответствии с руководством [2]. Далее из образца плазмидной ДНК готовили семь серийных разведений ( $10^{-1}$ – $10^{-7}$ ), с которыми ставили ПЦР в режиме реального времени со специфическими праймерами и TaqMan зондами (табл. 1), рассчитанными с помощью on-line программы «PrimerQuest Tool» IDT («Integrated DNA Technologies»). Оценка эффективности реакции производили по значениям коэффициентов корреляции R и R<sup>2</sup>, а также коэффициентов вариации образцов (КВО). По результатам ПЦР для дальнейшей работы подбирали 3–5 разведений стандартов с минимальными КВО и коэффициентами корреляции около 0,99, при эффективности ПЦР ( $1 \pm 0,15$ ).

Реакцию ОТ выполняли с использованием набора «Реверта» вариант 100 согласно инструкции. Определение продукции ХТ осуществляли с помощью иммуноферментного метода GM1 ELISA, описанного ранее [1].

ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием амплификатора «Rotor-GeneQ» («QIAGEN», ФРГ) по следующей программе: шаг 1:

Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов, используемых для определения относительной экспрессии структурных и регуляторных генов *V. cholerae*

Название праймера/зонда	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Авторы
<i>ctxA-F</i> <i>ctxA-R</i> <i>ctxA-probe</i>	TGCCAAGAGGACAGAGTGAG ATCCATCATCGTGCCTAACA (FAM)-TCCCCTGTGAGTTCCTTGCATG-(BHQ1)	Рассчитаны авторами
<i>recA-F</i> <i>recA-R</i> <i>recA-probe</i>	ACGGGTAACCTCAAGCAATC TATCCAAACGAACAGAAGCG (FAM)-CCACTGGCGGTAACGCACTGA-(BHQ1)	Рассчитаны авторами
<i>toxR-F</i> <i>toxR-R</i> <i>toxR-probe</i>	CGGAACCGTTTTGACGTATT CTCGCAATGATTTGCATGAC (FAM)-TAAACCAAGCCATTTCGAC-(BHQ1)	Fykse E.M., 2007 [12]

95 °C – 5 мин (1 цикл); шаг 2: 95 °C – 15 с, 60 °C – 60 с (35 циклов), с детекцией флуоресцентного сигнала на канале Green во время стадии отжига/элонгации. ПЦР проводили в объеме 25 мкл реакционной смеси, содержащей по 12 пмоль/мкл каждого праймера, 6 пмоль/мкл зонда (табл. 1); 1,5 ед. Taq-pol; 2,5 мкл 10-кратного ПЦР-буфера (pH 8,4), 25 мМ раствора MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ дНТФ; 2,5 мкл образца кДНК; деионизованную воду до конечного объема.

Статистическую обработку данных проводили с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

### Результаты и обсуждение

Предлагаемый нами алгоритм определения уровня экспрессии генов *ctxA* и *toxR* включает пять этапов: подготовка ПЦР-стандартов плазмидной ДНК с известной концентрацией; выделение и очистка РНК из исследуемых штаммов; синтез кДНК на матрице РНК путем ОТ; проведение ПЦР в режиме реального времени; обработка и анализ полученных данных.

Подготовка ПЦР-стандартов плазмидной ДНК с известной концентрацией заключается в наработке требуемых фрагментов генов путем амплификации со специфическими праймерами на гены *ctxA* (*ctxA-F*, *ctxA-R*), *toxR* (*toxR-F*, *toxR-R*) и *recA* (*recA-F*, *recA-R*) (табл. 1); лигировании полученного фрагмента в плазмиду pCR 2.1; трансформации лигированной плазмиды в клетки *E. coli* TOP10; отборе трансформированных клонов и их проверке на наличие требуемых фрагментов генов с помощью ПЦР; выделении и очистки плазмидной ДНК; расчете копийности плазмид; подготовке серийных разведений.

Выделение и очистка РНК из исследуемых штаммов осуществлялась последовательно: после подбора с помощью спектрофотометра «BiowaveDNA» достаточного количества клеток ( $8 \times 10^8$  КОЕ/мл) проводили их лизис, удаление ДНК с помощью ДНКазы и очистку РНК. Для предотвращения быстрого разрушения РНК рибонуклеазами, последние ингибировали с помощью гуанидинизотиоцианата или набора RiboLock. Далее с помощью спектрофотометра определяли количество выделенной РНК.

Синтез кДНК на матрице РНК методом ОТ выполняли с использованием набора «Реверта» вари-

ант 100. В реакцию ОТ брали 950 нг РНК (в соответствии с инструкцией), на основе которой получали кДНК.

Для оценки уровня экспрессии генов проводили ПЦР в режиме реального времени. В качестве ПЦР-стандартов использовали три разведения плазмидной ДНК, содержащей участок исследуемого гена. Детекцию уровня сигнала осуществляли во время стадии отжига/элонгации на канале Green.

Обработку результатов осуществляли с использованием программного обеспечения к прибору Rotor-GeneQ (Software 1.8.17.5), учитывая коэффициенты корреляции R и R<sup>2</sup>, КВО и эффективность ПЦР. В качестве штамма-калибратора выбрали штамм *V. cholerae* классического биовара 569В, гиперпродуцент ХТ, чья экспрессия была принята за единицу (табл. 2).

Для определения эффективности разработанного алгоритма исследовали 20 штаммов *V. cholerae*: 10 штаммов классического биовара, 7 штаммов природных генетических вариантов биовара Эль Тор, 2 типичных штамма биовара Эль Тор и 1 предпандемический штамм биовара Эль Тор, выделенных в разные периоды времени. В качестве альтернативного метода использовали методику ИФА GM1-ELISA, позволяющую определить уровень продукции ХТ в мкг/мл (табл. 2).

Полученные результаты уровня экспрессии гена *ctxA* показали значимый уровень корреляции с продукцией ХТ, определенного методом ИФА GM1-ELISA ( $r_s=1$ ). Так, наиболее высокая экспрессия структурного гена *ctxA* и регуляторного гена *toxR* наблюдалась у штамма-гиперпродуцента ХТ *V. cholerae* М-29. Штаммы биовара Эль Тор отличались более низкими показателями экспрессии указанных генов и уровнем продукции ХТ по сравнению со штаммами холерного вибриона классического биовара, что согласуется с данными литературы [1, 5]. Наиболее низкой продукцией ХТ и экспрессией генов *ctxA* и *toxR* отличался типичный штамм *V. cholerae* О1 биовара Эль Тор М-887, в отличие от штаммов-геновариантов. При этом уровень экспрессии регуляторного гена *toxR* показал статистически значимую корреляцию с экспрессией структурного гена *ctxA* ( $r_s=0,991$ ) и продукцией ХТ ( $r_s=0,991$ ). Полученные результаты позволяют сделать вывод об эффектив-

Значения относительной экспрессии генов *ctxA*, *toxR* и продукции холерного токсина у штаммов *V. cholerae* классического и Эль Тор биоваров

Штаммы	Место и год выделения	Относительная экспрессия генов		Продукция ХТ GM-1 ELISA, мкг/мл
		<i>ctxA</i>	<i>toxR</i>	
<i>V. cholerae</i> classica 569B	Индия, 1950	1	1	10 ± 1
<i>V. cholerae</i> classica M-8	Сталинград, 1942	0,45 ± 0,05	0,70 ± 0,05	4,3 ± 0,5
<i>V. cholerae</i> classica M-9	Астрахань, 1942	0,25 ± 0,05	0,60 ± 0,05	2,3 ± 0,3
<i>V. cholerae</i> classica M-14	Саратов, 1942	0,70 ± 0,05	0,90 ± 0,05	6,5 ± 0,5
<i>V. cholerae</i> classica M-16	Саратов, 1942	0,55 ± 0,05	0,70 ± 0,05	4,8 ± 0,5
<i>V. cholerae</i> classica M-19	Саратов, 1942	0,45 ± 0,05	0,65 ± 0,05	4,2 ± 0,5
<i>V. cholerae</i> classica M-24	Саратов, 1942	0,30 ± 0,05	0,55 ± 0,07	2,6 ± 0,6
<i>V. cholerae</i> classica M-29	Астрахань, 1942	1,35 ± 0,06	1,55 ± 0,08	14 ± 0,9
<i>V. cholerae</i> classica M-30	Астрахань, 1942	0,45 ± 0,04	0,6 ± 0,05	3,9 ± 0,3
<i>V. cholerae</i> classica B 1307	Пакистан, 1964	0,40 ± 0,05	0,55 ± 0,05	3,5 ± 0,3
<i>V. cholerae</i> eltor Mac757	Индонезия, 1937	0,02 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,15 ± 0,05
<i>V. cholerae</i> eltor M-818	Балаково, 1970	0,03 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,2 ± 0,05
<i>V. cholerae</i> eltor M-887	Астрахань, 1970	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,02	0,1 ± 0,01
<i>V. cholerae</i> eltor M-1270	Набережные Челны, 1993	0,02 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,15 ± 0,05
<i>V. cholerae</i> eltor M-1326	Дагестан, 1994	0,02 ± 0,01	0,1 ± 0,03	0,2 ± 0,05
<i>V. cholerae</i> eltor P17644	Ачинск, 1997	0,06 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,5 ± 0,1
<i>V. cholerae</i> eltor M-1429	Белорецк, 2004	0,06 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,5 ± 0,1
<i>V. cholerae</i> eltor P18899	Мурманск, 2006	0,07 ± 0,01	0,1 ± 0,03	0,6 ± 0,1
<i>V. cholerae</i> eltor J3226	Москва, 2010	0,07 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,6 ± 0,1
<i>V. cholerae</i> eltor 301	Таганрог, 2011	0,13 ± 0,02	0,2 ± 0,04	1,2 ± 0,5

ности разработанного нами алгоритма определения уровня экспрессии структурных и регуляторных генов вирулентности холерного вибриона.

Таким образом, разработанный алгоритм оценки уровня экспрессии генов *ctxA* и *toxR* *V. cholerae* методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени позволяет быстро и эффективно провести статистически значимое сравнительное определение экспрессии структурных и регуляторных генов *V. cholerae*. Возможность количественной оценки экспрессии сразу двух генов, ответственных за продукцию ХТ, дает основание рекомендовать использование алгоритма для сравнительного определения токсигенности вновь выделяемых штаммов холерного вибриона.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Смирнова Н.И., Чельдышова Н.Б., Заднова С.П., Кутырев В.В. Молекулярно-генетические особенности штаммов *Vibrio cholerae* classica, вызвавших эпидемию азиатской холеры в России в 1942 г. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2001; 4:12–6.
- Creating Standard Curves with genomic DNA or plasmid DNA templates for use in quantitative PCR. Applied Biosystems; 2003.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using Real-Time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> Method. *Methods.* 2001; 25(4):402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Malinen E., Kassinen A., Rinttila T., Palva A. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and

dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology.* 2003; 149(Pt 1):269–77. DOI: 10.1099/mic.0.25975-0.

5. Marashi S.M., Bakhshi B., Fooladi A.A., Tavakoli A., Sharifnia A., Pourshafie M.R. Quantitative expression of cholera toxin mRNA in *Vibrio cholerae* isolates with different CTX cassette arrangements. *J. Med. Microbiol.* 2012; 61(Pt 8):1071–3. DOI: 10.1099/jmm.0.038752-0.

6. Matson J.S., Withey J.H., DiRita V.J. Regulatory networks controlling *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect. Immun.* 2007; 75(12):554–29. DOI: 10.1128/IAI.01094-07.

7. Muller P.Y., Janovjak H., Miserez A.R., Dobbie Z. Processing of gene expression data generated by quantitative Real-Time RT-PCR. *Biotechniques.* 2002; 32(6):1372–9.

8. Palmer S., Wiegand A.P., Maldarelli F., Bazmi H., Mican J.M., Polis M., Dewar R.L., Planta A., Liu S., Metcalf J.A., Mellors J.W., Coffin J.M. New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(10):4531–6.

9. Sharkey F.H., Banat I.M., Marchant R. Detection and quantification of gene expression in environmental bacteriology. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70(7):3795–806. DOI: 10.1128/AEM.70.7.3795–3806.2004.

10. Smith C.J., Osborn A.M. Advantages and limitations of quantitative PCR(Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2009; 67(1):6–20. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x.

11. Wang T., Brown M.J. mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection. *Anal. Biochem.* 1999; 269(1):198–201. DOI: 10.1006/abio.1999.4022.

12. Fyke E.M., Skogan G., Davies W., Olsen J.S., Blatny J.M. Detection of *Vibrio cholerae* by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73(5):1457–66. DOI: 10.1128/AEM.01635-06.

#### References

- Smirnova N.I., Cheldyshova N.B., Zаднова S.P., Kutyrev V.V. [Molecular-genetic peculiarities of *Vibrio cholerae* classica strains that caused epidemic of Asian cholera in Russia in 1942]. *Mol. Genet. Microbiol., Virusol.* 2001; 4: 12–6.
- Creating Standard Curves with genomic DNA or plasmid DNA templates for use in quantitative PCR. Applied Biosystems; 2003.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression

- data using Real-Time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. *Methods*. 2001; 25(4):402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
4. Malinen E., Kassinen A., Rinttila T., Palva A. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology*. 2003; 149(Pt 1):269–77. DOI: 10.1099/mic.0.25975-0.
5. Marashi S.M., Bakhshi B., Fooladi A.A., Tavakoli A., Sharifnia A., Pourshafie M.R. Quantitative expression of cholera toxin mRNA in *Vibrio cholerae* isolates with different CTX cassette arrangements. *J. Med. Microbiol.* 2012; 61(Pt 8):1071–3. DOI: 10.1099/jmm.0.038752-0.
6. Matson J.S., Withey J.H., DiRita V.J. Regulatory networks controlling *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infect. Immun.* 2007; 75(12):554–29. DOI: 10.1128/IAI.01094-07.
7. Muller P.Y., Janovjak H., Miserez A.R., Dobbie Z. Processing of gene expression data generated by quantitative Real-Time RT-PCR. *Biotechniques*. 2002; 32(6):1372–9.
8. Palmer S., Wiegand A.P., Maldarelli F., Bazmi H., Mican J.M., Polis M., Dewar R.L., Planta A., Liu S., Metcalf J.A., Mellors J.W., Coffin J.M. New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(10):4531–6.
9. Sharkey F.H., Banat I.M., Marchant R. Detection and quantification of gene expression in environmental bacteriology. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70(7):3795–806. DOI: 10.1128/AEM.70.7.3795–3806.2004.
10. Smith C.J., Osborn A.M. Advantages and limitations of quantitative PCR(Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2009; 67(1):6–20. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x.
11. Wang T., Brown M.J. mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection. *Anal. Biochem.* 1999; 269(1):198–201. DOI: 10.1006/abio.1999.4022.
12. Fykse E.M., Skogan G., Davies W., Olsen J.S., Blatny J.M. Detection of *Vibrio cholerae* by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73(5):1457–66. DOI: 10.1128/AEM.01635-06.

**Authors:**

*Kritsky A.A., Cheldyshova N.B., Tuchkov I.V., Smirnova N.I.* Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

**Об авторах:**

*Крицкий А.А., Чельдышова Н.Б., Тучков И.В., Смирнова Н.И.* Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Поступила 11.07.17.

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

## ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ШТАММОВ БРУЦЕЛЛ, ВЫДЕЛЕННЫХ В СЕВЕРО-КАВКАЗСКОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ

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

**Цель исследования** – изучение генетического разнообразия штаммов *Brucella* разных видов, изолированных от людей и мелких млекопитающих животных на территории Северо-Кавказского федерального округа методом MLVA14, определение взаимосвязи сформированных кластеров с местом, временем и объектом выделения. **Материалы и методы.** Проведено MLVA14 генотипирование 91 штамма *Brucella* spp., выделенных от больных людей, мелких млекопитающих и сельскохозяйственных животных. Размеры ампликонов сравнивали с базой MLVA Bank 5.0 tutorial version 1.6. На основании полученных данных построена дендрограмма филогенетических связей изученных штаммов. **Результаты и выводы.** На основании MLVA-генотипирования изученные штаммы разделены на 61 MLVA14 генотип. Штаммы подвидов *B. suis*, *B. abortus*, *B. melitensis* на дендрограмме формируют отдельные кластеры. Одинаковые MLVA14 типы *B. melitensis* имеют штаммы, выделенные во время групповых заболеваний людей бруцеллезом, штаммы *B. suis* приурочены к эпизоотиям среди мелких млекопитающих, которые могут протекать на различных административных территориях. Полученные данные могут быть использованы для мониторинга за возбудителем бруцеллеза, в том числе в качестве эффективного инструмента ретроспективного эпидемиологического анализа.

**Ключевые слова:** бруцеллез, мультилокусный анализ числа варьируемых тандемных повторов, филогенетический анализ.

Корреспондирующий автор: Кузнецова Ирина Владимировна, e-mail: labindic@mail.ru.

I.V.Kuznetsova, D.A.Kovalev, Yu.M.Evchenko, L.I.Shakirova, N.M.Shvetsova, D.G.Ponomarenko,  
S.V.Pisarenko, A.M.Zhirov, A.A.Lukina, A.N.Kulichenko

## The Study of Genetic Diversity of *Brucella* Strains Isolated in the North Caucasian Federal District

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

**Objective** of the study is to investigate genetic diversity of *Brucella* strains of various species, isolated from humans and small mammals in the territory of the North Caucasus Federal District using MLVA14, as well as to identify the correlation between the formed clusters and the place setting, the time setting, and object of isolation. **Materials and methods.** Carried out has been MLVA14 genotyping of 91 *Brucella* spp. strains isolated from patients, small mammals and live-stock animals. The sizes of amplicons were compared with MLVA Bank 5.0 database, tutorial version 1.6. Based on the data obtained, constructed was a dendrogram of phylogenetic interrelations of the studied strains. **Results and conclusions.** Using the data on MLVA genotyping, the studied strains were subdivided into 61 MLVA14 genotypes. Strains of *B. suis*, *B. abortus*, *B. melitensis* form separate clusters in the dendrogram. Strains isolated during cluster cases of brucellosis in humans have similar MLVA14 *B. melitensis* types, *B. suis* strains are confined to the epizooties among small mammals that may occur in different administrative territories. The data can be used for monitoring of brucellosis agent, including as an effective tool for retrospective epidemiological analysis.

**Keywords:** brucellosis, multilocus VNTR-analysis, phylogenetic analysis.

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

Corresponding author: ..... e-mail: labindic@mail.ru.

**Citation:** Kuznetsova I.V., Kovalev D.A., Evchenko Yu.M., Shakirova L.I., Shvetsova N.M., Ponomarenko D.G., Pisarenko S.V., Zhirov A.M., Lukina A.A., Kulichenko A.N. The Study of Genetic Diversity of *Brucella* Strains Isolated in the North Caucasian Federal District. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:58–62. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-58-62

Бруцеллез – инфекционно-аллергическая болезнь, общая для человека и животных, относящаяся к особо опасным инфекциям. Эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации продолжает оставаться напряженной и определяется эпизоотическим неблагополучием среди мелкого и крупного рогатого скота. Наиболее высокий уровень заболеваемости людей бруцеллезом регистрируется в Северо-Кавказском федеральном округе [1].

В настоящее время в мировой практике для анализа геномного полиморфизма возбудителя бруцеллеза широкое применение получил многолокусный анализ варьируемых тандемных повторов (Multiple

Locus Variable-Number Tandem Repeats Analysis – MLVA) как в качестве самостоятельного, так и в сочетании с другими методами генетического типирования [6, 7, 8]. Данный метод позволяет проводить внутривидовую дифференциацию штаммов возбудителя инфекций, согласующуюся с классическими методиками, определять их принадлежность к определенному географическому региону, группировать по ряду других свойств.

Целью данной работы было изучение генетического разнообразия штаммов *Brucella* разных видов, изолированных от людей и мелких млекопитающих животных на территории Северо-Кавказского фе-

дерального округа методом MLVA14, определение взаимосвязи сформированных кластеров с местом, временем и объектом выделения.

### Материалы и методы

В работе использованы 27 штаммов (24 штамма – *B. melitensis*, 2 – *B. abortus* и 1 – *B. suis*), изолированных от больных людей и 64 штамма *B. suis*, выделенных от мелких млекопитающих (61) и сельскохозяйственных животных (3).

Бактерии выращивали на среде эритрит-агар при температуре 37 °С согласно МУ 3.1.7.1189-03. Выделение ДНК *Brucella* spp. из двухсуточной агаровой культуры осуществляли в присутствии гуанидинтиоцианата с использованием сертифицированных коммерческих наборов «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» (ИнтерЛабСервис, Россия) в соответствии с инструкцией.

MLVA проводили по схеме, предложенной Le Fleche *et al.* [5], учитывая размер 15 VNTR-локусов *Brucella* spp. В ходе исследования locus Bruce 30 исключили из схемы типирования, поскольку он не амплифицировался в ПЦР с ДНК изучаемых штаммов. Размеры ампликонов определяли с помощью автоматизированной станции микрокапиллярного электрофореза «Experion System» (Bio-Rad Laboratories, США). Полученные данные сравнивали с базой MLVA Bank 5.0 tutorial version 1.6 [9].

Методом попарного невзвешенного кластирования с арифметическим усреднением (UPGMA), с помощью компьютерной программы START 2 [10], построена дендрограмма штаммов возбудителя бруцеллеза. Оценка статистической значимости различий частот наблюдений проводилась по критерию Фишера [3].

### Результаты и обсуждение

Изоляты *B. suis* (биовары 1, 5) выделены из образцов полевого материала, собранного на территории Ставропольского края, Республики Северная Осетия – Алания (РСО), Чеченской, Ингушской и Кабардино-Балкарской Республик в 1959–1984 гг. Остальные штаммы бруцеллезного микроба выделены из крови больных людей в 2011–2014 гг.: в Республике Дагестан – 21 культура *B. melitensis* (биовар 1, 3), Республике Калмыкия – 3 культуры *B. melitensis* (биовар 3) и 2 культуры *B. abortus* (биовар 3), Чеченской Республике – 1 культура *B. suis* (биовар 5). Часть штаммов *B. suis* выделена при проведении исследований, направленных на доказательство существования природной очаговости бруцеллеза, где носителями являются мелкие мышевидные грызуны [2, 4]. Штаммы от мелких млекопитающих выделены в зоне Ассино-Сунженского междуречья на границе республик Ингушетия и Северная Осетия – Алания, Кабардино-Балкарской и Чеченской в период, охватывающий конец 50-х и

начало 80-х гг. прошлого столетия. Эта зона является природным очагом туляремии и представляет собой лесостепь предгорной зоны Главного Кавказского хребта. Долина занята фруктовыми садами, виноградниками, посевами колосовых и пропашных культур. Среди этих угодий имеются небольшие участки целины с наличием кустарников. Поселения мелких млекопитающих, мышей разных видов, полевок носят мозаичный характер.

Изученные штаммы в ходе исследования были разделены на 61 MLVA14 генотип. На основании полученных данных построена дендрограмма, отображающая филогенетическое родство изучаемых изолятов (рисунок).

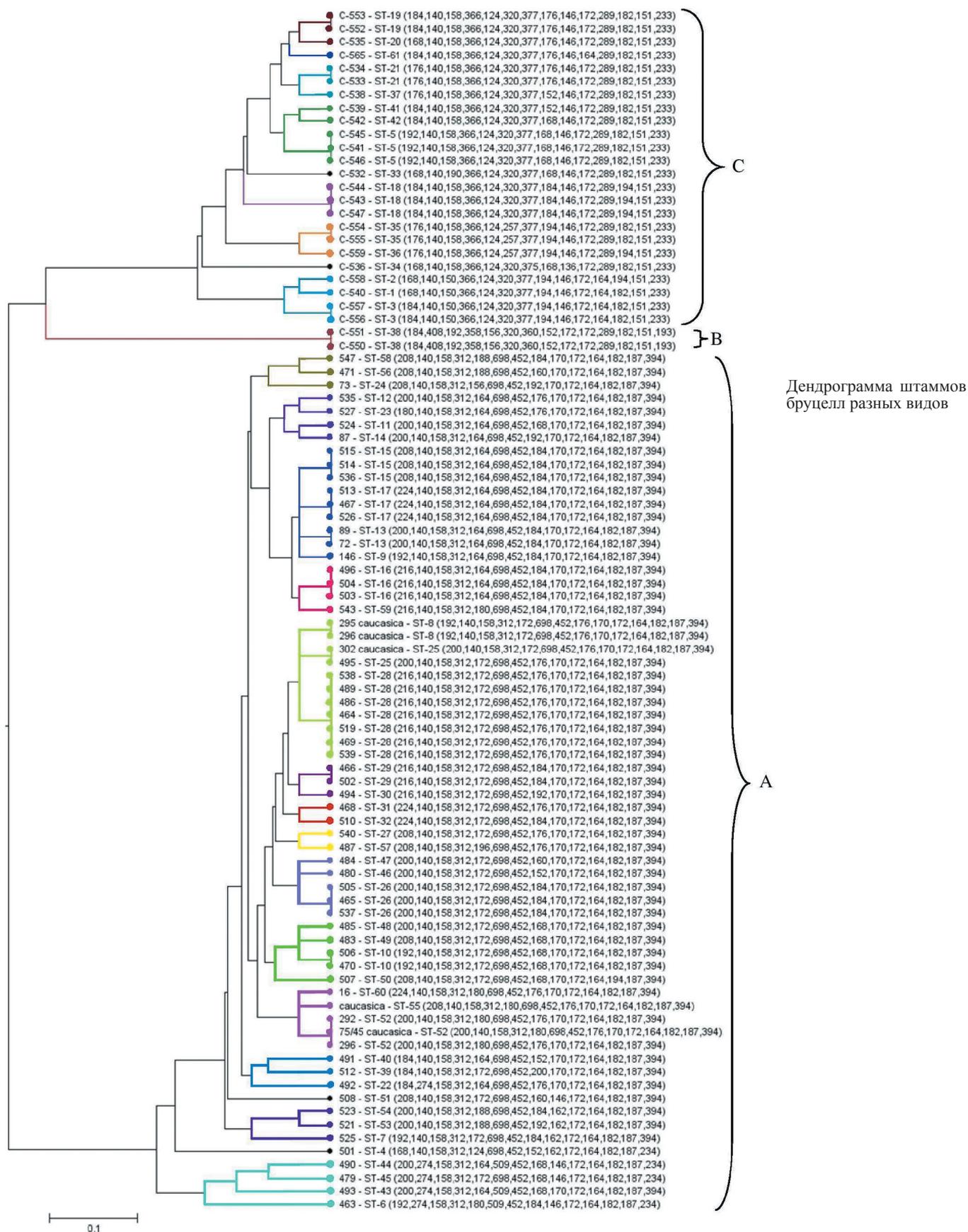
Как видно из рисунка, штаммы бруцеллы разных подвидов формируют отдельные кластеры: А – *B. suis*, В – *B. abortus*, С – *B. melitensis*.

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

В кластере С конечные ветви дендрограммы сформированы штаммами, имеющими одинаковый генотип. Поскольку данные эпидемиологического расследования отсутствуют, в качестве критериев групповой заболеваемости бруцеллезом нами использованы сведения о месте и времени изоляции культур от больных людей. Как следует из табл. 1, насчитывается семь генетически однотипных групп штаммов бруцеллезной инфекции. Из них в пяти случаях имеют место совпадения времени и мест выделения культур бруцеллеза. Например, группа 1 состоит из штаммов, выделенных в сроки, укладывающиеся в инкубационный период болезни, на территориях населенных пунктов, расположенных в 30–40 км друг от друга. Группа 3 сформирована штаммами, изолированными на значительном расстоянии (более 200 км) друг от друга. Не исключено, что они являются причиной заболеваний с общим источником заражения, однако в данном случае формальных признаков такой общности не наблюдается.

Тем не менее, использование критерия Фишера ( $\varphi = 1,654$ ) позволяет заключить, что общий MLVA14 тип чаще наблюдается у штаммов, выделенных в период одного группового заболевания людей бруцеллезом.

При анализе групп и подгрупп кластера А по географическому положению места выделения возбудителя отмечено, что штаммы разных MLVA14 типов распределены по территории Ассино-Сунженского междуречья не системно. Всего выделено четыре группы с разным количеством подгрупп в каждой. В первой группе – одна подгруппа, вторая группа представлена одним штаммом – 501, в третьей группе – 9 подгрупп, в четвертой – 3. Однако при распределении по годам отмечено, что на фоне изоляции единичных штаммов разных типов имеет место одновременное выделение двух-трех штаммов с одинаковым генотипом. Такого рода случаи представлены в табл. 2, из которой следует, что од-



нотипные штаммы вызывают эпизоотии на определенных территориях, причем в разные годы эти территории меняются, т.е. штаммы с определенными генотипами перемещаются в пределах рассматри-

ваемого Ассино-Сунженского междуречья.

Таким образом, в результате анализа полученного филогенетического дерева, построенного на основании MLVA 14 генотипирования 91 штамма бруцелл разных

Таблица 1

Сведения о штаммах бруцелл, выделенных из клинического материала

Группа	Вид	ST-тип	Штамм	Место выделения	Дата выделения
1	<i>B. abortus</i>	38	C-550	Республика Калмыкия, Целинный р-н, п. Аршан	18.07.12
		38	C-551	Республика Калмыкия, Ики-Бурульский р-н, п. Оргакин	26.07.12
2	<i>B. melitensis</i>	3	C-556	Республика Дагестан, Хунзахский р-н, с. Орота	18.07.12
		3	C-557	Республика Дагестан, Хунзахский р-н, с.Орота	18.07.12
3	<i>B. melitensis</i>	35	C-555	Республика Дагестан, Хунзахский р-н, с. Мочох	18.07.12
		35	C-554	Республика Дагестан, Тарумовский р-н, с. Новодмитриевка	16.07.22
4	<i>B. melitensis</i>	18	C-547	Республика Дагестан, Карабудахкентский р-н, с. Карабудахкент	18.06.12
		18	C-543	Республика Дагестан, Лавашинский р-н, с. Арада-Чугли	30.05.12
		18	C-544	Республика Дагестан, Лавашинский р-н, с. Арада-Чугли	30.05.12
5	<i>B. melitensis</i>	5	C-546	Республика Дагестан, Городской округ, г. Каспийск	12.06.12
		5	C-541	Республика Дагестан, Карабудахкентский р-н, п. Манас	02.05.12
		5	C-545	Республика Дагестан, Городской округ, г. Каспийск	12.06.12
6	<i>B. melitensis</i>	21	C-533	Республика Дагестан, Тарумовский р-н, с. Кочубей	11.01.12
		21	C-534	Республика Дагестан, Тарумовский р-н, кутан М. Горького	11.01.12
7	<i>B. melitensis</i>	19	C-552	Республика Калмыкия, Малодербетовский р-н, п. Малые Дербеты	17.08.12
		19	C-553	Республика Калмыкия, Черноземельский р-н, п. Комсомольский	16.11.12

видов, сформированы MLVA14 генотипы трех уровней дискриминации. Штаммы разных подвидов бруцеллезной инфекции формируют отдельные кластеры филогенетического дерева. Одинаковые MLVA14 типы *B. melitensis* имеют штаммы, выделенные во время групповых заболеваний людей бруцеллезом.

Штаммы *B. suis* с одинаковыми MLVA14 типами приурочены к эпизоотиям среди мелких млекопитающих, которые могут протекать на различных административных территориях.

Метод MLVA 14 успешно применен для мониторинга возбудителя бруцеллеза, в том числе в каче-

Таблица 2

Сведения о штаммах *B. suis*, выделенных из полевого материала

Группы	Подгруппа	ST-тип	Штамм	Место выделения	Объект выделения	Дата выделения
1	1	44	490	ЧР, Грозненский р-н	Домовая мышь	01.01.65
		43	493	ЧР, Грозненский р-н	Домовая мышь	27.03.65
3	3	22	492	РИ, Сунженский р-н	Полевая мышь	01.01.65
		40	491	ЧР, Грозненский р-н	Полевая мышь	01.01.65
	6	49	483	ЧР, Грозненский р-н	Полевая мышь	01.01.65
		48	485	РИ	Нет данных	01.01.65
	8	57	487	ЧР, Грозненский р-н	Домовая мышь	01.01.65
		30	494	РИ, Сунженский р-н	Обыкновенная полевка	20.01.65
	9	28	486	РИ	Домовая мышь	01.01.65
		28	489	ЧР, Грозненский р-н	Домовая мышь	01.01.65
	1	7	525	РИ, Малгобекский р-н	Домовая мышь	05.01.78
		53	521	РИ, Малгобекский р-н	Домовая мышь	05.01.78
		54	523	РИ, Малгобекский р-н	Домовая мышь	05.01.78
	4	52	75/45 <i>caucasica</i>	РИ	Полевка обыкновенная	05.06.82
		55	<i>caucasica</i>	РИ, Малгобекский р-н	Полевка обыкновенная	23.04.82
	9	25	302 <i>caucasica</i>	РИ, Назрановский р-н	Полевка обыкновенная	1982
		8	296 <i>caucasica</i>	РИ, Назрановский р-н	Полевая мышь	04.01.82
8		295 <i>caucasica</i>	РИ, Назрановский р-н	Лесная мышь	04.01.82	
4	52	296	РИ, Сунженский р-н	Полевая мышь	31.08.84	
	52	292	РИ, Сунженский р-н	Лесная мышь	31.08.84	
4	1	16	503	PCO	Обыкновенная полевка	1969
		16	504	PCO, Правобережный р-н	Обыкновенная полевка	11.04.69
	2	17	513	РИ, Назрановский р-н	Домовая мышь	22.12.75
		15	514	РИ, Назрановский р-н	Домовая мышь	22.12.75
		15	515	РИ, Назрановский р-н	Домовая мышь	22.12.75
	3	11	524	РИ, Сунженский р-н	Полевые мыши	19.06.78
		23	527	РИ, Сунженский р-н	Лесная мышь	19.06.78
		12	535	ЧР, Надтеречный р-н	Полевая мышь	19.06.78
	2	9	146	PCO, Ирафский р-н	Клещи	07.08.81
		13	72	PCO, Ирафский р-н	Полевая мышь	07.04.81
		13	89	PCO, Дигорский р-н	Домовая мышь	07.08.81

стве эффективного инструмента ретроспективного эпидемиологического анализа.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анализ эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2015 году и прогноз на 2016 год. <http://www.snipchi.ru/updoc/obzor-epid.-situatsii-po-brutsellezu-v-rf-v-2015.pdf> (дата обращения 01.06.16 г.).
2. Лямкин Г.И., Таран И.Ф., Щедрин В.И. Современные представления о бруцеллезе как природно-очаговом заболевании. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1995; 2:115–8.
3. Савилов Е.Д., Мамонтова Л.М., Астафьев В.А., Жданова С.Н. Применение статистических методов в эпидемиологическом анализе. М.: МЕДпресс-информ; 2004. 112 с.
4. Таран И.Ф. Бруцеллезная инфекция с позиции природно-очагового заболевания. Эпидемиология и профилактика особо опасных инфекций в МНР и СССР. Улан-Батор; 1978. С. 193–4.
5. Le Flèche P., Jacques I., Grayon M., Al Dahouk S., Bouchon P., Denoëud F., Nöckler K., Neubauer H., Guilloteau L., Vergnaud G. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* 2006; 6(9):1–14. DOI: 10.1186/1471-2180-6-9.
6. Jiang H., Wang H., Xu L., Hu G., Ma J., Xiao P., Fan W., Di D., Tian G., Fan M., Mi J., Yu R., Song L., Zhao H., Piao D., Cui B. MLVA Genotyping of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* Isolates from Different Animal Species and Humans and Identification of *Brucella suis* Vaccine Strain S2 from Cattle in China. *PLOS ONE.* 2013; 8(10):76332. DOI: 10.1371/journal.pone.0076332.
7. Ma J., Wang H., Zhang X., Xu L., Hu G., Jiang H., Zhao F., Zhao H., Piao D., Qin Y., Cui B., Lin G. MLVA and MLST typing of *Brucella* from Qinghai, China. *Infect. Dis. Poverty.* 2016; 5(26):1–9. DOI: 10.1186/s40249-016-0123-z.
8. Massis F., Ancora M., Atzeni M., Rolesu S., Bandino E., Danzetta M., Zilli K., Giannatale E., Scacchia M. MLVA as an Epidemiological Tool To Trace Back *Brucella melitensis* Biovar 1 Re-Emergence in Italy. *Transbound. Emerg. Dis.* 2015; 62(5):463–9. DOI: 10.1111/tbed.12397.
9. MLVA bank for Microbes Genotyping. (Cited 01 Jun 2016). Available from: <http://mlva.u-psud.fr>.
10. START version 2. (Cited 01 Jun 2016). Available from: <http://pubmlst.org/software/analysis/start2/>.

#### References

1. [Analysis of epidemiological situation on brucellosis in the Russian Federation in 2015 and prognosis for 2016] (cited 06 Jan 2016). Available from: <http://www.snipchi.ru/updoc/obzor-epid.-situatsii-po-brutsellezu-v-rf-v-2015.pdf>.
2. Lyamkin G.I., Taran I.F., Shchedrin V.I. [Modern views on brucellosis as natural-focal disease]. *Zh. Mikrobiol., Immunol. i Immunobiol.* 1995; 2:115–8.
3. Savilov E.D., Mamontova L.M., Astaf'ev V.A., Zhdanova S.N. [Application of Statistical Methods in Epidemiological Analysis]. М.: "MEDpress-inform"; 2004. 112 p.
4. Taran I.F. [Brucellosis through the lens of natural-focal disease]. In: [Epidemiology and Prophylaxis of Particularly Dangerous Infections in Mongolian People's Republic and USSR]. Ulan-Bator; 1978. P. 193–4.
5. Le Flèche P., Jacques I., Grayon M., Al Dahouk S., Bouchon P., Denoëud F., Nöckler K., Neubauer H., Guilloteau L., Vergnaud G. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. *BMC Microbiol.* 2006; 6(9):1–14. DOI: 10.1186/1471-2180-6-9.
6. Jiang H., Wang H., Xu L., Hu G., Ma J., Xiao P., Fan W., Di D., Tian G., Fan M., Mi J., Yu R., Song L., Zhao H., Piao D., Cui B. MLVA Genotyping of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* Isolates from Different Animal Species and Humans and Identification of *Brucella suis* Vaccine Strain S2 from Cattle in China. *PLOS ONE.* 2013; 8(10):76332. DOI: 10.1371/journal.pone.0076332.
7. Ma J., Wang H., Zhang X., Xu L., Hu G., Jiang H., Zhao F., Zhao H., Piao D., Qin Y., Cui B., Lin G. MLVA and MLST typing of *Brucella* from Qinghai, China. *Infect. Dis. Poverty.* 2016; 5(26):1–9. DOI: 10.1186/s40249-016-0123-z.
8. Massis F., Ancora M., Atzeni M., Rolesu S., Bandino E., Danzetta M., Zilli K., Giannatale E., Scacchia M. MLVA as an Epidemiological Tool To Trace Back *Brucella melitensis* Biovar 1 Re-Emergence in Italy. *Transbound. Emerg. Dis.* 2015; 62(5):463–9. DOI: 10.1111/tbed.12397.
9. MLVA bank for Microbes Genotyping. (Cited 01 Jun 2016). Available from: <http://mlva.u-psud.fr>.
10. START version 2. (Cited 01 Jun 2016). Available from: <http://pubmlst.org/software/analysis/start2/>.

#### Authors:

Kuznetsova I.V., Kovalev D.A., Evchenko Yu.M., Shakirova L.I., Shvetsova N.M., Ponomarenko D.G., Pisarenko S.V., Zhirov A.M., Lukina A.A., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: [snipchi@mail.stv.ru](mailto:snipchi@mail.stv.ru).

#### Об авторах:

Кузнецова И.В., Ковалев Д.А., Евченко Ю.М., Шакирова Л.И., Швецова Н.М., Пономаренко Д.Г., Писаренко С.В., Жиров А.М., Лукина А.А., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: [snipchi@mail.stv.ru](mailto:snipchi@mail.stv.ru).

Потупила 03.08.17.

Т.А.Малюкова, Л.А.Тихомирова, Ю.А.Попов

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ПРИ ПОДГОТОВКЕ СПЕЦИАЛИСТОВ ДЛЯ РАБОТ С ПАТОГЕННЫМИ БИОЛОГИЧЕСКИМИ АГЕНТАМИ***ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация*

Модернизация системы непрерывного образования в области здравоохранения и повышение эффективности обучения связывают с использованием информационных и коммуникационных технологий, в том числе электронного обучения и дистанционного образования. **Цель исследования:** оценка перспектив применения электронного и дистанционного обучения при профессиональной подготовке специалистов для работ с патогенными биологическими агентами. **Материалы и методы.** Аналитическим методом изучены законодательные, нормативно-методические документы, публикации в области использования информационно-коммуникационных технологий в образовательной деятельности; безопасности работ с ПБА I–IV групп патогенности; профессиональные компетенции специалистов, допускаемых к работам с ПБА; учебные программы профессиональной переподготовки и повышения квалификации, реализуемые на базе противочумных учреждений Роспотребнадзора. **Результаты и выводы.** Проведение курсов профессиональной переподготовки специалистов с помощью дистанционного обучения не представляется возможным. Целесообразно, перспективно и актуально применение элементов электронного обучения при реализации учебных программ профессиональной переподготовки, а элементов дистанционного и электронного обучения – программ повышения квалификации. Современные информационные технологии могут существенно повысить эффективность дополнительного профессионального образования на базе противочумных учреждений Роспотребнадзора.

*Ключевые слова:* патогенные биологические агенты, обучение специалистов, дистанционное обучение, электронное обучение.

*Корреспондирующий автор:* Малюкова Татьяна Анатольевна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Т.А.Malyukova, L.A.Tikhomirova, Yu.A.Popov

**Application of Information Technologies in Vocational Training for Work with Pathogenic Biological Agents***Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation*

Modernization of continuing education system in the sphere of healthcare and enhancement of training efficiency is associated with utilization of information and communication technologies, including remote and e-education. **Objective** of the study is to assess the prospects of application of electronic and remote learning in case of vocational training for work with pathogenic biological agents. **Materials and methods.** Using analytical methods, evaluated have been legislative, normative-methodological documents, publications in the sphere of information-communication technology application in educational activities, as well as safety of works with PBA of the I-IV groups of pathogenicity; professional competencies of the specialist allowed to handle PBA; advanced retraining and vocational programs realized at the premises of the plague-control institutions of the Rospotrebnadzor. **Results and conclusions.** Holding vocational reorientation courses via remote education is considered to be impossible. It is reasonable, prospective, and up-to-date to apply elements of electronic learning when realizing curricula for professional reorientation, and elements of remote and electronic education in case of advanced professional training. Modern information technologies can significantly enhance efficacy of further (continuing) vocational education at the premises of plague control institutions of the Rospotrebnadzor.

*Key words:* pathogenic biological agents, specialists training, remote education, electronic learning.

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

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

*Citation:* Malyukova T.A., Tikhomirova L.A., Popov Yu.A. Application of Information Technologies in Vocational Training for Work with Pathogenic Biological Agents. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:63–67. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-63-67

Концепция модернизации российского образования определяет приоритетные цели и задачи, в том числе в сфере дополнительного профессионального образования, решение которых требует применения современных образовательных технологий. Под образовательной технологией понимают комплекс, состоящий из планируемых результатов обучения, средств диагностики текущего уровня подготовленности обучающихся, набора моделей (методов) обучения, критериев выбора оптимальной модели для данных конкретных условий [4]. Важное место среди

образовательных технологий занимает технологический подход к преподаванию и учению, предусматривающий точное инструментальное управление учебным процессом и гарантированное достижение поставленных учебных целей.

Среди приоритетных технологий выделяют: традиционные и игровые технологии, метод проектов, обучение в сотрудничестве, дифференцированный подход в обучении, тестовые технологии, информационные и коммуникационные технологии.

В настоящее время повышение эффективности

обучения связывают с использованием информационных и коммуникационных технологий, в том числе электронного обучения и дистанционного образования.

Электронное обучение (ЭО, *E-Learning*) подразумевает организацию образовательной деятельности с применением содержащейся в базах данных и используемой при реализации образовательных программ информации и обеспечивающих ее обработку информационных технологий, технических средств, а также информационно-телекоммуникационных сетей, обеспечивающих передачу по линиям связи указанной информации, взаимодействие обучающихся и педагогических работников [6, 9].

Дистанционное обучение (ДО) – образовательные технологии, реализуемые в основном с применением информационно-телекоммуникационных сетей при опосредованном (на расстоянии) взаимодействии обучающихся и педагогических работников. ДО является формой самостоятельного обучения, для реализации которого в качестве ведущего средства используют Интернет-технологии [6], а также другие информационные технологии в соответствии с приказом Министерства образования и науки РФ № 137 от 06.05.2005 г. «Об использовании дистанционных образовательных технологий».

В сфере дополнительного профессионального образования (ДПО) использование ЭО и ДО регламентировано положениями Федерального закона «Об образовании в Российской Федерации» № 273 от 29.12.2012 г. и указами Президента Российской Федерации «О мерах по реализации государственной политики в области образования и науки» № 599 от 7.05.2012 г., «О мерах по реализации государственной социальной политики» № 597 от 7.05.2012 г.

Целью работы является оценка перспективы применения электронного и дистанционного обучения при профессиональной подготовке специалистов для работ с патогенными биологическими агентами (ПБА).

### Материалы и методы

Материалами для исследования послужили законодательные, нормативно-методические документы, публикации в области использования информационно-коммуникационных технологий в образовательной деятельности; действующие санитарные правила по безопасности работ с ПБА I–IV групп; профессиональные компетенции специалистов, допускаемых к работам с ПБА; учебные программы профессиональной переподготовки и повышения квалификации, реализуемые на базе противочумных учреждений Роспотребнадзора. В работе использован аналитический метод.

### Результаты и обсуждение

Анализ нормативно-методических документов

и публикаций позволил выделить преимущества ЭО и ДО, способствующие повышению эффективности процесса обучения.

К основным достоинствам ЭО [10] относят:

- возможность доступа к электронным курсам в сети Интернет;
- низкие цены на обучение – процесс «доставки» образования включает только обмен информацией (электронные обучающие курсы на компакт-дисках, в Интернет-сети) без затрат со стороны обучающегося на покупку учебно-методической литературы;
- возможность разделения содержания электронного курса на модули – небольшие блоки информации, что позволяет сделать изучение предмета более структурированным;
- гибкость обучения – продолжительность и последовательность изучения материалов слушатель выбирает сам, адаптируя весь процесс обучения под свои возможности и потребности;
- обучение без отрыва от работы, дома, в пути;
- возможность использовать учебные материалы, своевременно и оперативно обновленные в соответствии с новейшими достижениями науки и техники, изменениями в законодательной и нормативно-методической базе.

К основным пропагандируемым преимуществам ДО [1, 5, 7, 8, 9, 11] относят:

- обучение без отрыва от основной производственной деятельности;
- экономичность – не требуются затраты на командировочные расходы;
- доступность – независимость от географического и временного положения обучающегося при доступе к электронным образовательным ресурсам;
- обучение в индивидуальном темпе – скорость изучения устанавливается самим обучаемым в зависимости от его личных обстоятельств и потребностей;
- свобода и гибкость – обучаемый может выбрать любой из курсов обучения, а также самостоятельно планировать время, место и продолжительность занятий;
- мобильность – эффективная реализация обратной связи между преподавателем и обучаемым;
- технологичность – стремление к использованию в образовательном процессе новых достижений информационных и телекоммуникационных технологий.

На следующем этапе была проанализирована возможность использования ЭО и ДО при реализации программ ДПО на базе противочумных учреждений, реализующих в рамках лицензии на образовательную деятельность четыре программы профессиональной переподготовки специалистов, осуществляющих работы с ПБА I–II групп, и 15 программ повышения квалификации.

Одним из основных условий допуска специалистов к работам с ПБА является профессиональная переподготовка [2, 3], цель которой – приобретение

знаний о возбудителях особо опасных инфекций, а также освоение правил обеспечения биологической безопасности, выработка навыков их соблюдения при рутинных микробиологических манипуляциях, формирования у специалиста культуры безопасного поведения.

Анализ методов обучения, традиционно используемых и дающих хорошие результаты в течение многих десятилетий работы отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», показал, что 27,2 % времени, отведенного на освоение методов исследования, приобретения навыков, умений, формирование культуры безопасности составляет чтение лекций, беседы; 2 – демонстрации методик с объяснением; 61,4 – самостоятельная работа за лабораторным столом и в блоке для лабораторных животных; 9,4 – решение ситуационных (эпидемиологических и бактериологических) задач. Для реализации вышеперечисленного разработаны курсы лекций, учебно-методические пособия, видеолекции, учебные видеофильмы. Учебный план и расписание занятий построены так, чтобы слушатели осваивали материал по принципам «от простого к сложному» и «от общего к частному». При проведении практических занятий за лабораторным столом на первом этапе базовые, емкие методики отрабатывают с «чистым» материалом (технологические среды, физиологический раствор, дистиллированная вода, жидкие и плотные питательные среды, незараженные лабораторные животные). На втором этапе используют объекты, содержащие ПБА III–IV групп патогенности, на третьем – ПБА I–II групп и содержащие их объекты. Ежедневная (в течение 3–4 ч) работа за лабораторным столом под наблюдением преподавателей способствует приобретению и сохранению прочных навыков и умений.

Следовательно, цели, содержание и учебные планы программ профессиональной переподготовки специалистов (бактериологов, эпидемиологов, зоологов, лаборантов), допускаемых к работам с ПБА, обуславливают необходимость очной формы обучения и исключают возможность использования модели, полностью основанной на ЭО и ДО.

Важным приемом для закрепления навыков и умений является самоподготовка слушателей. Для повышения ее эффективности целесообразно применять материалы тематических электронных баз данных, электронные учебно-методические пособия, стандартные операционные процедуры. Использование элементов ЭО дает возможность слушателям изучать методический прием многократно, до полного усвоения. Сочетание пассивного запоминания материала с активным при работе за лабораторным столом способствует быстрому, качественному и эффективному приобретению навыков и умений. Информационные образовательные технологии позволяют наполнить образовательный процесс использованием электронных обучающих средств: энциклопедии, справочники, учебники, по-

собия, компьютерные игры, тренажеры, экспертные электронные средства, инструментальные среды. Важную роль играют новейшие средства мультимедиа, включая гипертекстовые и гипермедиа-ссылки, графики, картинки, анимацию, фрагменты видеофильмов и звуковое сопровождение. Однако разработка необходимых электронных обучающих средств требует определенного целевого финансирования. В соответствии с Распоряжением Правительства Российской Федерации от 07.10.14 № 1965-р сотрудниками ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» разработан электронный учебно-методический комплекс «Актуальные особо опасные инфекционные болезни: микробиология, эпидемиология, лабораторная диагностика, обеспечение биологической безопасности», включающий 10 электронных учебно-методических пособий. Пособия состоят из теоретического раздела, описания практических занятий, интерактивной коллекции (фото, аудио-видеоролики, 2D-анимация), нормативно-методической базы, глоссария, контрольно-измерительных материалов для проведения тестирования после каждого занятия и в конце обучения.

Целесообразно включать элементы ЭО при проведении входного контроля базовых знаний, контроле приобретения теоретических знаний и практических навыков (решение профессиональных ситуационных задач). В настоящее время зачеты, итоговую аттестацию и сертификационное тестирование на базе ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» осуществляют с помощью материалов баз данных «Правила биологической безопасности работ с патогенными биологическими агентами I–II групп» (свидетельство № 2004620130 о регистрации базы данных в Реестре баз данных от 21.05.2004 г.), «Сертификационные тестовые задания по специальности «бактериология» (свидетельство о регистрации в Роспатенте № 2012620916 от 12.09.12) и «Сертификационные тестовые задания по специальности «эпидемиология» (свидетельство о регистрации в Роспатенте № 2013621036 от 28.08.13), «Комплексная программа самообучения и контроля знаний правил биологической безопасности работ с патогенами I–II групп» (свидетельство № 2005612024 о регистрации программы в Реестре программ для ЭВМ от 09.08.2005 г.).

Вместе с тем, навыки выполнения методических приемов при работе с возбудителями особо опасных инфекций и динамика их совершенствования оцениваются в ходе ежедневного наблюдения за работой слушателей в процессе обучения и решения контрольных бактериологических задач. Подобная организация учебного процесса позволяет выработать у слушателя один из базовых навыков при работе с ПБА I–II групп – соблюдение принципа парности [2].

Применение таких элементов ЭО как запись видеоманитная или в цифровом формате может быть полезна для повышения качества наблюдения за работой обучающихся, контроля и самоконтроля осво-

ения методик. Воспроизведение ее позволит просматривать и анализировать технологический процесс в целом, а также регистрировать допущенные недочеты и ошибки.

Практические занятия на курсах профессиональной переподготовки проходят под наблюдением преподавателей, имеющих опыт работы с ПБА. В связи с этим замена очной формы подготовки специалиста для работы с ПБА на ЭО и ДО не представляется возможной. Но включение элементов ЭО (видеолекции, тематические электронные базы данных, электронные контрольно-измерительные материалы, учебные видеофильмы, электронные учебно-методические пособия и др.) является актуальным и приоритетным направлением повышения эффективности обучения.

Следующим этапом непрерывного профессионального образования специалиста по особо опасным инфекциям является повышение квалификации, которое проводится каждые пять лет и предусматривает теоретическое и практическое пополнение и обновление знаний и навыков. Анализ программ повышения квалификации, реализуемых на базе противочумных институтов, и соответствующих им перечней профессиональных компетенций специалистов позволил констатировать, что теоретическая часть по отдельным дисциплинам может быть заменена на дистанционную подготовку. Практические занятия должны проходить в очной форме, так как одной из базовых задач, как и в случае профессиональной переподготовки, является совершенствование практических навыков биобезопасности работ с ПБА. Результат самоподготовки слушателя может быть оценен дистанционным тестированием и/или написанием и защитой реферата. Применение информационно-коммуникационных технологий позволяет сократить срок очного обучения.

Частичное применение ЭО и ДО (аналогично алгоритму описанному выше) возможно и при проведении выездных курсов повышения квалификации. Вместе с тем, внедрение в процесс обучения ЭО и ДО сопряжено с определенными проблемами (рисунок).

Несмотря на декларируемые возможности сделать учебный процесс более рентабельным, перспективы экономии, удобство более свободного обращения со временем, отводимым для обучения, дешевизна ДО является в определенном смысле мифом [11]. Организация ДО требует существенных человеческих (преподаватели, разработчики учебных материалов, веб-дизайнеры, профессиональные операторы и дикторы, администраторы систем управления обучением, персонал техподдержки и др.) и материально-технических ресурсов. Очевидно, что организация учебного процесса не может быть дешевой, а признать выгодность ДО возможно только при централизованности и массовости [11].

Необходимо отметить ряд проблем и ограничений ДО (рисунок). Системы управления обуче-



Классификация проблем и ограничений ДО [11]

нием – это весьма громоздкое программное обеспечение, зачастую специализированное оборудование – учебные мультимедиа-комплексы, включающие интерактивные динамические видеосистемы и системы записи звука, проекционные комплексы с особо контрастными проекционными экранами и короткофокусными проекторами, имеющими высокую стоимость. Это препятствует достижению рентабельности обучения посредством телеконференций и вебинаров. С другой стороны, поставщик образовательных услуг может использовать самое современное оборудование, а потребитель не обладать ни подобным оборудованием, ни высокоскоростным доступом в Интернет.

Остается открытым вопрос защиты авторских прав разработчиков контента учебно-методических материалов, в частности, защита учебных материалов от копирования, охрана авторского права.

При использовании ДО необходимо разработать систему защиты информации, исключающую вероятность ситуаций, при которых сведения о методах работы с возбудителями особо опасных инфекций могут стать доступны лицам, не имеющим права работы с ними, что актуально в условиях существующей угрозы биотерроризма.

Еще один существенный недостаток ДО – невозможность удаленно организовать практические занятия. Эффективные симуляторы практических действий и тренажеры требуют колоссальных финансовых затрат и непросты в эксплуатации.

Особая проблема – самоорганизация (большая самомотивация и дисциплинированность) обучающихся, вследствие чего на освоение какого-либо объема учебного материала при ДО необходимо отводить существенно больше времени, чем при очной форме обучения.

Таким образом, современные информационные

технологии в сочетании с традиционными педагогическими технологиями, несомненно, могут существенно повысить эффективность ДПО на базе противочумных учреждений Роспотребнадзора.

Проведение курсов профессиональной переподготовки специалистов для работы с ПБА с помощью ДО не представляется возможным ввиду того, что обучение требует непосредственного наблюдения преподавателя за работой слушателя.

Целесообразно, перспективно и актуально применение элементов ЭО при реализации учебных программ профессиональной переподготовки, а элементов ДО и ЭО – программ повышения квалификации, в том числе по очно-заочной форме. Однако внедрение ЭО и ДО в процесс обучения на базе противочумных учреждений сопряжено с необходимостью наличия специального оборудования, программного обеспечения, электронных обучающих средств, а также специализированной подготовки преподавателей, что требует значительного целевого финансирования.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Башмаков А.И., Башмаков И.А. Разработка компьютерных учебников и обучающих систем. М.: Филин; 2003, 616 с.
2. Безопасность работ с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности). СП 1.3.3118-13. *Бюл. норм.-метод. документов Госсанэпиднадзора*. 2003; 3(13):95–115.
3. Безопасность работ с микроорганизмами III-IV группы патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. СП 1.3.2322-08. *Бюл. норм.-метод. документов Госсанэпиднадзора*. 2009; 4:13–67.
4. Богаевская Г.Н. Современные образовательные технологии. URL: <http://nsportal.ru/shkola/obshchepedagogicheskie-tekhnologii/library/2013/01/18/sovremennye-obrazovatelnye-tekhnologii> (дата обращения 20.09.15).
5. Зайченко Т.П. Основы дистанционного обучения: теоретико-практический базис. СПб.: Изд-во РГПУ им. А.И. Герцена; 2004. 167 с.
6. Иванченко Д.А. Системный анализ дистанционного обучения. М.: Союз; 2005. 192 с.
7. Малитиков Е.М., Карпенко М.П., Колмогоров В.П. Актуальные проблемы развития дистанционного образования в Российской Федерации и странах СНГ. *Право и образование*.

2000; 1(2):42–54.

8. Полат Е.С., Бухаркина М.Ю., Моисеева М.В. Теория и практика дистанционного обучения. М.: Издательский центр «Академия»; 2004. 416 с.

9. Полат Е.С., Моисеева М.В., Петров А.Е. Педагогические технологии дистанционного обучения. М.: Академия; 2006. 400 с.

10. Сатунина А.Е. Электронное обучение: плюсы и минусы. *Совр. пробл. науки и образования*. 2006; 1:89–90.

11. Шкопоров А.Б. Дистанционное обучение и дистанционные образовательные технологии в дополнительном профессиональном образовании. СПб: НОУ ДПО «ЦИПК Росатома». URL: <http://atomprof.spb.ru/de/article1.php> (дата обращения 08.12.2014).

#### References

1. Bashmakov A.I., Bashmakov I.A. [Development of Computerized Electronic Textbooks and Learning Systems]. M.: "Filin"; 2003, 616 p.
2. [Safety of works with microorganisms of the I-II groups of pathogenicity (hazard)]. SR 1.3.3118-13. *Bulletin of normative-methodological documentation of the State Committee for Sanitary and Epidemiological Surveillance*. 2003; 3(13):95–115.
3. [Safety of works with microorganisms of the III-IV groups of pathogenicity (hazard) and agents of parasitic diseases]. SR 1.3.2322-08. *Bulletin of normative-methodological documentation of the State Committee for Sanitary and Epidemiological Surveillance*. 2009; 4:13–67.
4. Bogaevskaya G.N. [Modern Educational Technologies]. (cited 20 Sept 2015). Available from: <http://nsportal.ru/shkola/obshchepedagogicheskie-tekhnologii/library/2013/01/18/sovremennye-obrazovatelnye-tekhnologii>.
5. Zaichenko T.P. [Fundamental Principles of Remote Education: Theoretic-Application Basis]. St. Petersburg: Publishing House of A.I. Gertsen National State Pedagogical University; 2004. 167 p.
6. Ivanchenko D.A. [Systemic Analysis of Remote Education]. M.: "Soyuz"; 2005. 192 p.
7. Malitikov E.M., Karpenko M.P., Kolmogorov V.P. [Topical issues of remote education promotion in the territory of the Russian Federation and CIS countries]. *Pravo i Obrazovanie*. 2000; 1(2): 42–54.
8. Polat E.S., Bukharkina M.Yu., Moiseeva M.V. [Theory and Practice of Remote Education]. M.: Publishing Center "Academy"; 2004. 416 p.
9. Polat E.S., Moiseeva M.V., Petrov A.E. [Pedagogical Technologies in Remote Education]. M.: Publishing Center "Academy"; 2006. 400 p.
10. Satunina A.E. [Electronic education: pros and cons]. *Sovr. Probl. Nauki i Obrazovaniya*. 2006; 1: 89–90.
11. Shkoporov A.B. [Remote education and distance-type educational technologies in further vocational training]. St. Petersburg: "Rosatom". (Cited 08 Dec 2014). Available from: <http://atomprof.spb.ru/de/article1.php>.

#### Authors:

Malyukova T.A., Tikhomirova L.A., Popov Yu.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

#### Об авторах:

Малюкова Т.А., Тихомирова Л.А., Попов Ю.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Поступила 21.01.16.

В.Ю.Марченко<sup>1</sup>, И.М.Суслопаров<sup>1</sup>, Н.Ю.Сапронова<sup>1</sup>, Н.И.Гончарова<sup>1</sup>, Н.П.Колосова<sup>1</sup>, В.А.Евсеев<sup>1</sup>,  
С.В.Святченко<sup>1</sup>, О.Г.Пьянкова<sup>1</sup>, В.Б.Зиятдинов<sup>2</sup>, О.С.Лиманская<sup>3</sup>, С.Д.Джамбинов<sup>3</sup>, Г.Л.Шендо<sup>4</sup>,  
В.Н.Михеев<sup>1</sup>, Р.А.Максютов<sup>1</sup>, А.Б.Рыжиков<sup>1</sup>

## АНАЛИЗ ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА H5N8, ВЫЗВАВШИХ ВСПЫШКИ В РОССИИ В 2016–2017 гг.

<sup>1</sup>ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово; <sup>2</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан», Казань; <sup>3</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Калмыкия»; <sup>4</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Астраханской области», Астрахань, Российская Федерация

**Цель работы.** Изучение биологических характеристик штаммов вируса гриппа, вызвавших вспышки в России в 2016–2017 гг. **Материалы и методы.** Исследования выполнены с использованием современных вирусологических и молекулярно-биологических методов анализа на современном оборудовании. **Результаты и выводы.** В 2016 г. на территории Российской Федерации зарегистрированы вспышки среди диких и домашних птиц, вызванные высокопатогенным вирусом гриппа H5N8-субтипа. В мае 2016 г. зафиксирована гибель диких птиц на территории Республики Тыва. В октябре–ноябре 2016 г. вирус H5N8 выделен на территории республик Татарстан, Калмыкия в Краснодарском крае и Астраханской области. В 2017 г. вирус гриппа H5N8 широко распространился в Европейской части России, где вызвал вспышки среди диких и домашних птиц. Результаты исследования выделенных штаммов показали, что все они являются высокопатогенными и относятся к генетической кладе 2.3.4.4. Молекулярно-генетический и вирусологический анализ выявил различия между штаммами 2016–2017 гг. и штаммом той же клады, циркулировавшим в России в 2014 г.

**Ключевые слова:** вирус гриппа птиц, вспышка, H5N8, Российская Федерация.

Корреспондирующий автор: Марченко Василий Юрьевич, e-mail: marchenko\_vyu@vector.nsc.ru.

V.Yu.Marchenko<sup>1</sup>, I.M.Susloparov<sup>1</sup>, N.Yu.Sapronova<sup>1</sup>, N.I.Goncharova<sup>1</sup>, N.P.Kolosova<sup>1</sup>, V.A.Evseenko<sup>1</sup>,  
S.V.Svyatchenko<sup>1</sup>, O.G.P'yankova<sup>1</sup>, V.B.Ziatdinov<sup>2</sup>, O.S.Limanskaya<sup>3</sup>, S.D.Dzhambinov<sup>3</sup>, G.L.Shendo<sup>4</sup>,  
V.N.Mikheev<sup>1</sup>, R.A.Maksyutov<sup>1</sup>, A.B.Ryzhikov<sup>1</sup>

## Characterization of Avian Influenza H5N8 Virus Strains That Caused the Outbreaks in the Russian Federation in 2016–2017

<sup>1</sup>State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector», Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation; <sup>2</sup>Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Tatarstan, Kazan, Russian Federation; <sup>3</sup>Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Kalmykia, Elista, Russian Federation; <sup>4</sup>Center of Hygiene and Epidemiology in the Astrakhan Region, Astrakhan, Russian Federation

**Objective** of the study is to investigate biological properties of avian influenza virus strains that caused the outbreaks in Russia in 2016–2017. **Materials and methods.** The study was performed using advanced virological and molecular-biological methods in state-of-the-art equipment. **Results and conclusion.** In 2016, the outbreaks among wild birds and poultry caused by highly pathogenic avian influenza H5N8 virus have occurred in the territory of the Russian Federation. In May, 2016 an outbreak of H5N8 among wild birds was registered in the territory of the Republic of Tyva. In October–November, 2016 influenza virus H5N8 was isolated in the territory of the Republics of Tatarstan and Kalmykia, Krasnodar and Astrakhan Regions of Russia. In 2017 avian influenza H5N8 has become widespread in European part of Russia and caused multiple outbreaks among wild birds and poultry. Results of the investigations of the isolated strains show that all of them are highly pathogenic and belong to the clade 2.3.4.4. Molecular-genetic and virological analysis has revealed the differences between the viruses isolated in 2016–2017 and the virus of the same clade 2.3.4.4 that was isolated in 2014.

**Keywords:** avian influenza virus, H5N8 outbreak, Russian Federation.

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

**Corresponding author:** Vasily Yu. Marchenko, e-mail: marchenko\_vyu@vector.nsc.ru.

**Citation:** Marchenko V.Yu., Susloparov I.M., Sapronova N.Yu., Goncharova N.I., Kolosova N.P., Evseenko V.A., Svyatchenko S.V., P'yankova O.G., Ziatdinov V.B., Limanskaya O.S., Dzhambinov S.D., Shendo G.L., Mikheev V.N., Maksyutov R.A., Ryzhikov A.B. Characterization of Avian Influenza H5N8 Virus Strains That Caused the Outbreaks in the Russian Federation in 2016–2017. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:68–74. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-68-74

На сегодняшний день новый вариант высокопатогенного вируса гриппа H5N8 клады 2.3.4.4 представляет серьезную угрозу сельскому хозяйству, а также общественному здравоохранению. Это обусловлено высокой вирулентностью данных штаммов для некоторых видов животных, которая показана в ряде исследований [3, 4, 7, 12]. Впервые возникнув в 2010 г. в Китае [15], вирусы данной клады широко

распространились, став причиной вспышек среди диких и домашних птиц в различных регионах мира. Показано, что в 2014 г. вирус гриппа H5N8 циркулировал в Юго-Восточной Азии, а затем занесен в Европу и Северную Америку с дикими птицами, использующими пути миграции, проходящие через территорию Российской Федерации [8, 11]. Это подтверждено исследованием выделенного на Дальнем

Востоке России штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 (H5N8) [5]. Изучение биологических свойств данного вируса показало, что он являлся высокопатогенным и имел высокую степень идентичности со штаммами, циркулирующими в Европе и Юго-восточной Азии. После широкого распространения в 2014 г., вирус гриппа H5N8 продолжил циркулировать и к началу 2016 г., по данным ОИЕ, вспышки H5N8 продолжали регистрироваться в Корее и Тайване [13]. Нами высказано предположение о возможном повторном выделении вируса гриппа H5N8 в некоторых регионах России [1]. Наша гипотеза получила подтверждение, когда в мае 2016 г. H5N8 появился на территории Республики Тыва. В ходе мониторинга вируса гриппа птиц на территории Республики Тыва в мае 2016 г. зафиксирована гибель диких птиц. Из биологического материала, взятого от погибших птиц, выделено несколько штаммов вируса гриппа. В результате типирования определена принадлежность данных штаммов к субтипу H5N8 вируса гриппа. Затем вирус гриппа H5N8 распространился на запад и в конце 2016 г. стали поступать сообщения о вспышках вируса гриппа H5N8 в европейской части России. Целью данной работы является изучение биологических характеристик штаммов вируса гриппа, вызвавших вспышки в России в 2016–2017 гг.

### Материалы и методы

Биологический материал от птиц представлен мазками из клоаки и трахеи, а также фрагментами внутренних органов. Выделение вируса гриппа осуществлялось на 9-дневных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ), путем инокулирования образцов в аллантоисную полость эмбриона и культивирования в течение трех суток. Аллантоисная жидкость тестировалась на наличие вируса гриппа в реакции гемагглютинации с использованием 0,5 % суспензии эритроцитов петуха, а также методом ПЦР в реальном времени. Антигенные свойства изучали в реакции торможения гемагглютинации с использованием 0,5 % суспензии эритроцитов лошади. Использовали референс-антигены и сыворотки хорьков, полученные от Dr. R. Webby, St. Jude Children's Research Hospital (Мемфис, США), а также сыворотки хорьков, полученные на штаммы вируса гриппа H5, ранее циркулировавшие в России.

Выделение РНК из аллантоисной жидкости осуществлялось с помощью набора «АмплиПрайм РИБО-сорб» (ООО «НекстБио», Россия) согласно инструкции производителя. Для обратной транскрипции использовали универсальные праймеры Uni12 и RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, США).

Типирование и субтипирование вируса гриппа проведено с использованием наборов «АмплиСенс Influenza virus A/B-FL», «АмплиСенс Influenza virus A H5N1-FL» и «АмплиСенс Influenza virus A-тип-H5, H7, H9-FL» (ФГУН «ЦНИИ эпидемио-

логии» Роспотребнадзора) согласно инструкции производителя.

С целью получения первичной структуры генома вируса проведена ПЦР с использованием праймеров, специфичных к определенным участкам каждого гена, а также реакционной смеси DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Scientific, США). Выделение ампликонов из агарозного геля проводилось при помощи набора QIAquick gel extraction kit (Qiagen, США). Полногеномное секвенирование новых вирусов гриппа проведено по технологии Illumina с использованием MiSeq reagent kit v3 (Illumina, San Diego, США). Филогенетический анализ проводили с использованием программы MEGA 6 методом maximum likelihood со 100 bootstrep повторами. В работе использовали нуклеотидные последовательности генов вирусов гриппа, опубликованные в базе данных GISAID FluSurver (<http://flusurver.bii.a-star.edu.sg>).

Для определения вирулентности штаммов вируса гриппа использовали мышей линии Balb/c, самок, с массой тела 14–16 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Животных заражали интраназально десятикратными разведениями вирусосодержащей аллантоисной жидкости. Перед проведением заражения мышей наркотизировали с использованием углекислого газа. Определение значений 50 % летальных (ЛД<sub>50</sub>) и инфицирующих (ИД<sub>50</sub>) доз проводили с использованием компьютерной программы Probit.

Для получения сывороток крови хорьков использовали животные, полученные из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Хорьков инфицировали интраназально, усыпленных под воздействием углекислого газа. Через 21 день у животных брали кровь. Полученную сыворотку крови перед постановкой реакции торможения гемагглютинации в течение 18 ч обрабатывали RDE (receptor destroying enzyme) для удаления неспецифических термостабильных ингибиторов, затем прогревали на водяной бане при 56 °С для удаления неспецифических термолабильных ингибиторов.

### Результаты и обсуждение

В 2016–2017 гг. зафиксирован ряд вспышек среди диких и домашних птиц на территории России. В ходе мониторинга вируса гриппа птиц на территории Республики Тыва в мае 2016 г. зафиксирована гибель диких птиц. На озере Убсу-нур найдены трупы видов Серая цапля (*Ardea cinerea*), Чомга (*Podiceps cristatus*), Озерная чайка (*Larus ridibundus*), Крачка (*Sterna hirundo*) и один неопределенный вид дикой утки. Из биологического материала, взятого от погибших птиц, выделено несколько штаммов вируса гриппа. В результате типирования определили принадлежность данных штаммов к субтипу H5N8 вируса гриппа. Затем, в октябре 2016 г., вирус гриппа H5N8 выделили от дикой утки в ходе мониторинга на территории Республики Татарстан. В ноябре 2016 г.

Биологические свойства вирусов гриппа H5-субтипа

Штамм	Субтип	Титр в РКЭ, $\log_{10}$ ЭИД <sub>50</sub>	Balb/c интраназальная ИД <sub>50</sub> , $\log_{10}$ ЭИД <sub>50</sub>	Balb/c интраназальная ЛД <sub>50</sub> , $\log_{10}$ ЭИД <sub>50</sub>	Чувствительность к занамивиру/ озельтамивиру IC <sub>50</sub> нМ
<b>Ранее выделенные штаммы</b>					
A/rook/Chany/32/2015 GISAID ID: EPI_ISL_193362	H5N1	8,7±0,4	1,9±0,4	2,9±0,8	29,9/32,9
A/wigeon/Sakha/1/2014 GISAID ID: EPI_ISL_169427	H5N8	6,2±0,5	2,9±0,4	4,1±0,4	0,05/0,1
<b>Исследуемые штаммы</b>					
A/great crested grebe/Tyva/34/2016 GISAID ID: EPI_ISL_230820	H5N8	9,3±0,3	1,7±0,5	2,3±0,5	1,0/0,7
A/wild duck/Tyva/35/2016 GISAID ID: EPI_ISL_231684	H5N8	7,9±0,4	1,9±0,6	н.д.	1,4/0,8
A/wild duck/Tatarstan/3059/2016 GISAID ID: EPI_ISL_247724	H5N8	8,6±0,4	н.д.	н.д.	0,58/0,29
A/chicken/Kalmykia/2643/2016 GISAID ID: EPI_ISL_247725	H5N8	7,6±0,4	2,0±0,4	2,9±0,6	0,60/0,28
A/chicken/Astrakhan/3131/2016 GISAID ID: EPI_ISL_240110	H5N8	8,4±0,5	1,9±0,4	2,4±0,5	0,59/0,28
A/goose/Krasnodar/3144/2017 GISAID ID: EPI_ISL_247722	H5N8	8,2±0,4	1,9±0,4	2,4±0,5	0,98/0,57
A/mute swan/Krasnodar/25/2017 GISAID ID: EPI_ISL_247723	H5N8	9,0±0,5	2,7±0,3	н.д.	0,91/0,47
A/turkey/Rostov/11/2017 GISAID ID: EPI_ISL_247721	H5N8	8,0±0,5	2,1±0,4	2,9±0,6	0,48/0,42
A/ural owl/Voronezh/14/2017 GISAID ID: EPI_ISL_247716	H5N8	8,6±0,4	2,2±0,4	3,3±0,4	1,25/0,69
A/chicken/Sergiyev Posad/38/2017 GISAID ID: EPI_ISL_256299	H5N8	8,6±0,4	2,2±0,4	2,9±0,5	н.д.

вирус гриппа выделен на территории Республики Калмыкия, где отмечалась гибель домашних кур на частных подворьях. В это же время зарегистрирована вспышка вируса гриппа на птицефабрике «Харабалинская», г. Харабали Астраханской области. Впоследствии вирус гриппа H5N8 широко распространился в Европейской части России [13]. С декабря 2016 до апреля 2017 года вспышки регистрировались среди диких и домашних птиц в Краснодарском крае и Ростовской области. Следует особо отметить гибель птиц из коллекции зоопарка Воронежа, которая отмечена в январе 2016 г. В марте 2016 г. вспышки отмечены в нескольких регионах Московской и Калининградской областей. Нами изучены биологические свойства нескольких штаммов, вызвавших вспышки, и сравнены со штаммами H5 субтипа ранее выделенными в России (табл. 1).

При титровании на РКЭ изученные штаммы показали высокую степень репродукции. Титр вируса в аллантоисной жидкости находился в диапазоне от 7,6 до 9,3  $\log_{10}$  ЭИД<sub>50</sub>/мл. Несмотря на различия в титрах между штаммами H5N8 2016–2017 гг., все они оказались более инфекционными для РКЭ, чем штамм A/wigeon/Sakha/1/2014 H5N8, выделенный в 2014 г. в России. Для всех штаммов определено наличие аминокислотной последовательности REKRRKR\*GL в сайте протеолитического расщепления гемагглютинина, что характерно для высоко-

копатогенных штаммов вируса гриппа. Изученные штаммы показали высокую степень вирулентности для мышей. При интраназальном заражении мышей линии Balb/c показатель ИД<sub>50</sub> находился в диапазоне 1,7–2,7  $\log_{10}$  ЭИД<sub>50</sub>. Также для штаммов определили значения летальной дозы (ЛД<sub>50</sub>), которые составили 2,3–3,3  $\log_{10}$  ЭИД<sub>50</sub>. Показатели вирулентности для изученных штаммов также были выше, чем у штамма A/wigeon/Sakha/1/2014 H5N8 и оказались сопоставимы с показателями у штаммов H5N1, циркулировавших в России в 2015 г. Все изученные штаммы чувствительны к действию противовирусных препаратов – ингибиторов нейраминидазы озельтамивира и занамивира, что было продемонстрировано флуоресцентным методом измерения ингибирования нейраминидазы (Fluorometric Neuraminidase Inhibition Assay).

Накопление новых вирусов гриппа в культуре клеток MDCK ингибировалось в присутствии интерферона альфа, однако штаммы вируса гриппа птиц A/great crested grebe/Tyva/34/2016, A/wild duck/Tyva/35/2016, A/chicken/Kalmykia/2643/2016, A/chicken/Astrakhan/3131/2016 в культуре клеток A549 ингибировали индукцию эндогенного интерферона, что, вероятно, является одной из причин усиления вирулентности при заражении млекопитающих.

Результаты исследования антигенных свойств выделенных вирусов показали, что изучаемые штам-

Результаты РТГА со штаммами вируса гриппа H5-субтипа

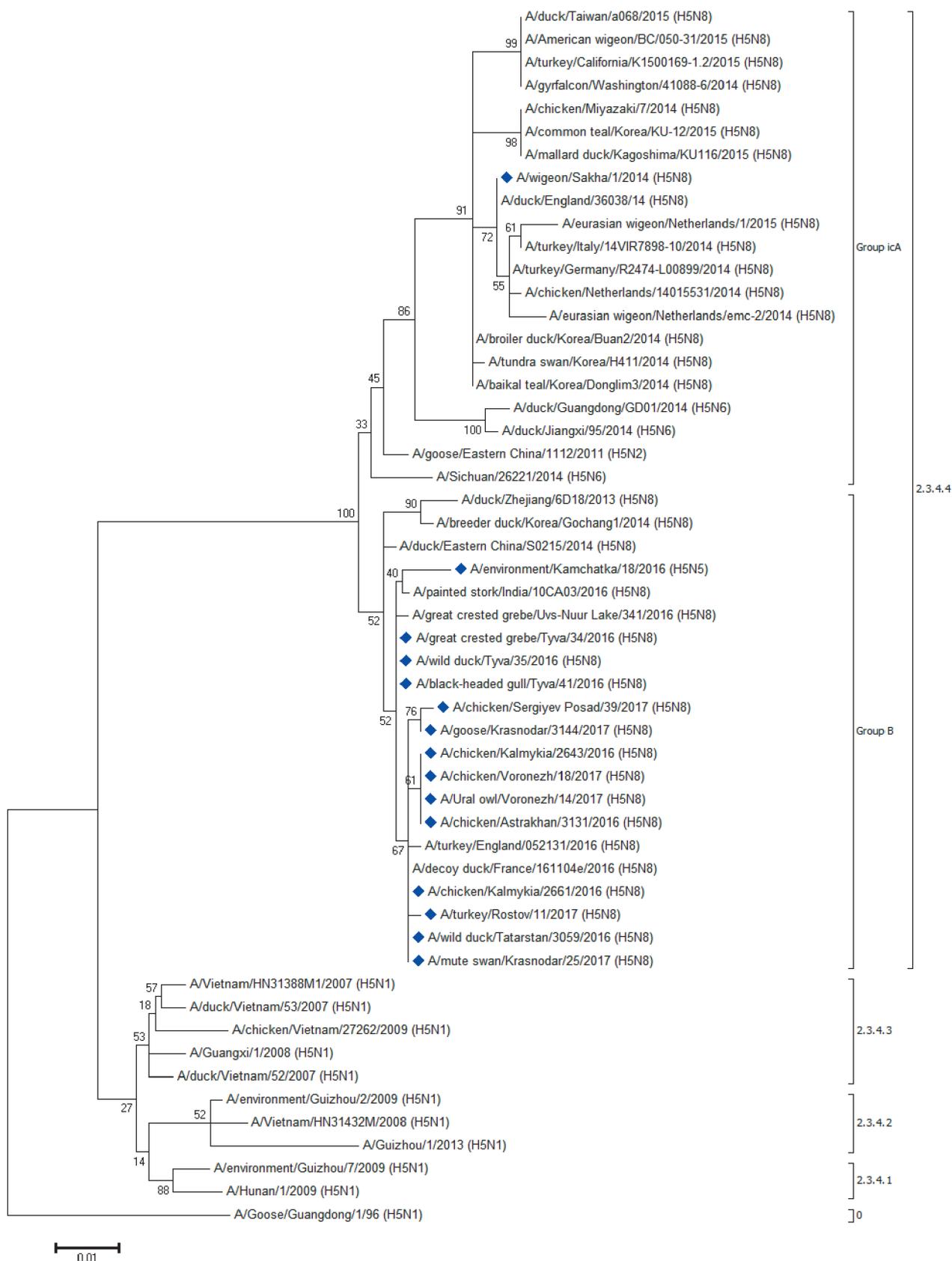
Штамм	Субтип	Клада	Сыворотка						
			A/rook/Chany/32/2015	A/duck/England/36254/2014	A/Nothorn Pintail/WA/40964/2014	A/Sichuan/26221/2014-RG42A	A/gyrfalcon/WA/41088/2014-RG43A	A/great crested grebe/Tuva/34/2016	A/wigeon/Sakha/1/2014
			2.3.2.1c	2.3.4.4	2.3.4.4	2.3.4.4	2.3.4.4	2.3.4.4	2.3.4.4
<b>Референс антигены</b>									
A/rook/Chany/32/2015	H5N1	2.3.2.1c	320	<20	160	<20	<20	640	<20
A/duck/England/36254/2014	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	1280
A/Nothorn Pintail/WA/40964/2014	H5N2	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	640
A/Sichuan/26221/2014 RG42A	H5N6	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	320
A/gyrfalcon/WA/41088/2014 RG43A	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	1280	1280	1280
A/great crested grebe/Tuva/34/2016	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	320
A/wigeon/Sakha/1/2014	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	2560	5120	640	1280	1280
<b>Тестируемые антигены</b>									
A/wild duck/Tuva/35/2016	H5N8	2.3.4.4	<20	320	5120	5120	640	320	320
A/wild duck/Tatarstan/3059/2016	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	640
A/chicken/Kalmykia/2643/2016	H5N8	2.3.4.4	<20	320	2560	1280	320	320	160
A/chicken/Astrakhan/3131/2016	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	640
A/goose/Krasnodar/3144/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	640
A/mute swan/Krasnodar/25/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	640
A/turkey/Rostov/11/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	1280	5120	5120	640	1280	640
A/ural owl/Voronezh/14/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	320	640	640
A/chicken/Sergiyev Posad/38/2017	H5N8	2.3.4.4	<20	640	5120	5120	640	640	640

мы не имеют сродства со штаммами H5N1 клады 2.3.2.1c, выделенными в России в 2015 г., но имеют высокую степень родства со штаммом клады 2.3.4.4 A/wigeon/Sakha/1/2014 H5N8, а также с референс штаммом той же клады A/Nothorn Pintail/WA/40964/2014 (H5N2) и штаммом A/Sichuan/26221/2014-RG42A (H5N6), выделенным от человека (табл. 2).

Полученные данные согласуются с проведенным филогенетическим анализом, который также определил изучаемые штаммы к генетической кладе 2.3.4.4. Однако штаммы вируса гриппа H5N8, выделенные в 2016 г. находятся в другой генетической группе В. Штамм A/wigeon/Sakha/1/2014 и референс штамм A/Sichuan/26221/2014-RG42A формируют группу А, представители которой циркулировали до 2016 г. (рисунок). Анализ нуклеотидных последовательностей генома выделенных штаммов выявил ряд генотипических отличий от референс штамма клады 2.3.4.4, которые выявили при помощи H5N1 Genetic Changes Inventory (<http://www.cdc.gov/flu/avianflu/h5n1/inventory.htm>) и с использованием сервиса FluServer (<http://fluserver.bii.a-star.edu.sg>).

У изученных штаммов выявлен ряд мутаций, отвечающих за вирулентность и изменение хозяйской специфичности. Так, при анализе аминокис-

лотной последовательности гена НА выявлены две замены – N94S и T123P. Подобные замены, по литературным данным, обуславливают усиление рецепторного взаимодействия с α2-6 остатками сиаловых кислот [14]. В гене NS1 выявлены две мутации (V226I и E227G), которые отвечают за вирулентность и, в частности, за ее усиление [2], которое показано экспериментально в сравнении со штаммом 2014 г. A/wigeon/Sakha/1/2014. Также в гене M2 выявлена мутация I51V, которая, по литературным данным, совместно с мутацией S31N вероятно может указывать на устойчивость штаммов к антивирусным препаратам адамантанового ряда [9], однако последняя у исследуемых штаммов не выявлена. Таким образом можно заключить, что выделенные штаммы являются чувствительными к препаратам адамантанового ряда. Помимо всего прочего, у штаммов A/black-headed gull/Tuva/41/2016 и A/wild duck/Tuva/35/2016 в гене PB2 выявлена мутация I292V. Ранее было показано, что мутации в позиции 292 могут влиять на адаптацию вирусов к передаче от человека к человеку [6]. Таким образом, нами получена важная информация, которая может использоваться при оценке пандемического риска циркулирующих вариантов вируса гриппа.



Филогенетическое дерево гена НА вирусов гриппа H5Nx субтипа. Штаммы, выделенные в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора отмечены ромбами

Выделение вируса гриппа H5N8 клады 2.3.4.4 в Республике Тыва и европейской части России показывает, что данный вирус продолжает цирку-

лировать в природе, приобретая в ходе эволюции новые свойства. Это подтвердили проведенные вирусологические и молекулярно-генетические исследова-

дования. Повышенная вирулентность выделенных штаммов, по сравнению с циркулировавшим ранее в России штаммом A/wigeon/Sakha/1/2014, а также потенциальная возможность передачи от человека к человеку заставляет уделять особое внимание распространению данного вируса, а также комплексно подходить к изучению его свойств. Несмотря на то, что до сих пор не зарегистрировано ни одного случая заражения человека вирусом H5N8, нами показано, что возможность преодоления данным вирусом межвидового барьера сохраняется.

Хронология распространения высокопатогенного вируса гриппа H5N8 в 2016 г., а также анализ выделенных штаммов указывают на то, что вирус гриппа распространился из Юго-Восточной Азии на территорию России с дикими птицами по Центрально-Азиатскому пролетному пути, который пролегает через Республику Тыва [10], где в мае 2016 г. зафиксирована вспышка среди диких птиц. Затем с дикими птицами вирус распространился на запад, где он сначала был выделен от дикой птицы в Республике Татарстан, а затем поразил частные подворья и птицефабрики на территории Республики Калмыкия, в Астраханской области и других регионах европейской части России. Подобным образом в 2005 г. распространялся высокопатогенный вирус гриппа H5N1, который был впервые зарегистрирован в Юго-Западной Сибири, а затем занесен в европейскую часть России. Это в очередной раз подчеркивает ключевую роль диких птиц в распространении вируса гриппа. Становится очевидным, что необходимо усиливать существующие противозидемические и противозидоотические меры по контролю высокопатогенного вируса гриппа. Так, например, остро встает вопрос о создании современной ветеринарной вакцины против гриппа H5N8-субтипа. Наши исследования показали, что все выделенные в 2016 г. на территории РФ варианты вируса гриппа птиц A(H5N8) антигенно не отличаются от рекомендованного ВОЗ кандидатного вакцинного штамма A/Sichuan/26221/2014 RG42A субтипа H5N6. Отечественным производителям вакцин следует обратить внимание на возможность создания запаса предпандемической вакцины на основе этого штамма.

Вполне вероятно, что вирус H5N8 в будущем также продолжит свое распространение в различные географические регионы. Весной 2017 г. уже зафиксированы повторные вспышки гриппа на птицефабриках в Ростовской и Московской областях [13]. На сегодняшний день уже погибло или было забито более 1500000 голов птицы, что нанесло серьезный экономический ущерб сельскому хозяйству. В связи с этим необходимо усилить мониторинговые исследования в ключевых точках распространения вируса гриппа птиц, среди которых можно выделить регионы Европейской части России, где зафиксированы вспышки, Республику Тыва, а также Дальний Восток.

На сегодняшний день не зарегистрированы случаи инфицирования человека вирусом гриппа A(H5N8). Однако известно, что вирус гриппа субтипа A(H5N6), принадлежащий к той же кладе 2.3.4.4, что и циркулирующие среди птиц по территории России вирусы гриппа A(H5N8), уже вызывали инфекцию у 16 человек в Китае, 6 из которых погибли. Хотя инфицирование людей вирусами гриппа субтипа A(H5) происходит редко и связано в основном с контактами с больной или павшей инфицированной птицей, такие случаи могут приводить к тяжелым осложнениям или гибели человека. Ожидается, что популяционный иммунитет у людей к новым вирусам A(H5N8) минимален, поэтому в 2017 г. следует расширить и углубить мониторинговые исследования высокопатогенного гриппа не только среди дикой и домашней птицы, но и среди сельскохозяйственных и диких животных, а также среди людей, профессионально контактирующих с сельскохозяйственными животными. Регулярный обмен вирусами между лабораториями ВОЗ, занимающихся изучением вируса гриппа, и обмен информацией о генетических структурах новых вирусов гриппа является необходимым элементом для проведения полноценной и своевременной оценки риска возникновения вирусов с пандемическим потенциалом на границе человек-животные.

Все исследования на животных осуществлялись в соответствии с законодательством РФ, международными этическими нормами и нормативными документами ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В.Ю.Марченко, И.М.Суслопаров, А.В.Шиповалов, В.Н.Михеев, А.Б.Рыжиков. Циркуляция высокопатогенного вируса гриппа птиц в России в 2014–2015 гг. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 1:48–54. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-48-54.
2. Forbes N., Selman M., Pelchat M., Jia J.J., Stintzi A., Brown E.G. Identification of adaptive mutations in the influenza A virus non-structural 1 gene that increase cytoplasmic localization and differentially regulate host gene expression. *PLoS One.* 2013; 8(12):e84673. DOI: 10.1371/journal.pone.0084673.
3. Kim Y.I., Pascua P.N., Kwon H.I., Lim G.J., Kim E.H., Yoon S.W., Park S.J., Kim S.M., Choi E.J., Si Y.J., Lee O.J., Shim W.S., Kim S.W., Mo I.P., Bae Y., Lim Y.T., Sung M.H., Kim C.J., Webby R.J., Webster R.G., Choi Y.K. Pathobiological features of a novel, highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus. *Emerg. Microbes Infect.* 2014; 3(10):e75. DOI: 10.1038/emi.2014.75.
4. Lee Y.J., Kang H.M., Lee E.K., Song B.M., Jeong J., Kwon Y.K., Kim H.R., Lee K.J., Hong M.S., Jang I., Choi K.S., Kim J.Y., Lee H.J., Kang M.S., Jeong O.M., Baek J.H., Joo Y.S., Park Y.H., Lee H.S. Novel reassortant influenza A(H5N8) viruses, South Korea, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(6):1087–9. DOI: 10.3201/eid2006.140233.
5. Marchenko V.Y., Susloparov I.M., Kolosova N.P., Goncharova N.I., Shipovalov A.V., Durymanov A.G., Ilyicheva T.N., Budatsirenova L.V., Ivanova V.K., Ignatyev G.A., Ershova S.N., Tulyahova V.S., Mikheev V.N., Ryzhikov A.B. Influenza A(H5N8) virus isolation in Russia, 2014. *Arch. Virol.* 2015; 160(11):2857–60. DOI: 10.1007/s00705-015-2570-4.
6. Miotto O., Heiny A., Tan T.W., August J.T., Brusica V. Identification of human-to-human transmissibility factors in PB2 proteins of influenza A by large-scale mutual information analysis. *BMC Bioinformatics.* 2008; 9(1):S18. DOI: 10.1186/1471-2105-9-S1-S18.

7. Pulit-Penaloza J.A., Sun X., Creager H.M., Zeng H., Belser J.A., Maines T.R., Tumpey T.M. Pathogenesis and Transmission of Novel Highly Pathogenic Avian Influenza H5N2 and H5N8 Viruses in Ferrets and Mice. *J. Virol.* 2015; 89(20):10286–93. DOI: 10.1128/JVI.01438-15.

8. Ramey A.M., Reeves A.B., TeSlaa J.L., Nashold S., Donnelly T., Bahl J., Hall J.S. Evidence for common ancestry among viruses isolated from wild birds in Beringia and highly pathogenic intercontinental reassortant H5N1 and H5N2 influenza A viruses. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 40:176–85. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.02.035.

9. Tang J.W., Ngai K.L., Wong J.C., Lam W.Y., Chan P.K. Emergence of adamantane-resistant influenza A(H3N2) viruses in Hong Kong between 1997 and 2006. *J. Med. Virol.* 2008; 80(5):895–901. DOI: 10.1002/jmv.21155.

10. Veen J., Yurlov A.K., Delany S.N., Mihantiev A.I., Selivanova M.A., Boere G.C. An atlas of movements of Southwest Siberian waterbirds. Wetlands International; 2005. 60 p. (Cited 16 Feb 2017). Available from: <http://www.wetlands.org/Portals/0/publications/Analyses/West%20Siberia%20flyway.pdf>.

11. Verhagen J.H., Herfst S., Fouchier R.A. Infectious disease. How a virus travels the world. *Science.* 2015; 347(6222):616–7. DOI: 10.1126/science.aaa6724.

12. Wang X., Meng F., Wang D., Liu X., Chen S., Qin T., Peng D., Liu X. Characteristics of two highly pathogenic avian influenza H5N8 viruses with different pathogenicity in mice. *Arch. Virol.* 2016; 12(161):3365–74. DOI: 10.1007/s00705-016-3043-0.

13. World Organisation for Animal Health (OIE). Update on highly pathogenic avian influenza in animals (typeH5 and H7). Paris: OIE; 2017. (cited 16 Feb 2017). Available from: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2017/>.

14. Yamada S., Suzuki Y., Suzuki T., Le M.Q., Nidom C.A., Sakai-Tagawa Y., Muramoto Y., Ito M., Kiso M., Horimoto T., Shinya K., Sawada T., Kiso M., Usui T., Murata T., Lin Y., Hay A., Haire L.F., Stevens D.J., Russell R.J., Gambelin S.J., Skehel J.J., Kawaoka Y. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature.* 2006; 444(7117):378–82. DOI: 10.1038/nature05264.

15. Zhao K., Gu M., Zhong L., Duan Z., Zhang Y., Zhu Y., Zhao G., Zhao M., Chen Z., Hu S., Liu W., Liu X., Peng D., Liu X. Characterization of three H5N5 and one H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses in China. *Vet. Microbiol.* 2013; 163(3–4):351–7. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.12.025.

## References

1. V.Yu. Marchenko, I.M. Susloparov, A.V. Shipovalov, V.N. Mikheev, A.B. Ryzhikov [Circulation of highly pathogenic avian flu virus in the Russian Federation in 2014–2015]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 1:48–54. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-48-54.

2. Forbes N., Selman M., Pelchat M., Jia J.J., Stintzi A., Brown E.G. Identification of adaptive mutations in the influenza A virus non-structural 1 gene that increase cytoplasmic localization and differentially regulate host gene expression. *PLoS One.* 2013; 8(12):e84673. DOI: 10.1371/journal.pone.0084673.

3. Kim Y.I., Pascua P.N., Kwon H.I., Lim G.J., Kim E.H., Yoon S.W., Park S.J., Kim S.M., Choi E.J., Si Y.J., Lee O.J., Shim W.S., Kim S.W., Mo I.P., Bae Y., Lim Y.T., Sung M.H., Kim C.J., Webby R.J., Webster R.G., Choi Y.K. Pathobiological features of a novel, highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus. *Emerg. Microbes Infect.* 2014; 3(10):e75. DOI: 10.1038/em.2014.75.

4. Lee Y.J., Kang H.M., Lee E.K., Song B.M., Jeong J., Kwon Y.K., Kim H.R., Lee K.J., Hong M.S., Jang I., Choi K.S., Kim J.Y., Lee H.J., Kang M.S., Jeong O.M., Baek J.H., Joo Y.S., Park Y.H., Lee H.S. Novel reassortant influenza A(H5N8) viruses, South Korea, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(6):1087–9. DOI: 10.3201/eid2006.140233.

5. Marchenko V.Y., Susloparov I.M., Kolosova N.P., Goncharova N.I., Shipovalov A.V., Durymanov A.G., Ilyicheva T.N., Budatsirenova L.V., Ivanova V.K., Ignatyev G.A., Ershova S.N., Tulyahova V.S., Mikheev V.N., Ryzhikov A.B. Influenza A(H5N8) virus isolation in Russia, 2014. *Arch. Virol.* 2015; 160(11):2857–60. DOI: 10.1007/s00705-015-2570-4.

6. Miotto O., Heiny A., Tan T.W., August J.T., Bruscia V. Identification

of human-to-human transmissibility factors in PB2 proteins of influenza A by large-scale mutual information analysis. *BMC Bioinformatics.* 2008; 9(1):S18. DOI: 10.1186/1471-2105-9-S1-S18.

7. Pulit-Penaloza J.A., Sun X., Creager H.M., Zeng H., Belser J.A., Maines T.R., Tumpey T.M. Pathogenesis and Transmission of Novel Highly Pathogenic Avian Influenza H5N2 and H5N8 Viruses in Ferrets and Mice. *J. Virol.* 2015; 89(20):10286–93. DOI: 10.1128/JVI.01438-15.

8. Ramey A.M., Reeves A.B., TeSlaa J.L., Nashold S., Donnelly T., Bahl J., Hall J.S. Evidence for common ancestry among viruses isolated from wild birds in Beringia and highly pathogenic intercontinental reassortant H5N1 and H5N2 influenza A viruses. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 40:176–85. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.02.035.

9. Tang J.W., Ngai K.L., Wong J.C., Lam W.Y., Chan P.K. Emergence of adamantane-resistant influenza A(H3N2) viruses in Hong Kong between 1997 and 2006. *J. Med. Virol.* 2008; 80(5):895–901. DOI: 10.1002/jmv.21155.

10. Veen J., Yurlov A.K., Delany S.N., Mihantiev A.I., Selivanova M.A., Boere G.C. An atlas of movements of Southwest Siberian waterbirds. Wetlands International; 2005. 60 p. (Cited 16 Feb 2017). Available from: <http://www.wetlands.org/Portals/0/publications/Analyses/West%20Siberia%20flyway.pdf>.

11. Verhagen J.H., Herfst S., Fouchier R.A. Infectious disease. How a virus travels the world. *Science.* 2015; 347(6222):616–7. DOI: 10.1126/science.aaa6724.

12. Wang X., Meng F., Wang D., Liu X., Chen S., Qin T., Peng D., Liu X. Characteristics of two highly pathogenic avian influenza H5N8 viruses with different pathogenicity in mice. *Arch. Virol.* 2016; 12(161):3365–74. DOI: 10.1007/s00705-016-3043-0.

13. World Organisation for Animal Health (OIE). Update on highly pathogenic avian influenza in animals (typeH5 and H7). Paris: OIE; 2017. (cited 16 Feb 2017). Available from: <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2017/>.

14. Yamada S., Suzuki Y., Suzuki T., Le M.Q., Nidom C.A., Sakai-Tagawa Y., Muramoto Y., Ito M., Kiso M., Horimoto T., Shinya K., Sawada T., Kiso M., Usui T., Murata T., Lin Y., Hay A., Haire L.F., Stevens D.J., Russell R.J., Gambelin S.J., Skehel J.J., Kawaoka Y. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 influenza A viruses to human-type receptors. *Nature.* 2006; 444(7117):378–82. DOI: 10.1038/nature05264.

15. Zhao K., Gu M., Zhong L., Duan Z., Zhang Y., Zhu Y., Zhao G., Zhao M., Chen Z., Hu S., Liu W., Liu X., Peng D., Liu X. Characterization of three H5N5 and one H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses in China. *Vet. Microbiol.* 2013; 163(3–4):351–7. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.12.025.

## Authors:

Marchenko V.Yu., Susloparov I.M., Sapronova N.Yu., Goncharova N.I., Kolosova N.P., Evseenko V.A., Svyatchenko S.V., Pyankova O.G., Mikheev V.N., Maksyutov R.A., Ryzhikov A.B. State Scientific Centre of Virology and Biotechnology “Vector”. Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: [vector@vector.nsc.ru](mailto:vector@vector.nsc.ru).

Ziatdinov V.B. Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Tatarstan. 13a, Sechenova St., Kazan, 420061, Russian Federation. E-mail: [fguz@16.rospotrebnadzor.ru](mailto:fguz@16.rospotrebnadzor.ru).

Limanskaya O.S., Dzhambinov S.D. Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Kalmykia. Elista, Russian Federation.

Shendo G.L. Center of Hygiene and Epidemiology in the Astrakhan Region. Astrakhan, Russian Federation.

## Об авторах:

Марченко В.Ю., Суслопаров И.М., Сапронова Н.Ю., Гончарова Н.И., Колосова Н.П., Евсеенко В.А., Святченко С.В., Пьянкова О.Г., Михеев В.Н., Максютов Р.А., Рыжиков А.Б. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: [vector@vector.nsc.ru](mailto:vector@vector.nsc.ru).

Зятдинов В.Б. Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан. Российская Федерация, 420061, Казань, ул. Сеченова 13а. E-mail: [fguz@16.rospotrebnadzor.ru](mailto:fguz@16.rospotrebnadzor.ru).

Лиманская О.С., Джамбинов С.Д. Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Калмыкия. Российская Федерация, Республика Калмыкия, Элиста.

Шендо Г.Л. Центр гигиены и эпидемиологии в Астраханской области. Российская Федерация, Астрахань.

Поступила 11.05.17.

И.В.Новицкая<sup>1</sup>, Е.В.Прохватилова<sup>1</sup>, А.В.Топорков<sup>1</sup>, Д.В.Викторов<sup>1</sup>, М.Я.Кулаков<sup>1</sup>, Е.В.Савина<sup>1</sup>,  
В.Г.Пушкар<sup>1</sup>, Л.И.Белицкая<sup>1</sup>, Н.А.Осина<sup>2</sup>, Ж.А.Касьян<sup>2</sup>, И.В.Шульгина<sup>2</sup>, О.А.Лобовикова<sup>2</sup>

## ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ЭРИТРОЦИТАРНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНОВОГО ДИАГНОСТИКУМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ (ГЛУБОКИХ) МИКОЗОВ

<sup>1</sup>ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград; <sup>2</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

**Целью** работы является оценка и диагностической чувствительности и специфичности «Набора реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой», предназначенного для идентификации возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза в выделенных культурах микромицетов, а также клиническом и биологическом материале с помощью РНГА. **Материалы и методы.** С использованием предложенного диагностикума проведено исследование 264 положительных проб (216 проб суспензий микромицетов, 48 проб биологического и клинического материала), содержащих возбудители гистоплазмоза, кокцидиоидомикоза в концентрации  $3,12 \cdot 10^6$  и  $1,56 \cdot 10^6$  кл/мл и 128 отрицательных проб, содержащих гетерологичные микроорганизмы в концентрации  $5 \cdot 10^7$  кл/мл. В работе использовали пробы биологического материала, искусственно загрязненные данными возбудителями особо опасных микозов, и полученные от биопробных животных с экспериментальной инфекцией. **Выводы и результаты.** Установлено, что диагностическая чувствительность набора реагентов составила не менее 99,0 %, диагностическая специфичность – не менее 98,0 %. Воспроизводимость результатов во всех случаях 100 %. Полученные результаты указывают на перспективность внедрения разработанного препарата в практику здравоохранения.

**Ключевые слова:** кокцидиоидомикоз, гистоплазмоз, РНГА, набор реагентов.

Корреспондирующий автор: Новицкая Ирина Вячеславовна, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

I.V.Novitskaya<sup>1</sup>, E.V.Prokhvatilova<sup>1</sup>, A.V.Toporkov<sup>1</sup>, D.V.Viktorov<sup>1</sup>, M.Ya.Kulakov<sup>1</sup>, E.V.Savina<sup>1</sup>, V.G.Pushkar<sup>1</sup>,  
L.I.Belitskaya<sup>1</sup>, N.A.Osina<sup>2</sup>, Zh.A.Kas'yan<sup>2</sup>, I.V.Shul'gina<sup>2</sup>, O.A.Lobovikova<sup>2</sup>

## Diagnostic Potential of the Erythrocytic Immunoglobulin Diagnosticum for Indication and Identification of the Causative Agents of Particularly Dangerous (Deep) Mycoses

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

**Objective** of the study was to assess analytical and diagnostic sensitivity and specificity of the "Reagent kit. Erythrocytic coccidioidomycosal and histoplasmosal immunoglobulin dry diagnosticum", designed for identification of causative agents of coccidioidomycosis and histoplasmosis in isolated cultures of micromycetes, as well as in clinical and biological samples using indirect hemagglutination test. **Materials and methods.** The investigation included 264 positive samples (216 samples of micromycete suspensions, 48 samples of biological and clinical material) containing pathogens of histoplasmosis and coccidioidomycosis concentrated up to  $3,12 \cdot 10^6$  and  $1,56 \cdot 10^6$  cells/ml, respectively, and 128 negative samples containing heterologous microorganisms in concentrations equal to  $5 \cdot 10^6$  cells/ml. The study was carried out using biological samples that were artificially contaminated with stated pathogens of particularly dangerous mycoses and samples, obtained from bioassay animals with experimental infection. **Results and conclusions.** It is established that diagnostic sensitivity of the reagent kit is not less than 99,0 %. The diagnostic specificity is not less than 98,0 %. Reproducibility of the results in all cases was 100 %. The results obtained testify to the prospect of introduction of the developed kit into the health care practice.

**Key words:** coccidioidomycosis, histoplasmosis, indirect hemagglutination test, reagent kit.

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

**Corresponding author:** Irina V. Novitskaya, e-mail: .....

**Citation:** Novitskaya I.V., Prokhvatilova E.V., Toporkov A.V., Viktorov D.V., Kulakov M.Ya., Savina E.V., Pushkar V.G., Belitskaya L.I., Osina N.A., Kas'yan Zh.A., Shul'gina I.V., Lobovikova O.A. Diagnostic Potential of the Erythrocytic Immunoglobulin Diagnosticum for Indication and Identification of the Causative Agents of Particularly Dangerous (Deep) Mycoses. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:75–79. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-75-79

Кокцидиоидомикоз и гистоплазмоз – инфекционные болезни, вызываемые особо опасными диморфными грибами II группы патогенности *Coccidioides sp.* и *Histoplasma sp.* Восприимчивость человека к возбудителям этих инфекций считается всеобщей. В настоящее время вследствие расширения миграционных потоков, туристических связей и дру-

гих возможностей коммуникации населения случаи заболевания кокцидиоидомикозом и гистоплазмозом регистрируют во многих странах мира. Присутствие возбудителей особо опасных микозов среди потенциальных агентов биотерроризма еще более актуализирует проведение исследований, направленных на их индикацию и идентификацию [3]. В связи с

этим конструирование и последующая регистрация в Российской Федерации диагностических наборов и тест-систем для обнаружения возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза в пробах окружающей среды и при выявлении клинических случаев болезни является одним из приоритетных направлений отечественного здравоохранения.

В соответствии с приказом Роспотребнадзора № 88 от 17.03.2008 «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней» (<http://vnipchi.rospotreb-nadzor.ru>) на базе ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» сформирован Референс-центр по мониторингу за возбудителями глубоких микозов. В его задачи входит изучение биологических, иммунологических, молекулярно-генетических характеристик данных возбудителей, а также разработка и совершенствование диагностических препаратов, прежде всего экспрессной направленности, для их выявления и идентификации.

Иммуноанализ с помощью РНГА позволяет получить предварительный результат через 3–4 ч от начала исследования [2], что является как своевременным в определении тактики ведения больного, так и экономически выгодным и целесообразным с точки зрения дифференциальной диагностики особо опасных микозов и бактериальных или вирусных инфекций. Специалистами Волгоградского научно-исследовательского противочумного института ранее разработан «Набор реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой», который позволяет обнаружить антигены микромицетов *Coccidioides sp.* и *Histoplasma sp.* в выделенных культурах микроскопических грибов, а также биологических пробах и пробах клинического материала (преимущественно мокроты, промывной жидкости бронхов, сыворотки крови, секционного материала) с помощью РНГА. Для внедрения данного препарата в практику необходима оценка его диагностической чувствительности и специфичности при исследовании различного вида материала, в том числе полученного от животных с экспериментальным кокцидиоидомикозом и гистоплазмозом.

### Материалы и методы

Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой был получен на основе иммуноглобулинов гипериммунной кокцидиоидомикозной и гистоплазмозной агглютинирующей козьей сыворотки [1]. Лиофилизацию препарата проводили по десятиступенчатой программе при плавном подъеме вакуума в камере в течение 18–20 ч [4]. В состав среды высушивания входили реополиглоктин (15 %), сахараза (7,5 %) в воде очищенной.

Постановку РНГА и РТНГА осуществляли в

макро- и микровариантах по стандартной методике в соответствии с инструкцией к препарату [2, 3]. Диагностикум растворяли в 0,15 М растворе натрия хлорида рН (7,2±0,2), содержащем 1 % формалина до конечной концентрации 1 %, и выдерживали 4 ч при температуре (22±2) °С. Проведение РТНГА осуществляли с помощью имеющейся в наборе сыворотки кокцидиоидомикозной агглютинирующей козьей в ее разведении 1:500. Учет результатов РТНГА проводили через (2,0±0,5) ч. Результаты РНГА считали специфичными, если в РТНГА агглютинация отсутствовала или наблюдалась в меньшем (не менее чем на 3–4) числе лунок, чем это имело место в РНГА.

Для контроля чувствительности и специфичности диагностикума при проведении клинических испытаний использовали: 26 штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза (8 – *C. posadasii*, 18 – *C. immitis*); 18 – *H. capsulatum*; 4 – *H. capsulatum var. duboisii*; 1 – *H. capsulatum var. farciminosum*; 5 – *H. capsulatum* в дрожжевой фазе роста); 29 штаммов гетерологичных микроорганизмов микотической и бактериальной природы, включая 5 условно-патогенных дрожжеподобных грибов (*Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Cryptococcus neoformans 4N*, *Cryptococcus neoformans 9/22*, *Rhodotorula mucilaginosa*); 17 – нитчатых грибов и дерматомицетов III–IV групп патогенности (*Absidia (Mycocladius) hyalospora*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium sambucinum*, *Gibberella zeae*, *Geotrichum candidum*, *Malbranchea manginii*, *Paecilomyces variottii*, *Penicillium citreoviridae*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum*, *Phialophora verrucosa*, *Rhizopus microsporus*, *Scopulariopsis brevicaulis*, *Trichophyton crateriforme*); а также 5 бактериальных штаммов ПБА II группы патогенности – *Brucella suis*, *Yersinia sp.* (*Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*), *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*. Все штаммы получены из коллекций культур ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт».

Обеззараженные культуры возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза, а также гетерологичных микроорганизмов использовали в микроварианте РНГА в концентрациях  $1 \cdot 10^8$  и  $4 \cdot 10^8$  кл/мл соответственно.

Методом сравнения являлся микологический анализ, предусматривающий выделение культур после посева штаммов до их инактивации на соответствующие плотные питательные среды из разведения  $1 \cdot 10^5$  кл/мл, с последующим доказательством диморфизма микромицетов.

Дополнительно для исследования были отобраны образцы сывороток крови и суспензии органов (легкие, печень и селезенка) белых мышей линии BALB/c с экспериментальным кокцидиоидомикозом и гистоплазмозом, а также пробы сыворотки крови человека, мокроты, промывной жидкости бронхов, искусственно контаминированных *C. posadasii*, *C. immitis*, *H. capsulatum*, гетерологичными микроорганиз-

мами (*P. citreoviridae*, *C. neoformans*, *B. pseudomallei* и др.) до конечной концентрации  $3,12 \cdot 10^6$  кл/мл.

Статистическую достоверность полученных результатов испытаний оценивали в зависимости от числа параллельных опытов при доверительной вероятности 90 %, используя формулу биномиального распределения Бернулли в соответствии с «Методическими рекомендациями по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий» от 14.11.2013 г., приложение Е.

### Результаты и обсуждение

Возбудители кокцидиоидомикоза – грибы вида *Coccidioides immitis*, считавшегося до недавнего времени единым, но по результатам молекулярно-генетической таксономии, были четко разделены на два: калифорнийский и некалифорнийский варианты – *Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii* соответственно. Фенотипически *C. immitis* и *C. posadasii* оказались практически идентичны, так как геномы этих видов отличаются преимущественно лишь некодирующими последовательностями [6].

Род *Histoplasma* включает три варианта штаммов с широкой внутривидовой вариабельностью, отличающихся географическим распространением и особенностями клинического течения вызываемых ими болезней – *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*, *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*, *Histoplasma capsulatum* var. *farcinosum*. Различия между этими видами подтверждены секвенированием спейсерных областей их хромосомных ДНК [5].

Близкое генетическое родство возбудителей особо опасных микозов объясняет трудности их дифференциации, определяет возможность создания препаратов для их одномоментного выявления, что принципиально для подтверждения микотической природы заболевания. Основываясь на этом, проведена работа по созданию «Набора реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой», основу которого составили иммуноглобулины гипериммунной кокцидиоидомикозной и гистоплазмозной агглютинирующей козьей сыворотки.

Для получения высокоактивной агглютинирующей козьей иммунной сыворотки использовали референтные штаммы возбудителей данных особо опасных микозов из уникальной коллекции микромицетов ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», включающей культуры, полученные как из микологических лабораторий отечественных учреждений здравоохранения, так и из ведущих институтов США.

Выбор коз в качестве продуцентов обусловлен высоким уровнем белка в козьих сыворотках (до 60–70 мг%), а также возможностью их длительной (до 2 лет и больше) иммунизации. Отбор сыворотки проводили после каждого двухмесячного цикла, титр

кокцидиоидомикозных и гистоплазмозных антител определяли по результатам РИД, а также РНГА с антигенным эритроцитарным гистоплазмозным диагностикумом (экспериментальные серии). Наиболее активные сыворотки (с титром в РИД от 1:32–1:64 и выше, в РНГА от 1:25000) использовали для выделения из них иммуноглобулиновой фракции.

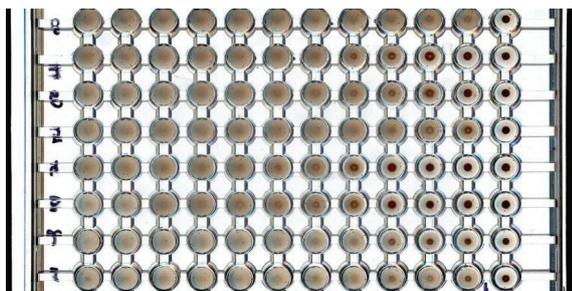
Эритроциты, как биологические носители, требуют щадящих условий обработки их поверхности, в связи с чем все этапы (формалинизация, танизация, сенсibilизация иммуноглобулинами, а также лиофильное высушивание препарата) осуществляли в течение длительного времени (до 1 сут) и с максимальной осторожностью [1, 4]. В результате после контроля сублимации титр РНГА с лиофилизированным препаратом оставался без изменений.

Стандартная чувствительность РНГА составляет  $10^5$ – $10^6$  м.т./мл, что ниже чувствительности таких иммунологических тестов, как ИФА или иммуноблоттинг. Однако, по нашему мнению, именно относительно невысокая чувствительность метода гемагглютинации позволяет избежать проблемы перекрестной реактогенности микромицетов, связанной с монотонностью полисахаридных структур (хитина, маннанов,  $\beta$ -глюканов и т.д.) поверхности их клеток [7].

Для внедрения разработанного препарата в практику необходимо оценить его функциональные свойства, эффективность, качество и безопасность при использовании для идентификации с помощью РНГА возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза в выделенных культурах микромицетов, клиническом и биологическом материале.

С этой целью экспертами ГБОУ ДПО РМАПО Минздрава России проведены технические испытания «Набора реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный сухой» как медицинского изделия, подтвердившие его соответствие национальным и нормативным документам в части требований безопасности и эффективности, а также нормированным техническим характеристикам (спецификации) изготовителя изделия, а затем совместно с сотрудниками ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» проведены клинические испытания предложенного диагностикума.

Для определения диагностической чувствительности препарата использовали суспензии микромицетов и бактериальных клеток представленных выше штаммов в концентрации  $3,12 \cdot 10^6$  кл/мл при выполнении микроварианта РНГА, и в концентрации  $1,56 \cdot 10^6$  кл/мл при использовании макроварианта РНГА. В связи с отсутствием на территории России клинических случаев кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза для испытания диагностикума также готовили суспензии органов от экспериментально полученных биопроб, в которых наиболее вероятно присутствие возбудителей особо опасных микозов в реальных условиях, а также искусственно контаминированного патогенами и гетерологичными микро-



Результаты РНГА с «Набором реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой» по выявлению возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза:

В горизонтальных рядах сверху вниз: *C. posadasii* 36-S, *C. posadasii* 51, *C. immitis* 46, *C. immitis* M-11, *H. capsulatum* var. *capsulatum* 6652, *H. capsulatum* var. *capsulatum* G-185, *H. capsulatum* var. *duboisii* 638, *H. capsulatum* var. *farciminosum* 12-89 в концентрации от  $1 \cdot 10^9$  до  $1 \cdot 10^8$  кл/мл

организмами клинического материала.

Результат учитывали как положительный при формировании сенсibilизированными эритроцитами на дне лунок характерного «зонтика», в отличие от точечных скоплений эритроцитов на дне лунки при отрицательном результате и в контроле. РНГА считали специфичной, если в РТНГА при одномоментном исследовании агглютинация отсутствовала или наблюдалась в меньшем (не менее чем на 3–4), по сравнению с РНГА, числе лунок (рисунок).

В ходе клинических испытаний «Набора реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой» проведены исследования 246 проб, содержащих инактивированные штаммы *C. immitis*, *C. posadasii*, *H. capsulatum*, в том числе: 184 пробы чистых культур коллекционных штаммов *C. immitis*, *C. posadasii* и *H. capsulatum*; 44 – биологического материала, полученного от зараженных экспериментальных животных; 18 – клинического материала, контаминированного возбудителями кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза (табл. 1).

Гетерологичные микроорганизмы были представлены чистыми культурами возбудителей (58 проб); 12 проб содержали биологический материал,

полученный от экспериментальных животных; 12 проб представляли собой исследования клинического материала (табл. 2).

В единичных случаях (по 1 штамму при изучении серий 1-го и 2-го диагностикума) чувствительность микроварианта РНГА составила  $6,25 \cdot 10^6$  кл/мл, что не позволило учесть этот результат реакции как положительный.

При изучении диагностической эффективности «Набора реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой» оказалось, что его диагностическая чувствительность составила не менее 99,0 % с доверительной вероятностью 90 %; диагностическая специфичность – не менее 98,0 % с доверительной вероятностью 90 %. Внутрипостановочная, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость для всех положительных образцов составила 100 %.

Таким образом, «Набор реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой» обеспечивает выявление в РНГА клеток возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза в концентрациях, эквивалентных по отраслевому стандарту мутности ОСО 42-28-85 ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России  $1,56 \cdot 10^6$  кл/мл макрометодом и  $3,12 \cdot 10^6$  кл/мл микрометодом и не выявляет гетерологичные микроорганизмы в концентрациях, эквивалентных по отраслевому стандарту мутности ОСО 42-28-85 ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России  $5 \cdot 10^7$  кл/мл.

В ходе клинических испытаний «Набора реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой» установлено его соответствие назначению, а именно – идентификации возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза в выделенных культурах микромицетов и биологическом материале методом реакции непрямой гемагглютинации, что позволяет рекомендовать данный препарат к использованию в широкой лабораторной сети.

Таблица 1

Результаты исследования в РНГА с «Набором реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой» проб, содержащих возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза

Наименование проб	Кол-во проб	Положительный ответ в РНГА* (абсолютное число)		
		Набор реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидомикозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой		Результат микологического исследования
		Серия 1	Серия 2	
Пробы, содержащие <i>C. immitis</i> , <i>C. posadasii</i> , <i>H. capsulatum</i> в концентрациях $3,12 \cdot 10^6$ и $1,56 \cdot 10^6$ кл/мл	184	98,91 % (91)	98,91 % (91)	100 % (184)
Пробы клинического материала, искусственно контаминированные <i>C. immitis</i> , <i>C. posadasii</i> , <i>H. capsulatum</i> в концентрации $3,12 \cdot 10^6$ и $1,56 \cdot 10^6$ кл/мл	18	100 % (9)	100 % (9)	100 % (18)
Пробы биологического материала от биопроб с экспериментальным кокцидиоидомикозом и гистоплазмозом	44	100 % (22)	100 % (22)	100 % (44)
<b>Всего проб/в том числе положительных</b>	<b>246/244</b>	<b>99,18 % (122)</b>	<b>99,18 % (122)</b>	<b>100 % (246)</b>

\* За положительный результат РНГА при постановке макрометодом принимали титр реакции, соответствующий концентрации клеток возбудителей кокцидиоидомикоза и гистоплазмоза  $1,56 \cdot 10^6$  кл/мл, микрометодом –  $3,12 \cdot 10^6$  кл/мл.

Результаты изучения в РНГА с «Набором реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой» проб, содержащих гетерологичные микроорганизмы

Наименование проб	Число проб	Отрицательный ответ в РНГА (абсолютное число)		Результат культурального исследования
		Набор реагентов. Диагностикум эритроцитарный кокцидиоидозный и гистоплазмозный иммуноглобулиновый сухой		
		Серия 1	Серия 2	
Пробы, содержащие <i>A. (Mycocladus) hyalospora</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>F. avenaceum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. sambucinum</i> , <i>G. zeae</i> , <i>G. candidum</i> , <i>M. manginii</i> , <i>P. variotii</i> , <i>P. citreoviridae</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. verrucosa</i> , <i>R. microsporus</i> , <i>S. brevicaulis</i> , <i>T. crateriforme</i> , <i>B. suis</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i> , <i>B. pseudomallei</i> , <i>B. mallei</i> в концентрации $5,0 \cdot 10^7$ кл/мл	58	100 % (29)*	100 % (29)	100 % (58)
Пробы биологического материала, содержащие <i>P. citreoviridae</i> в концентрации $5,0 \cdot 10^7$ кл/мл	12	100 % (6)	100 % (6)	100 % (12)
Пробы клинического материала, содержащие <i>P. citreoviridae</i> в концентрации $5,0 \cdot 10^7$ кл/мл	12	100 % (6)	100 % (6)	100 % (12)
Итого исследованных проб	82	100 % (41)	100 % (41)	100 % (82)

\*В скобках представлено абсолютное число отрицательных в РНГА проб.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Кулаков М.Я., Лесовой В.С., Новицкая И.В., Липницкий А.В., Пушкар В.Г. Способ получения эритроцитарного антигенного гистоплазмозного и кокцидиоидомикозного диагностикума. Патент на изобретение № 2422832. Оpubл. 25.01.2010 г.
- Онищенко Г.Г., редактор. Специфическая индикация патогенных биологических агентов. М.: ЗАО «МП Гигиена»; 2006. 288 с.
- Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. М.: Медицина; 2009. 472 с.
- Пушкар В.Г., Новицкая И.В., Кулаков М.Я., Павлова К.А., Степурина А.М. Способ лиофильной сушки эритроцитарного диагностикума. Патент на изобретение № 2476791. Оpubл. 27.02.2013 г.
- Gómez B.L. Molecular diagnosis of endemic and invasive mycoses: Advances and challenges. *Rev. Iberoam. Micol.* 2014; 31(1):35–41. DOI: 10.1016/j.riam.2013.09.009.
- Sharpton T.J., Stajich J.E., Rounsley S.D., Gardner M.J., Wortman J.R., Jordan V.S., Maiti R., Kodira C.D., Neafsey D.E., Zeng Q., Hung C.Y., McMahan C., Muszewska A., Grynberg M., Mandel M.A., Kellner E.M., Barker B.M., Galgiani J.N., Orbach M.J., Kirkland T.N., Cole G.T., Henn M.R., Birren B.W., Taylor J.W. Comparative genomic analyses of the human fungal pathogens *Coccidioides* and their relatives. *Genome Res.* 2009; 19(10):1722–31. DOI: 10.1101/gr.087551.108.
- Wüthrich M., Deepe G.S.Jr., Klein B. Adaptive Immunity to Fungi. *Annu. Rev. Immunol.* 2012; 30:115–48. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-074958.

#### References

- Kulakov M.Ya., Lesovoy V.S., Novitskaya I.V., Lipnitsky A.V., Pushkar V.G. [Method for the production of erythrocytic antigen coccidioidomycosal and histoplasmosal diagnosticum]. Patent for the invention

№ 2422832. Published January 25, 2010.

2. Onishchenko G.G., editor. [Specific Indication of Pathogenic Biological Agents]. M.: CJSC “MP Gigena”; 2006. 288 p.

3. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases]. M.: “Meditsina”; 2009. 472 p.

4. Pushkar V.G., Novitskaya I.V., Kulakov M.Ya., Pavlova K.A., Stepurina A.M. [Method for freeze-drying of erythrocytic diagnosticum]. Patent for the invention № 2476791. Published February 27, 2013.

5. Gómez B.L. Molecular diagnosis of endemic and invasive mycoses: Advances and challenges. *Rev. Iberoam. Micol.* 2014; 31(1):35–41. DOI: 10.1016/j.riam.2013.09.009.

6. Sharpton T.J., Stajich J.E., Rounsley S.D., Gardner M.J., Wortman J.R., Jordan V.S., Maiti R., Kodira C.D., Neafsey D.E., Zeng Q., Hung C.Y., McMahan C., Muszewska A., Grynberg M., Mandel M.A., Kellner E.M., Barker B.M., Galgiani J.N., Orbach M.J., Kirkland T.N., Cole G.T., Henn M.R., Birren B.W., Taylor J.W. Comparative genomic analyses of the human fungal pathogens *Coccidioides* and their relatives. *Genome Res.* 2009; 19(10):1722–31. DOI: 10.1101/gr.087551.108.

7. Wüthrich M., Deepe G.S.Jr., Klein B. Adaptive Immunity to Fungi. *Annu. Rev. Immunol.* 2012; 30:115–48. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-074958.

#### Authors:

Novitskaya I.V., Prokhvatilova E.V., Toporkov A.V., Viktorov D.V., Kulakov M.Ya., Savina E.V., Pushkar V.G., Belitskaya L.I. Volgograd Research Anti-Plague Institute, 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Osina N.A., Kas'yan Zh.A., Shul'gina I.V., Lobovikova O.A. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

#### Об авторах:

Новицкая И.В., Прохвятилова Е.В., Топорков А.В., Викторов Д.В., Кулаков М.Я., Савина Е.В., Пушкар В.Г., Белицкая Л.И. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

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

Поступила 11.04.17.

Е.В.Растунцева, Л.А.Тихомирова, Е.В.Сазанова

## ПУТИ СНИЖЕНИЯ РИСКОВ ИНФИЦИРОВАНИЯ ПРИ ОБУЧЕНИИ РАБОТЕ С МИКРООРГАНИЗМАМИ I–II ГРУПП ПАТОГЕННОСТИ (ОПАСНОСТИ)

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

Минимизация рисков заражения при подготовке специалистов для работы с микроорганизмами – возбудителями особо опасных инфекционных болезней – одна из основных задач сотрудников отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Целью статьи явилась необходимость проанализировать пути снижения рисков инфицирования возбудителями особо опасных инфекций слушателей курсов и преподавателей при обучении работе с этой группой микроорганизмов. Выявлены приоритетные направления: обучение с использованием слабовирулентных, авирулентных штаммов возбудителей особо опасных инфекционных болезней, а также рекомбинантных штаммов непатогенных бактерий; использование современного инженерно-технического оборудования; создание у специалистов устойчивых навыков работы с ПБА и воспитание профессионально важных качеств в ходе реализации существующих образовательных программ. Определен оптимальный подход к оценке надежности профессиональной деятельности персонала, работающего с ПБА I–II групп патогенности, для чего разработан алгоритм определения уровня профессиональной подготовленности персонала, допускаемого к работам с ПБА I–II групп, созданы профиограммы профессиональных групп работников, допускаемых к работам с ПБА I–II групп. Разработанные методики экспертной оценки профессионально важных качеств персонала позволяют провести их идентификацию с использованием наборов психологических тестов и имеют значение для целей профотбора и профориентации специалистов как при устройстве на работу, так и при обучении, а также позволяют снизить риски, связанные с влиянием человеческого фактора.

*Ключевые слова:* биологическая безопасность, патогенные биологические агенты, риск, подготовка специалистов, образовательные программы.

*Корреспондирующий автор:* Растунцева Елена Васильевна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

E.V.Rastuntseva, L.A.Tikhomirova, E.V.Sazanova

## Ways to Reduce the Risks of Infection While Training for Work with Microorganisms of the I–II Groups of Pathogenicity (Hazard)

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

Minimization of risks of infection when training the specialists to work with microorganisms – agents of particularly dangerous infectious diseases – is one of the key objectives for staff members of the Department for specialists training and curricula development at the FGHI RusRAPI “Microbe”. The paper discusses the ways to reduce the risks of infection with agents of particularly dangerous infectious diseases among the attendee and the tutors of qualification courses while studying how to work with this group of microorganisms. Outlined are priority areas: usage of attenuated, avirulent strains of the agents, as well as recombinant strains of non-pathogenic bacteria; exploitation of the state-of-the-art technical equipment; insure the skills of safe PBA handling and professionally significant traits of character in the process of realization of currently existing academic programs. Identified has been the optimum approach to the assessment of reliability and safety of professional activities among the personnel working with PBA of the I–II groups of hazard. Developed has been the algorithm for competence level evaluation in the specialists who are allowed to work with PBA of the I–II groups of hazard; job profile diagrams have been charted. Designed methods of expert evaluation of professionally significant skills and traits of the staff provide for personnel identification using a range of psychological tests and play an important role in vocational selection and orientation, both during the job placement and advanced training of the staff, as well as in the reduction of risks associated with the factor of human error.

*Key words:* biological safety, pathogenic biological agents, specialists training, curricula.

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

*Corresponding author:* Elenena V. Rastuntseva, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

*Citation:* Rastuntseva E.V., Tikhomirova L.A., Sazanova E.V. Ways to Reduce the Risks of Infection While Training for Work with Microorganisms of the I–II Groups of Pathogenicity (Hazard). *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:80–84. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-80-84

В настоящее время вопросы биологической безопасности получили статус проблемы национального и международного уровней. Научно обоснованная политика нашего государства в этой области направлена на поддержание высокой степени биологической безопасности населения страны.

К приоритетным направлениям государственной политики относятся выявление, анализ, прогно-

зирование, внедрение единых критериев оценки и ранжирования рисков, связанных с негативным воздействием химических и биологических факторов, и, соответственно, осуществление комплекса мероприятий по нейтрализации химических и биологических угроз, предупреждению или минимизации рисков негативного воздействия химических и биологических факторов, повышению защищенности населе-

ния и окружающей среды (Письмо Президента РФ № Пр-2573 от 01.11.2013 г. «Основы государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2025 года и дальнейшую перспективу»). Снижение рисков инфицирования при обучении специалистов, работающих с возбудителями особо опасных инфекционных болезней, является одной из основных задач сотрудников отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Цель статьи – определение приоритетных направлений снижения рисков инфицирования возбудителями особо опасных инфекций (ООИ) слушателей курсов и преподавателей при обучении работе с этой группой микроорганизмов.

Российскими специалистами накоплен огромный опыт в вопросах минимизации рисков условий труда персонала микробиологических лабораторий, работающих с микроорганизмами I–II групп патогенности. Пересмотрены, вновь разработаны и внедрены в практику положения, правила и инструкции, регламентирующие работу с болезнетворными микроорганизмами, в том числе и санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» (СП 1.3.3118-13).

Правила противоэпидемического режима при работах с микроорганизмами I–II групп патогенности действуют длительное время. Одним из наиболее важных моментов является постоянное совершенствование теоретических знаний и практической подготовки персонала, работающего с микроорганизмами, поддержание и углубление навыков безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) и постоянный мониторинг за соблюдением требований биологической безопасности. Персонал опасного объекта должен иметь высокий уровень профессиональной и специальной подготовки по вопросам биологической безопасности, микробиологии, эпидемиологии и лабораторной диагностике возбудителей особо опасных инфекционных болезней.

Обучение специалистов осуществляется в противочумных институтах Российской Федерации и Астраханской противочумной станции, имеющих нормативную и материальную базы, а также квалифицированных преподавателей. В настоящее время в соответствии с действующими нормативными документами допуск к работе с ПБА I–II групп патогенности получают сотрудники, окончившие курсы профессиональной переподготовки с освоением методов безопасной работы с возбудителями особо опасных инфекционных болезней.

В ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» на курсах профессиональной переподготовки по специальностям «Бактериология с основами работы с ПБА I–II групп патогенности (опасности)», «Эпидемиология с основами работы с ПБА I–II групп патогенности (опасно-

сти)», «Лабораторное дело. Особо опасные инфекции» и курсах повышения квалификации различной направленности преподавание ведется ведущими сотрудниками института. Подавляющее большинство преподавателей имеет кандидатские и докторские ученые степени.

Обучение специалистов должно проходить в условиях соблюдения правил и норм биологической безопасности при работе с патогенными биологическими агентами. Одним из обязательных факторов, обеспечивающих минимизацию рисков инфицирования слушателей курсов ПБА, является профессиональная подготовка преподавательского состава, в значительной степени обусловленная уровнем владения профессиональными техническими приемами и знанием возможных источников и механизмов заражения для окружающих [4].

В отделе образовательных программ и подготовки специалистов за годы работы (более 90 лет) сложился определенный алгоритм подготовки вновь пришедших в отдел преподавателей. Научные сотрудники знакомятся с разработанным методическим материалом: инструкциями и планами мероприятий по действиям в чрезвычайных ситуациях применительно к специфике работы отдела, методическими рекомендациями, составленными специально для преподавательского состава отдела, системами операционных процедур, где подробно описаны правила соблюдения требований биологической безопасности при проведении микробиологических работ. Ежеквартально сотрудник, ответственный за соблюдение противоэпидемического режима в отделе, проводит инструктажи для специалистов по вопросам биологической безопасности.

Вновь принятые в отдел преподаватели сначала становятся дублерами более опытных сотрудников в процессе курации работы слушателей курсов в зале для лабораторных занятий и блоке для инфицированных животных, и только после получения профессиональных практических навыков допускаются к самостоятельной работе.

В отделе образовательных программ и подготовки специалистов к проведению определенных практических занятий привлекаются также сотрудники среднего звена – лаборанты и дезинфекторы, имеющие значительный опыт работы.

Инженерно-технические работники и дезинфекторы структурных подразделений, работающих с ПБА, проходят специальную подготовку по биологической безопасности по месту работы в соответствии с должностными обязанностями. В отделе образовательных программ и подготовки специалистов разработана и осуществляется специальная программа подготовки медицинского дезинфектора с учетом специфики работы. Программа включает теоретические и практические занятия и рассчитана на 490 часов обучения.

В результате исследований, проведенных преподавателями отдела, определен оптимальный ком-

плексный подход к оценке надежности профессиональной деятельности персонала, работающего с ПБА I–II групп. Для этого разработан алгоритм определения уровня (класса) профессиональной подготовленности персонала, допускаемого к работам с ПБА I–II групп [2]. Предложенный подход позволил формализовать оценку уровня подготовки специалиста, с помощью методов математической обработки результатов тестирования или экспертной оценки количественно оценить уровень подготовленности сотрудника и риск нарушения подготовленности. Созданы профессиограммы профессиональных групп работников, допускаемых к работам с ПБА I–II групп, проведен анализ результатов профессиографии, регламентированных профессиональных обязанностей, квалификационных требований, реальных условий труда. На основе психологических характеристик сформирован перечень базовых профессионально важных личностных качеств работников из пяти профессиональных групп, допускаемых к работам с ПБА I–II групп. Определены базовые профессионально важные качества (ПВК), присущие работникам различных специальностей, работающих с ПБА. Разработаны методики экспертной оценки ПВК для персонала пяти профессиональных групп. Полученные результаты позволяют провести идентификацию ПВК с использованием наборов психологических тестов.

Итоги психодиагностического обследования специалистов предназначены к использованию для прогноза надежности профессиональной деятельности, подбора системы мер индивидуального управления с учетом межличностных отношений в коллективе, определения комплекса факторов, влияющих на психологическое благополучие и реализацию профессиональных возможностей работника, создания основы продуктивного психологического сопровождения на различных этапах профессиональной деятельности. Полученные данные имеют значение для целей профотбора и профориентации специалистов как при устройстве на работу, так и при обучении и позволяют снизить риски, связанные с влиянием человеческого фактора. На их основании составлены методические рекомендации по идентификации профессионально важных качеств у лиц, принимаемых на работу с патогенными биологическими агентами или оформляющих допуск к работе с ними.

В процессе обучения на курсах профессиональной переподготовки у будущих специалистов формируются необходимые знания, умения и навыки по созданию таких условий работы и поведения, которые гарантировали бы высокую работоспособность и сохранность жизни и здоровья как в штатных, так и в экстремальных ситуациях в условиях вероятных биологических опасностей [1].

Снижение рисков инфицирования ПБА слушателей курсов и преподавателей, а также контаминации микроорганизмами окружающей среды достигается за счет использования современного оборудова-

ния для бактериологической работы. Рабочие столы микробиологов в зале для практических занятий заменены на боксы микробиологической безопасности (БМБ) класса II, типа B2. Все стеклянные составляющие оборудования БМБ, необходимые для проведения микробиологической работы (флаконы для красителей, емкости для дезинфицирующих растворов, пастеровские пипетки, шпатели) заменены на пластиковые, что исключает риск повреждения защитных костюмов и кожных покровов операторов.

Существенное внимание уделяется обеспечению мер биологической безопасности при обучении слушателей курсов работе с экспериментальными животными. В блоке для работы с инфицированными ПБА животными, где осваивают и отрабатывают методы заражения возбудителями ООИ и вскрытия инфицированных животных, в боксе для содержания инфицированных животных установлены металлические клетки типа GE для содержания мелких грызунов. Клетки герметичные, вентилируемые, функционирующие при постоянном отрицательном давлении и удерживающие режим давления при отключении от вентиляционного стеллажа. Клетки оборудованы НЕРА фильтрами на вытяжных клапанах. Использование данного оборудования препятствует контаминации окружающей среды микроорганизмами, выделяющимися в процессе жизнедеятельности инфицированных животных.

В программе профессиональной переподготовки предусмотрено обучение специалистов теоретическим основам и практическим методам работы с возбудителями ООИ. В программу входит такой раздел, как освоение методических приемов при работе с материалом, контаминированным возбудителями ООИ, который предусматривает выработку устойчивых навыков работы с ПБА и позволяет сформировать у слушателя чувство опасности и высокой социальной ответственности за предпринимаемые действия.

Обучение методам лабораторной диагностики возбудителей ООИ должно быть максимально приближенным к условиям реальной деятельности, включая освоение всех этапов лабораторного диагноза – от подготовки проб исследуемого материала до идентификации возбудителя до рода и вида. Учебные программы профессиональной переподготовки специалистов по ООИ составлены таким образом, что изучение культур возбудителей I–II групп патогенности и вызываемых ими инфекционных болезней начинается после освоения требований нормативной документации по безопасной работе с ПБА, приобретения навыков обеспечения биологической безопасности при выполнении манипуляций с инфицированным материалом во время всех общепринятых и специальных бактериологических, биологических, иммунологических, генетических и других методов исследования. После цикла лекций о проблеме биологической безопасности и методах ее обеспечения при работе с микроорганизмами I–II

групп патогенности, демонстрации правил работы с данной группой возбудителей со всеми специфическими особенностями (техники посевов, пипетирования инфицированного материала, приготовления мазков из культур микроорганизмов, заражения и вскрытия лабораторных животных и др.), слушатели курсов осваивают и отрабатывают методические приемы сначала с неинфицированным материалом, затем с использованием ПБА III–IV групп патогенности. Для этого предназначены специальные разделы (модули) программы.

На начальных этапах обучения слушатели курсов профессиональной переподготовки не владеют навыками выполнения микробиологических манипуляций в соответствии с требованиями биологической безопасности. Это провоцирует риск аварийных ситуаций. Нами установлено, что 88,3 % аварий во время практических занятий (при работе за лабораторным столом и в блоке для инфицированных животных) явились следствием невнимательности, неаккуратности, недостаточного владения навыками безопасной лабораторной работы обучающихся [4].

В процессе обучения слушатели курсов изучают алгоритм ликвидации различных видов аварий при работах с ПБА. Помимо теоретического материала в программу курсов профессиональной переподготовки включено практическое занятие, в ходе которого моделируется аварийная ситуация. Преподавателями составляется план тренировочного занятия по ликвидации аварии при работе с ПБА I–II групп патогенности. Сценарий занятия корректируют члены комиссии по соблюдению правил биологической безопасности института и утверждает директор института.

Преподаватели демонстрируют алгоритм действий, проводимых с момента возникновения аварии до окончания ее ликвидации, включая схему оповещения о произошедшей аварии. Проводимые действия сопровождаются комментариями преподавателя. В заключение проводится обсуждение занятия со слушателями курсов и даются ответы на возникающие вопросы. К проведению тренировочного занятия подключают кураторов подразделения по биологической безопасности.

В связи с возрастающими потребностями по созданию надежной системы обеспечения биологической безопасности для минимизации рисков инфицирования ПБА в процессе обучения, сотрудниками отдела проводится работа по подбору коллекции штаммов микроорганизмов со сниженной вирулентностью или авирулентных, которые позволили бы обеспечить адекватную подготовку специалистов в области лабораторной диагностики особо опасных инфекций, а также расширить перечень манипуляций, необходимых слушателям для освоения. Е.В.Сазановой и соавт. [3] было сформулировано понятие «учебного штамма» – оптимального объекта для обучения микробиологии и лабораторной диагностике микроорганизмов на практических за-

нятиях. В качестве «учебного штамма» декларируется авирулентный или аттенуированный штамм, обладающий комплексом свойств, необходимых для проведения индикации, идентификации возбудителя ООИ в полном объеме и его дифференциальной диагностики с родственными видами микроорганизмов, чувствительный к антибактериальным препаратам, используемым для неспецифической профилактики.

В настоящее время сотрудниками отдела образовательных программ и подготовки специалистов ведется работа по созданию «панелей» учебных штаммов возбудителей чумы и холеры и разработке стандартных учебных образцов, имитирующих пробы биологического материала и объектов внешней среды, для освоения лабораторной диагностики ООИ с последующим оформлением соответствующих методических рекомендаций. Это позволит в полной мере реализовать планы обучения и снизить биологические риски во время практических занятий.

Во время обучения на курсах профессиональной переподготовки и повышения квалификации слушатели осваивают не только традиционные микробиологические методы лабораторной диагностики микроорганизмов, но и молекулярно-генетические, иммунобиологические методы индикации ПБА. По программе «Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в диагностике инфекционных болезней и индикации патогенных микроорганизмов» проводят подготовку специалистов методам генной диагностики ООИ, что требует максимально приближенных к действительности условий обучения. Для этого необходимо освоение всех этапов исследования, в том числе и подготовки проб образцов исследуемого материала. Согласно действующим нормативным документам, в качестве имитаторов ПБА не могут быть использованы патогенные микроорганизмы.

Для решения этой проблемы возможно использование авирулентных или слабовирулентных штаммов ПБА или рекомбинантных штаммов на основе непатогенных видов бактерий.

Для обучения индикации возбудителя холеры на практических занятиях по ПЦР-диагностике используются штаммы *E. coli*, содержащие рекомбинантные плазмиды с фрагментами *ctxA* и *tcpA* генов холерного вибриона. Применение этих штаммов позволяет освоить все этапы ПЦР-анализа, включая и этап подготовки проб, а также устраняет возможность инфицирования обучающихся возбудителем холеры.

В итоге при анализе предпринимаемого комплекса мер по снижению рисков инфицирования в процессе обучения работе с ПБА I–II групп патогенности нами выделены следующие приоритетные направления: обучение с использованием слабовирулентных и авирулентных штаммов возбудителей особо опасных инфекционных болезней, а также рекомбинантных штаммов на основе непатогенных бактерий; современное инженерно-техническое обеспечение микробиологических работ; создание

устойчивых навыков работы с ПБА и воспитание профессионально важных качеств у слушателей курсов в ходе образовательного процесса.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ляпин М.Н. Теоретические основы биологической безопасности: формирование базовых положений. *Биозащита и биобезопасность*. 2014; 2(19):18–32.
2. Малукова Т.А., Тихомирова Л.А., Лоцманова Е.Ю., Бойко А.В. Сравнительная характеристика профессиограмм сотрудников, допускаемых к работе с ПБА I–II групп патогенности. *Биозащита и биобезопасность*. 2012; 1(10):47–9.
3. Сазанова Е.В., Малукова Т.А., Попов Ю.А. Учебные штаммы *Yersinia pestis*: критерии подбора, принципы применения. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 3:38–41.
4. Сазанова Е.В., Бойко А.В., Малукова Т.А., Лоцманова Е.Ю. Пути снижения вероятности возникновения аварийных ситуаций при подготовке специалистов для работы с возбудителями I–II групп патогенности. *Биозащита и биобезопасность*. 2012; 1(10):16–20.

#### References

1. Lyapin M.N. [Theoretical basis of biological safety: formulation of fundamental principles]. *Biozashchita i Biobezop.* 2014; 2(19):18–32.
2. Malyukova T.A., Tikhomirova L.A., Lotsmanova E.Yu., Boiko A.V. [Comparative characteristics of the job profile diagrams of the personnel allowed to work with PBA of the I–II groups of hazard]. *Biozashchita i Biobezop.* 2012; 1(10):47–49.
3. 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.
4. Sazanova E.V., Boiko A.V., Malyukova T.A., Lotsmanova E.Yu. [Ways to reduce the possibility of emergency situations in the process of specialists training for work with the agents of the I–II groups of pathogenicity]. *Biozashchita i Biobezop.* 2012; 1(10):16–20.

#### Authors:

*Rastuntseva E.V., Tikhomirova L.A., Sazanova E.V.* Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

#### Об авторах:

*Растунцева Е.В., Тихомирова Л.А., Сазанова Е.В.* Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Поступила 26.05.17.

Е.П.Соколова, В.П.Зюзина, Г.В.Демидова, О.Н.Подладчикова, В.А.Рыкова, В.И.Тынянова

## РОЛЬ РЕЗИДЕНТНЫХ ПЛАЗМИД pMT1, pCD1 И pPCP1 *YERSINIA PESTIS* В ОБРАЗОВАНИИ ЭКСТРАЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ ФОРМЫ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

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

**Целью работы** является изучение роли резидентных плазмид pMT1, pCD1 и pPCP1 в образовании экстрацеллюлярной формы липополисахарида (ЛПС) *Yersinia pestis*. **Материалы и методы.** Работа выполнена на штамме *Y. pestis* EV76 (pMT1, pCD1 и pPCP1), содержащем полный набор плазмид, бесплазмидном варианте *Y. pestis* EV76 (pMT1<sup>-</sup>, pCD1<sup>-</sup>, pPCP1<sup>-</sup>) и изогенных клонах, содержащих одну плазмиду: *Y. pestis* EV76 (pMT1), *Y. pestis* EV76 (pCD1), *Y. pestis* EV76 (pPCP1). О присутствии внеклеточной формы ЛПС в среде икубации клеток *Y. pestis* EV76 судили по токсичности супернатантов для биопробных животных и по реакции LAL-теста. **Результаты и выводы.** Установлено, что экстрацеллюлярную форму ЛПС образуют 37-градусные культуры *Y. pestis* EV76 полноценного штамма и вариантов, содержащих pMT1 или pCD1 плазмиды. Культуры, лишённые плазмид, и вариант, содержащий плазмиду pPCP1, такой способностью не обладают. По результатам LAL-теста процесс отделения ЛПС от мембраны клеточной стенки во внешнюю среду сопряжен с транслокацией белков, кодируемых плазмидами pMT1 и pCD1, и является естественной формой жизнедеятельности клеток чумного микроба. Участие плазмиды pCD1 в реализации токсического потенциала ЛПС *Y. pestis* установлено впервые.

**Ключевые слова:** *Yersinia pestis*, плазмиды, экстрацеллюлярная форма липополисахарида, токсигенность.

Корреспондирующий автор: Соколова Елена Павловна, e-mail: plague@aaanet.ru.

E.P.Sokolova, V.P.Zyuzina, G.V.Demidova, O.N.Podladchikova, V.A.Rykova, V.I.Tynyanova

## The Role of *Yersinia pestis* Resident Plasmids pMT1, pCD1, and pPCP1 in the Production of Lipopolysaccharide Extracellular Form

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

**Objective of the study** is to investigate the role of resident plasmids pMT1, pCD1, and pPCP1 in the production of extracellular form of *Yersinia pestis* lipopolysaccharide (LPS). **Materials and methods.** The experiments have been performed using *Y. pestis* strain EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1), carrying the whole plasmid set, as well as plasmid-free *Y. pestis* variant EV76 (pMT1<sup>-</sup>, pCD1<sup>-</sup>, pPCP1<sup>-</sup>), and isogenic clones, harbouring only one plasmid: *Y. pestis* EV76 (pMT1); *Y. pestis* EV76 (pCD1); *Y. pestis* EV76 (pPCP1). The presence of extracellular LPS in the incubation medium of *Y. pestis* EV76 cells has been confirmed by supernatant toxicity for laboratory animals and also by LAL-test reaction. **Results and conclusions.** It has been established that LPS extracellular form is produced by 37 °C *Y. pestis* EV76 cultures of the initial strain and its variants, carrying pMT1 or pPCP1 plasmid. Plasmid-free cultures and variant harbouring pPCP1 plasmid are deprived of such ability. The results of LAL-test has shown that the process of LPS separation from cell wall membrane into the environment is associated with translocation of proteins encoded by pMT1 and pCD1 plasmids and constitutes a natural form of existence of *Y. pestis* cells. The involvement of pCD1 plasmid in realization of the toxic potential of *Y. pestis* LPS has been established for the first time ever.

**Key words:** *Yersinia pestis*, plasmids, LPS extracellular form, toxigenicity.

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

Corresponding author: Elena P. Sokolova, e-mail: plague@aaanet.ru.

Citation: Sokolova E.P., Zyuzina V.P., Demidova G.V., Podladchikova O.N., Rykova V.A., Tynyanova V.I. The Role of *Yersinia pestis* Resident Plasmids pMT1, pCD1, and pPCP1 in the Production of Lipopolysaccharide Extracellular Form. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:85–89. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-85-89.

Известно, что структурный компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий – липополисахарид (ЛПС) – является основным патогенетическим фактором чумного микроба [1, 11, 12]. ЛПС относится к биологически активным веществам опосредованного действия. Для проявления его токсических свойств необходимо отделение ЛПС от внешней мембраны бактерий и представление рецепторам иммунокомпетентных клеток макроорганизма в свободной функционально-активной форме [11]. По современным представлениям источником свободной формы ЛПС в условиях макроорганизма являются не разрушенные, а живые бактерии, способные выделять ЛПС во внешнюю среду, подобно секре-

ции экзотоксинов белковой природы. Примером может служить возбудитель *Klebsiella pneumoniae* [13]. Вирулентные штаммы этого патогена продуцируют экстрацеллюлярный комплекс капсульного вещества, в состав которого входит токсический компонент – ЛПС. Формирование этого комплекса происходит на всех фазах роста бактерий и является естественным продуктом их жизнедеятельности. Что касается возбудителя чумы, известно, что большинство факторов, определяющих его вирулентные свойства, кодируется тремя резидентными плазмидами – pMT1, pCD1 и pPCP1 [2, 4, 9]. Как правило, это белки, которые экспонируются на поверхности мембраны бактерий или же секретируются за ее пределы. Так, плазмиды pCD1

кодирует белки системы секреции III типа (T3SS) и эффекторные белки – Yops [9]. Плазмида пестициногенности рPCP1 уникальна для чумного микроба, содержит *pla* и *pst* гены. Бактериоцинопестицин секретируется во внешнюю среду, а протеаза Pla локализуется на внешней мембране клеток чумного микроба, и ее активность регулируется высоко-температурным ЛПС [4]. Плазмида рMT1 кодирует два важных видоспецифических белка – фракцию I (Caf1) и мышинный токсин (Ymt, MT). Фракция I формирует на поверхности микроба капсулу, которая не имеет жесткой связи с поверхностными структурами клетки, легко отделяется от них и диффундирует во внешнюю среду [2, 5]. Примечательно, что в состав капсульного вещества входят две токсические субстанции *Y. pestis* – Ymt и ЛПС [8]. Логично было предположить, что токсигенность вирулентных штаммов *Y. pestis*, как и способность клетки вырабатывать и выделять за ее пределы эндотоксин, может быть связана с активностью резидентных плазмид чумного микроба.

Для проверки этого предположения мы сравнили токсические свойства полноценного штамма *Y. pestis* EV76, содержащего весь набор плазмид (рMT1, рCD1, рPCP1), с его бесплазмидным вариантом. О присутствии функционально активной формы ЛПС судили по токсичности для биопробных животных супернатантов клеток, полученных в условиях, описанных нами ранее [3]. Выбор *Y. pestis* EV76 для проведения исследования объясняется биологическими особенностями этого штамма. Клетки *Y. pestis* EV76 не вызывают гибели животных при внутрибрюшинном введении их белым мышам в количестве  $1 \cdot 10^8$  м.к. на мыш. В то же время, при внутривенном введении или же под воздействием биологически активного вещества (БАВ), присутствующего в эритроцитах крови и паренхиматозных органах млекопитающих, бактерии штамма *Y. pestis* EV76 способны вызывать инфекционный процесс, подобно вирулентным штаммам чумного микроба [6, 14, 15]. В дальнейших исследованиях выяснили, что БАВ изменяет конформацию молекул ЛПС, входящих в состав капсульной субстанции бактерий, и способствует переводу ЛПС из биологически инертной в токсически активную форму [8]. Процесс трансформации токсических свойств ЛПС чумного микроба в этих условиях валиден процессу, происходящему *in vivo* при инфекционно-токсическом шоке. Эту модель мы использовали для детекции ЛПС в среде инкубации бактерий *Y. pestis* EV76. Экспериментально установлено, что клетки *Y. pestis* EV76, содержащие полноценный набор плазмид, образуют экстрацеллюлярную форму ЛПС, а бесплазмидные варианты такой способностью не обладают. Функциональная взаимосвязь между плазмидами и активностью эндотоксина чумного микроба описана впервые [3].

Данная работа является продолжением ранее начатых исследований. Цель ее заключается в изучении роли резидентных плазмид в образовании экстрацел-

люлярной формы ЛПС *Y. pestis*. Для тестирования свободной формы ЛПС в среде инкубации бактерий использован LAL-тест, который широко применяется для выявления эндотоксина грамотрицательных бактерий в лекарственных препаратах и биологических жидкостях [7]. Он характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью. Минимальное количество ЛПС, катализирующее переход белков гемолимфы *Limulus polyphemus* в гелеобразное состояние, составляет 0,125 EU/ml. Впервые LAL-тест был включен в фармакопею США в 1985 г.

## Материалы и методы

Объектом исследования служил штамм *Y. pestis* EV76 (рMT1, рCD1, рPCP1). Из него получены бесплазмидный вариант (рMT1<sup>-</sup>, рCD1<sup>-</sup>, рPCP1<sup>-</sup>), а также клоны с одной плазмидой: *Y. pestis* EV76 (рMT1), *Y. pestis* EV76 (рCD1), *Y. pestis* EV76 (рPCP1). Отсутствие интеграции плазмид с хромосомной ДНК подтверждено методом ПЦР с праймерами, комплементарными плазмидным генам *caf1* (плазмида рMT1), *lcrV* (плазмида рCD1) и *pla* (плазмида рPCP1). Бесплазмидный вариант штамма *Y. pestis* EV76 депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий под № КМ1279 (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов).

Для тестирования ЛПС в исследуемых препаратах использовали два методических приема – модель инфекционно-токсического шока (биопробные животные) и LAL-тест. При использовании модели биопробных животных бактерии штамма *Y. pestis* EV76 и его изогенных вариантов с различным набором плазмид выращивали на питательной среде LB (Difco, США) в течение 18 ч при 37 °С. Для перевода ЛПС в токсически активную форму в гемолизованные эритроциты крови человека вносили взвесь бактерий *Y. pestis* EV76 до конечной концентрации  $1-5 \cdot 10^{10}$  м.к./мл и инкубировали 3 ч при 37 °С. Затем клетки осаждали центрифугированием (10 мин при 8000 об./мин), а супернатант вводили внутрибрюшинно белым мышам в объеме 0,1 мл. О присутствии ЛПС в супернатантах судили по гибели животных в течение первых двух суток наблюдения. Каждая группа содержала 10 мышей. Количество погибших животных выражали в процентах. В тексте приведены крайние значения количества павших животных в процентах из 4–6 независимых определений. Эксперименты на животных проводили в соответствии с «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986 г.), согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1987 г.), Федеральному закону о защите животных от жестокого обращения от 01.01.1997 г. и приказу МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г.

В экспериментах с LAL-тестом (набор E-TOXATE Sigma, США) культуры штамма *Y. pestis* EV76 и его изогенных вариантов с различным набором

ром плазмид также выращивали на питательной среде LB (Difco, США) в течение 18 ч при 37 °С. Взвесь бактерий концентрацией  $1-5 \cdot 10^{10}$  м.к./мл готовили на апиогенном (фармакопейном) физиологическом растворе NaCl и инкубировали 3 ч при 37 °С. Затем клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 8000 об./мин. В полученных супернатантах тестировали ЛПС с помощью LAL-теста в соответствии с прилагаемой инструкцией.

### Результаты и обсуждение

Результаты сравнительного исследования токсических свойств *Y. pestis* EV76, содержащих и не содержащих плазмиды pMT1, pCD1 и pPCP1, представлены в табл. 1. Как следует из приведенных данных, оба теста регистрируют ЛПС в супернатантах клеток *Y. pestis*, имеющих полноценный набор плазмид. О присутствии ЛПС на модели инфекционно-токсического шока свидетельствует 80–100 % гибель биопробных животных в течение первых двух суток наблюдения. Ферментативный LAL-тест регистрирует в супернатантах активность ЛПС, равную 32,05 EU/ml. В то же время супернатанты бесплазмидного варианта *Y. pestis* EV76 не токсичны для белых мышей и в LAL-тесте с этими пробами они также дают отрицательный результат. На модели биопробных животных столь же четкие различия токсических свойств выявлены между живыми и убитыми кипячением в течение 30 мин клетками полноценного штамма *Y. pestis* EV76. Среда инкубации живых бактерий токсична для белых мышей, а супернатанты, полученные после инкубации убитых клеток, токсическим эффектом не обладают. В этих же условиях при использовании LAL-теста получены неожиданные результаты: супернатанты как живых, так и убитых клеток *Y. pestis* EV76 давали положительную реакцию на ЛПС. Причин нивелирова-

ния различий могло быть несколько. Возможно, при кипячении взвеси бактерий часть микробных клеток разрушается, а ЛПС в доступной для действия фермента форме выделяется в окружающую среду, что и регистрирует LAL-тест. Вторая причина положительной реакции могла быть связана с присутствием незначительного количества микробных клеток в супернатантах, которые всегда остаются после центрифугирования микробной взвеси. В опытах на животных присутствие  $1 \cdot 10^2-1 \cdot 10^3$  м.к./мл штамма *Y. pestis* EV76 не искажает результаты экспериментов. Однако нельзя исключить, что LAL-тест, в отличие от модели инфекционно-токсического шока, реагирует не только со свободной формой ЛПС, но и со связанным с поверхностью клеточной стенки бактерий ЛПС. С целью проверки этого предположения выполнены следующие эксперименты. Прежде всего, из супернатантов, содержащих свободную форму ЛПС, были удалены клетки *Y. pestis* EV76. Для этого пробы фильтровали через стерильные мембранные фильтры Millex GR (0,22  $\mu$ m, «Merck» Millipore Ltd), с контрольным высевом на наличие живых клеток, а в полученных фильтратах определяли наличие ЛПС LAL-тестом и опытах на биопробных животных. Оба метода подтвердили присутствие ЛПС в бесклеточных фильтратах полноценного штамма *Y. pestis* EV76.

Для того чтобы исключить влияние разрушенных клеток, условия постановки опытов были изменены следующим образом. Взвесь клеток *Y. pestis* EV76, приготовленную на физиологическом растворе ( $1 \cdot 10^{10}$  м.к./мл), осаждали центрифугированием, клетки ресуспендировали в свежем физиологическом растворе, а затем убивали кипячением в течение 30 мин, после этого инкубировали 3 ч при 37 °С, снова осаждали центрифугированием и оценивали полученный супернатант с помощью LAL-теста. Параллельно такую же схему получения супернатанта применили для живой культуры *Y. pestis* EV76. Реакция LAL-теста была положительной в обоих случаях. Можно предположить, что супернатанты живых и убитых клеток отличаются по количественному содержанию ЛПС. Однако титрование проб для определения концентрации ЛПС выявило в обоих супернатантах одинаковое количество ЛПС, равное 32,05 EU/ml.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что LAL-тест вступает в реакцию как со свободной формой ЛПС, так и с ЛПС, связанным с поверхностью клеточной стенки бактерий чумы. Результаты опытов, описанные выше, справедливы для культур, имеющих полноценный набор плазмид. В бесплазмидном варианте *Y. pestis* EV76 ЛПС не тестируется ни в свободной, ни в связанной форме. Факт различий, установленный нами в реакциях с LAL-тестом, свидетельствует о разной молекулярной организации внешней мембраны клеток полноценного и бесплазмидного вариантов *Y. pestis* EV76 не только по количественно-качественному составу белков, но и, видимо, по пространственной

Таблица 1

Тестирование экстрацеллюлярной формы ЛПС в супернатантах полноценного и бесплазмидного вариантов штамма *Y. pestis* EV76

Препараты	Методы исследования	
	LAL-тест, EU/ml	Модель инфекционно-токсического шока, %*
Супернатант <i>Y. pestis</i> EV76 (живые клетки)	32,05	80–100
Супернатант <i>Y. pestis</i> EV76 (убитые клетки)	32,05	0
Супернатант живых клеток <i>Y. pestis</i> EV76 (дважды отмытых физиологическим раствором)	32,05	80–100
Супернатант убитых клеток <i>Y. pestis</i> EV76 (дважды отмытых физиологическим раствором)	32,05	0
Фильтрат супернатанта <i>Y. pestis</i> EV76 (живые клетки)	32,05	80–100
Супернатант бесплазмидного варианта <i>Y. pestis</i> EV76 (живые клетки)	0	0
Супернатант бесплазмидного варианта <i>Y. pestis</i> EV76 (убитые клетки)	0	0

\*Приведены крайние значения количества погибших животных в процентах из шести независимых определений

ориентации молекул ЛПС.

Как известно, переход белков лизата амебоцитов в гелеобразное состояние в системе LAL-теста инициируется липидом А ЛПС грамотрицательных бактерий. В клетках *Y. pestis* EV76, лишенных плазмид, стерическое расположение молекул ЛПС типично для грамотрицательных бактерий. Цепи ЛПС формируют упорядоченную структуру со строгой ориентацией полярных/неполярных полюсов полимера. При этом полисахаридная часть направлена на внешнюю сторону бактериальной клетки, а базальная зона и гликолипидная область ЛПС максимально удалены от наружной поверхности и связаны как с цитоплазматической мембраной, так и пептидогликаном клеточной стенки. При такой ориентации молекул ЛПС доступность липида А (даже в случае R-хемотипа ЛПС) для взаимодействия с белками-ферментами, расположенными за пределами бактериальной клетки, весьма ограничена.

У бактерий *Y. pestis*, имеющих стандартный набор плазмид, архитектура клеточной стенки определяется белками, кодируемыми плазмидами pMT1, pCD1 и pPCP1. В настоящее время установлено, что процесс транслокации белков на поверхность клеточной мембраны представляет собой сложную цепь последовательных реакций взаимодействия белковых и липидных молекул. Видимо, при образовании ЛПС-белкового комплекса в силу стереохимических особенностей полимеров происходит изменение пространственной ориентации молекулы ЛПС. В результате инверсии полярных/неполярных полюсов гликолипидная область ЛПС экспонируется на внешней мембране клеток и стерически становится доступной для взаимодействия с ферментативной системой LAL-теста.

Вопрос о механизме конформационной трансформации ЛПС чумного микроба при взаимодействии с белками, продуцируемыми плазмидами pMT1, pCD1 и pPCP1, может быть предметом специальных исследований. В рамках настоящей работы предпринята попытка оценить роль каждой из плазмид в реализации токсигенных свойств чумного микроба. Результаты экспериментов представлены в табл. 2. Как видно из данных, токсичность супернатантов изогенных вариантов культур *Y. pestis* EV76, содержащих различный набор плазмид, отличается друг от друга и варьирует в пределах от 0 до 100 %. Так, супернатант полноценного штамма *Y. pestis* EV76 вызывает 80–100 % гибель животных в течение первых двух суток наблюдения. После введения белым мышам супернатанта *Y. pestis* EV76 (pCD1), содержащего плазмиду кальцийзависимости, погибло от 40 до 60 % животных, вариант *Y. pestis* EV76 (pMT1) вызывал гибель 10–20 % животных. При введении супернатанта *Y. pestis* EV76 (pPCP1), содержащего только плазмиду пестициногенности, гибели животных вообще не наблюдалось. Супернатант бесплазмидного варианта *Y. pestis* EV76 (pMT1<sup>-</sup>, pCD1<sup>-</sup>, pPCP1<sup>-</sup>) в аналогичных условиях также не обладает

токсическими свойствами.

Данные, полученные на модели инфекционно-токсического шока, полностью совпадают с результатами экспериментов с использованием LAL-теста. Супернатанты клеток *Y. pestis* EV76, содержащих полный набор плазмид, и изогенных вариантов штамма *Y. pestis* EV76, имеющих по одной плазмиде – pCD1 или же pMT1, в LAL-тесте дают положительный результат. В супернатантах клеток штаммов *Y. pestis* EV76 с плазмидой pPCP1 и бесплазмидного варианта ЛПС не выявляется.

Установлено, что отделение ЛПС от клеточной мембраны бактерий во внешнюю среду происходит под влиянием белков, кодируемых плазмидами *Y. pestis* EV76. При этом процесс ЛПС-белковых взаимодействий является основополагающим. В зависимости от химической структуры биополимеров их соединение может изменять функциональную активность как ЛПС, так и белковой молекулы. Наиболее изучен в настоящее время комплекс высокотемпературного ЛПС с Pla белком плазмиды пестициногенности pPCP1, ассоциация которых приводит к ЛПС-зависимому фолдингу Pla. Результаты наших опытов предполагают, что химическая связь между белком Pla и ЛПС в этом комплексе осуществляется через липид А, что блокирует его функционально-активные группы.

Возможность ассоциации ЛПС с МТ установлена нами ранее. В этом комплексе, в отличие от ЛПС-Pla, связь осуществляется через коровую область ЛПС, в результате чего высокотемпературный ЛПС трансформируется из неактивной в токсически активную форму [8].

Участие белков, кодируемых плазмидой pCD1, в реализации токсического потенциала ЛПС установлено нами впервые. Плазмиды кальцийзависимости pCD1, как известно, определяет синтез более 25 белков различного функционального действия (структурные белки аппарата секреции T3SS, эффекторные Yops и регуляторные) [9]. На основании имеющихся данных не представляется возможным сказать, какие

Таблица 2

Тестирование экстрацеллюлярной формы ЛПС в супернатантах изогенных вариантов штамма *Y. pestis* EV76, содержащих одну плазмиду

Препараты	Методы исследования	
	LAL-тест, EU/ml	Модель инфекционно-токсического шока*, %
Супернатант <i>Y. pestis</i> EV76 (pMT1, pCD1, pPCP1)	32,05	80–100
Супернатант <i>Y. pestis</i> EV76 (pCD1)	16,02	40–60
Супернатант <i>Y. pestis</i> EV76 (pMT1)	8,00	10–20
Супернатант <i>Y. pestis</i> EV76 (pPCP1)	0	0
Супернатант бесплазмидного варианта <i>Y. pestis</i> EV76 (pMT1 <sup>-</sup> , pCD1 <sup>-</sup> , pPCP1 <sup>-</sup> )	0	0

\*Приведены крайние значения количества погибших животных в процентах из четырех независимых определений

из белков взаимодействуют с ЛПС. В настоящий момент можно лишь констатировать тот факт, что белки, кодируемые рCD1, вносят максимальный вклад в активацию высокотемпературного ЛПС чумного микроба и способствуют переводу его в экстрацеллюлярную форму.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствует о том, что процесс образования экстрацеллюлярной формы ЛПС строго зависит от экспрессии генов двух плазмид *Y. pestis* – рMT1, рCD1. Полагаем, что переход ЛПС от связанного состояния к свободной форме сопряжен с транслокацией белков, кодируемых этими плазмидами, на поверхность клеточной мембраны или же во внешнюю среду. Существенная роль в реализации токсических свойств ЛПС *Y. pestis* принадлежит, на наш взгляд, капсульной субстанции чумного микроба. Как известно, капсула не имеет жесткой связи с поверхностными структурами клетки, легко отделяется от них и диффундирует во внешнюю среду. Предполагаем, что при отделении капсульного вещества от клеток все биомолекулы, находящиеся на поверхности внешней мембраны и не имеющие ковалентной связи с близлежащими полимерами, включая молекулы ЛПС, «стягиваются» вместе с капсулой в среду инкубации бактерий. Накопление ЛПС в составе капсульной субстанции происходит пропорционально росту и размножению бактерий в организме инфицированного хозяина и является центральным моментом патогенетического действия эндотоксина чумного микроба.

Дальнейшее изучение токсигенности чумного микроба позволит понять молекулярные механизмы этого процесса и степень участия в нем плазмид *Y. pestis*.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимов А.П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение 1. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2002; (3):3–23.
2. Бывалов А.А., Оводов Ю.С. Иммунобиологические свойства антигенов *Yersinia pestis*. *Биоорганическая химия.* 2011; 37(4):452–63.
3. Демидова Г.В., Соколова Е.П., Зюзина В.П., Рыкова В.А., Морозова И.В., Подладчикова О.Н., Тынянова В.И. Влияние внехромосомных элементов наследственности на токсические свойства *Yersinia pestis*. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2017; 2:28–33.
4. Евсеева В.В., Платонов М.Е., Копылов П.Х., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Активатор плазминогена чумного микроба. *Инф. и иммунитет.* 2015; 5(1):27–36.
5. Кадникова Л.А., Копылов П.Х., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Капсульный антиген чумного микроба. *Инф. и иммунитет.* 2015; 5(3):201–18.
6. Кравцов А.Н., Тынянова В.И., Зюзина В. Повышение вирулентности бактерий *Yersinia pestis* при инкубации клеток в гемолизированных эритроцитах крови человека. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1993; 4:3–6.
7. Ситников А.Г., Травина Л.А., Багирова В.Л. ЛАЛ-тест. Современные подходы к определению пирогенности. М.; 1997. 96 с.
8. Тынянова В.И., Зюзина В.П., Демидова Г.В., Соколова Е.П. Специфичность иммуномодулирующего действия эндотоксина чумного микроба. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммуно-*

*биол.* 2016; 3:104–12.

9. Dewoody R.S., Merritt P.M., Marketon M.M. Regulation of the *Yersinia* type III secretion system: traffic control. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013; 3:4. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00004.

10. Huang X.Z., Nicolich M.P., Linder L.E. Current trends in plague research: from genomics to virulence. *Clin. Med. Res.* 2006; 4(3):189–99. DOI: 10.3121/cmr.4.3.189.

11. Matsuura M., Takahashi H., Watanabe H., Saito S., Kawahara K. Immunomodulatory effects of *Yersinia pestis* lipopolysaccharides on human macrophage. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010; 17(1):49–55. DOI: 10.1128/CVI.00336-09.

12. Montminy S.W., Khan N., McGrath S., Walkowicz M.J., Sharp F., Conlon J.E., Fukase K., Kusumoto S., Sweet C., Miyake K., Akira S., Cotter R.J., Goguen J.D., Lien E. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *J. Nat. Immunol.* 2006; 7(10):1066–73. DOI: 10.1038/ni1386.

13. Straus D.C., Atkisson D.L., Garner C.W. Importance of a lipopolysaccharide-containing extracellular toxic complex in infections produced by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 1985; 50(3):787–95.

14. Ue T., Brubaker R.R. Roles of V antigen in promoting virulence and immunity in yersiniae. *J. Immunol.* 1984; 133(4):2226–30.

15. Yang H., Wang T., Tian G., Zhang Q., Wu X., Xin Y., Yan Y., Tan Y., Cao S., Liu W., Cui Y., Yang R., Du Z. Host transcriptomic responses to pneumonic plague reveal that *Yersinia pestis* inhibits both the initial adaptive and innate immune responses in mice. *Int. J. Med. Microbiol.* 2017; 307(1):64–74. DOI: 10.1016/j.ijmm.2016.11.002.

#### References

1. Anisimov A.P. [*Yersinia pestis* factors maintaining circulation and persistence of plague agent in ecosystems of natural foci. Communication 1]. *Mol. Genet., Mikrobiol. Virusol.* 2002; (3):3–23.
2. Byvalov A.A., Ovodov Yu.S. [Immunobiological properties of *Yersinia pestis* antigens]. *Bioorganich. Khim.* 2011; 37(4):452–63.
3. Demidova G.V., Sokolova E.P., Zyuzina V.P., Rykova V.A., Morozova I.V., Podladchikova O.N., Tynyanova V.I. [The influence of extrachromosomal inheritance elements on *Yersinia pestis* toxicity]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2017; 2:28–33.
4. Evseeva V.V., Platonov M.E., Kopylov P.Kh., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. [Plasminogen activator of *Yersinia pestis* microbe]. *Infek. i Immunitet.* 2015; 5(1):27–36.
5. Kadnikova L.A., Kopylov P.Kh., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. [Capsular antigen of *Yersinia pestis* microbe]. *Infek. i Immunitet.* 2015; 5(3):201–218.
6. Kravtsov A.N., Tynyanova V.I., Zyuzina V.P. [Increase in the virulence of *Yersinia pestis* after their incubation in hemolyzed human red blood cells]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1993; 4:3–6.
7. Sitnikov A.G., Travina L.A., Bagirova B.L. [LAL-test. Current approaches to determination of pyrogenicity]. М.; 1997. 96 p.
8. Tynyanova V.I., Zyuzina V.P., Demidova G.V., Sokolova E.P. [Specificity of immune-modulating effect of *Yersinia pestis* endotoxin]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2016; 3:104–12.
9. Dewoody R.S., Merritt P.M., Marketon M.M. Regulation of the *Yersinia* type III secretion system: traffic control. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013; 3:4. DOI: 10.3389/fcimb.2013.00004.
10. Huang X.Z., Nicolich M.P., Linder L.E. Current trends in plague research: from genomics to virulence. *Clin. Med. Res.* 2006; 4(3):189–99. DOI: 10.3121/cmr.4.3.189.
11. Matsuura M., Takahashi H., Watanabe H., Saito S., Kawahara K. Immunomodulatory effects of *Yersinia pestis* lipopolysaccharides on human macrophage. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010; 17(1):49–55. DOI: 10.1128/CVI.00336-09.
12. Montminy S.W., Khan N., McGrath S., Walkowicz M.J., Sharp F., Conlon J.E., Fukase K., Kusumoto S., Sweet C., Miyake K., Akira S., Cotter R.J., Goguen J.D., Lien E. Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. *J. Nat. Immunol.* 2006; 7(10):1066–73. DOI: 10.1038/ni1386.
13. Straus D.C., Atkisson D.L., Garner C.W. Importance of a lipopolysaccharide-containing extracellular toxic complex in infections produced by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 1985; 50(3):787–95.
14. Ue T., Brubaker R.R. Roles of V antigen in promoting virulence and immunity in yersiniae. *J. Immunol.* 1984; 133(4):2226–30.
15. Yang H., Wang T., Tian G., Zhang Q., Wu X., Xin Y., Yan Y., Tan Y., Cao S., Liu W., Cui Y., Yang R., Du Z. Host transcriptomic responses to pneumonic plague reveal that *Yersinia pestis* inhibits both the initial adaptive and innate immune responses in mice. *Int. J. Med. Microbiol.* 2017; 307(1):64–74. DOI: 10.1016/j.ijmm.2016.11.002.

#### Authors:

Sokolova E.P., Zyuzina V.P., Demidova G.V., Podladchikova O.N., Rykova V.A., Tynyanova V.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:

Соколова Е.П., Зюзина В.П., Демидова Г.В., Подладчикова О.Н., Рыкова В.А., Тынянова В.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 14.06.17.

А.Л.Кравцов, С.Н.Клюева, Т.Н.Щуковская, С.А.Бугоркова

## ЭФФЕКТ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ И ПРОТИВОТУЛЯРЕМИЙНОЙ ВАКЦИНАЦИИ НА АПОПТОЗ И ЛИЗИС СПЛЕНОЦИТОВ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ *IN VITRO* С ТУЛЯРИНОМ

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

**Цель работы.** Оценка влияния иммуномодуляторов на интенсивность пост-апоптотического лизиса лейкоцитов сенсibilизированного организма в присутствии специфических антигенов туляремийного микроба в условиях *in vitro*. **Материалы и методы.** В работе использовался метод проточной цитофлуориметрии для определения относительного содержания пролиферирующих и апоптотических спленоцитов мышей, иммунизированных против туляремии на фоне иммуномодуляции. **Результаты и выводы.** В работе получена информация, которая согласуется с современными данными о массивном апоптозе и пост-апоптотическом аутолизисе (вторичном некрозе) лейкоцитов при туляремийной инфекции. Учитывая важную роль лейкоцитолита в развитии системной воспалительной реакции, для снижения реактогенных свойств живой туляремийной вакцины может быть перспективно использование иммуномодуляторов, подавляющих апоптоз макрофагов и лизис погибших лейкоцитов при взаимодействии с антигенами *Francisella tularensis*.

**Ключевые слова:** *Francisella tularensis*, живая туляремийная вакцина, апоптоз и вторичный некроз лейкоцитов, полиоксидоний, даларгин, проточная цитометрия.

Корреспондирующий автор: Кравцов Александр Леонидович, e-mail: rusrap1@microbe.ru.

A.L.Kravtsov, S.N.Klyueva, T.N.Shchukovskaya, S.A.Bugorkova

## Effect of Immunomodulators and Anti-Tularemia Vaccination on Apoptosis and Lysis of Splenocytes Interacting with Tulyarin *in vitro*

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

**Objective** of the study is to evaluate the effect of immunomodulators on the intensity of the post-apoptotic lysis of sensitized organism leukocytes in the presence of specific antigens of tularemia microbe *in vitro*. **Materials and methods.** Flow cytometry method was used to determine the relative content of apoptotic and proliferating splenocytes obtained from mice, immunized against tularemia against the background of immunomodulation. **Results and conclusions.** Obtained is the evidence that is consistent with modern data on the massive leukocyte apoptosis and post-apoptotic leukocyte autolysis (secondary necrosis) in case of tularemia infection. Given the important role of secondary necrosis in the systemic inflammatory response development, the use of immunomodulators suppressing macrophage apoptosis and dead leukocyte lysis, emerging in the course of interaction with *Francisella tularensis* antigens, may be promising in order to reduce the live tularemia vaccine reactogenicity.

**Keywords:** *Francisella tularensis*, live tularemia vaccine, apoptosis and secondary necrosis of leukocytes, polyoxidonium, dalargin, flow cytometry.

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

**Corresponding author:** Alexander L. Kravtsov, e-mail: rusrap1@microbe.ru.

**Citation:** Kravtsov A.L., Klyueva S.N., Shchukovskaya T.N., Bugorkova S.A. Effect of Immunomodulators and Anti-Tularemia Vaccination on Apoptosis and Lysis of Splenocytes Interacting with Tulyarin *in vitro*. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:90–94. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-90-94

При диагностике туляремии у человека, а также при оценке напряженности иммунитета у лиц, вакцинированных против туляремии, перспективно использование реакции лейкоцитолита, основанной на явлении разрушения лейкоцитов сенсibilизированного организма под действием специфического антигена в условиях *in vitro*. Результат реакции оценивается в настоящее время субъективно путем визуального подсчета лейкоцитов в камере Горяева. Разрушенные клеточные элементы при этом не учитывают [4].

Молекулярные механизмы, лежащие в основе феномена лейкоцитолита, недостаточно изучены, и анализ литературы за последнее десятилетие свидетельствует, что при туляремии лизируются лейко-

циты, которые, взаимодействуя с бактериальными антигенами и токсинами, гибнут по типу индуцированного апоптоза, но в условиях массивной гибели и снижения функциональной активности макрофагов своевременно не удаляются из организма с помощью фагоцитоза. Такие клетки подвергаются *in vivo* пост-апоптотическому аутолизису (вторичному некрозу), что приводит к высвобождению в ткани организма опасных аутологических молекул (DAMPs – damage associated molecular patterns), способных запускать системную воспалительную реакцию. Считается, что вторичный некроз лейкоцитов (лейкоцитолит) играет важную роль в патогенезе туляремии и других бактериальных инфекций с массивной гибелью лейкоцитов по типу апоптоза [9].

При отсутствии или недостаточном количестве функционально активных клеток «мусорщиков» (тканевых макрофагов) апоптоз всегда завершается вторичным некрозом. Именно поэтому в условиях *in vitro* лейкоцитоллиз неизбежен, если механизм гибели лейкоцитов по типу апоптоза уже запущен [10]. Модуляторы функциональной активности клеток врожденного иммунитета (фагоцитов), такие как даларгин (ДА) [2] или полиоксидоний (ПО) [3], должны влиять, согласно нашей гипотезе, на интенсивность пост-апоптотического лизиса лейкоцитов сенсibilизированного организма в присутствии специфических антигенов туляремийного микроба в условиях *in vitro*.

Целью настоящей работы явилось экспериментальное подтверждение данной гипотезы на модели взаимодействия с тулярином спленоцитов мышей, привитых живой туляремийной вакциной.

### Материалы и методы

Вакцинный штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полученный из «Государственной коллекции патогенных бактерий» ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», выращивали на FT-агаре с глюкозо-витаминной добавкой (ФБУН ГНЦ ПМБ) при температуре 37 °С в течение 48 ч. Взвеси живых микробных клеток готовили в стерильном 0,9 % растворе натрия хлорида, рН 7,2, по стандартному образцу мутности ОСО-42-28-85П 10 единиц, эквивалентному  $5 \cdot 10^9$  м.к./мл.

Мышей линии Balb/c массой 18–20 г подкожно иммунизировали *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе  $10^4$  м.к., а также в сочетании с ПО или ДА. Иммуномодуляторы (ПО фирмы ООО «НПО Петровакс Фарм», Россия и ДА ФГУ «РКНПК», Россия) вводили животным подкожно за 60 мин до вакцинации в дозе 4 и 2 мкг соответственно. Контрольную группу составили интактные мыши. Всего в работе использовано 48 животных (по 12 особей в каждой группе).

Все манипуляции на животных осуществляли с одобрения комитета по биоэтике Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (протокол № 1 от 30.09.2015 г.).

На 21-е сутки иммуногенеза мышей умерщвляли декапитацией, забирали селезенку и общепринятым методом выделяли спленоциты (СП). В мазках, окрашенных по Романовскому-Гимзе, определяли относительное содержание лимфоцитов и фагоцитов (селезеночных макрофагов). Макрофаги селезенки (МС) выделяли из суммарной фракции СП путем адгезии на пластиковых чашках Петри, инкубируемых в течение 2 ч при 37 °С в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Жизнеспособность СП и макрофагов в момент их выделения подтверждали в тесте с трипановым синим [6].

В опытах *in vitro* использовали аллерген туляремийный жидкий для накожного применения (коммерческий препарат тулярин), представляющий

собой взвесь туляремийных микробов вакцинного штамма *F. tularensis* линии 15 НИИЭГ, убитых нагреванием в 0,9 % растворе хлорида натрия (ФГУН «НПО «Микроген», Омск). Исследуемые взвеси СП и МС каждой группы мышей делили на четыре части, в которые добавляли соответственно физиологический раствор (контроль), тулярин в количестве  $5 \cdot 10^8$  м.к./мл, тулярин в сочетании с ПО или ДА. Рабочие концентрации ПО и ДА для экспериментов *in vitro* выбирали по литературным данным [2, 3]: 100 и 2 мкг/мл соответственно. Клетки инкубировали в течение 24 ч при 37 °С во влажной атмосфере CO<sub>2</sub>.

Методом проточной цитофлуориметрии исследовали до и после инкубации характер распределения отдельных клеток по клеточному циклу для определения относительного содержания (в %) пролиферирующих и апоптотических клеток, несущих соответственно более 2С ДНК (стадии S+G2+М клеточного цикла) и менее 2С ДНК на клетку [5]. Для этого клетки осаждали центрифугированием (400 g, 10 мин), фиксировали 70 % этанолом, окрашивали раствором, содержащим 50 мкг/мл пропидия йодида (MP Biomedicals, LLC, Germany), 100 мкг/мл РНКазы (Thermo Scientific, Lithuania-Литва), 0,1 % Triton X-100 (MP Biomedicals, LLC, Germany) [7] и анализировали на проточном цитометре CyAn ADP (Дания).

Часть СП и СМ подвергали гипотоническому шоку в деионизованной воде с восстановлением солевого баланса 10-кратным раствором Хенкса (МПБП, Россия) через 10 с, чтобы обеспечить лизис эритроцитов при сохранении стабильности мембран мышечных спленоцитов [1]. Интенсивного лизиса СП добивались путем увеличивая срока пребывания клеток в воде до 18 с. После данной процедуры клетки и клеточный дебрис осаждали центрифугированием, фиксировали этанолом и после окраски по ДНК исследовали на проточном цитометре.

Результаты анализа обрабатывали статистически, определяя достоверность различий по t-критерию Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Результаты контрольных экспериментов с лейкоцитами, подвергнутыми гипотоническому шоку, показали способность проточной цитофлуориметрии регистрировать разрушенные клеточные элементы по интенсивности их ДНК-флуоресценции. Неповрежденные диплоидные клетки, обладающие в норме одинаково интенсивной ДНК-флуоресценцией (рис. 1, А), сохраняли свою целостность после 10 с пребывания в условиях гипотонического шока. Состояние их ядер не изменялось (рис. 1, Б). При увеличении срока пребывания клеток в воде до 18 с лейкоциты и их ядра разрушались. В результате (рис. 1, В), в более чувствительном логарифмическом режиме ДНК-анализа учитывались сигналы ДНК-флуоресценции, как от оставшихся неповрежденных

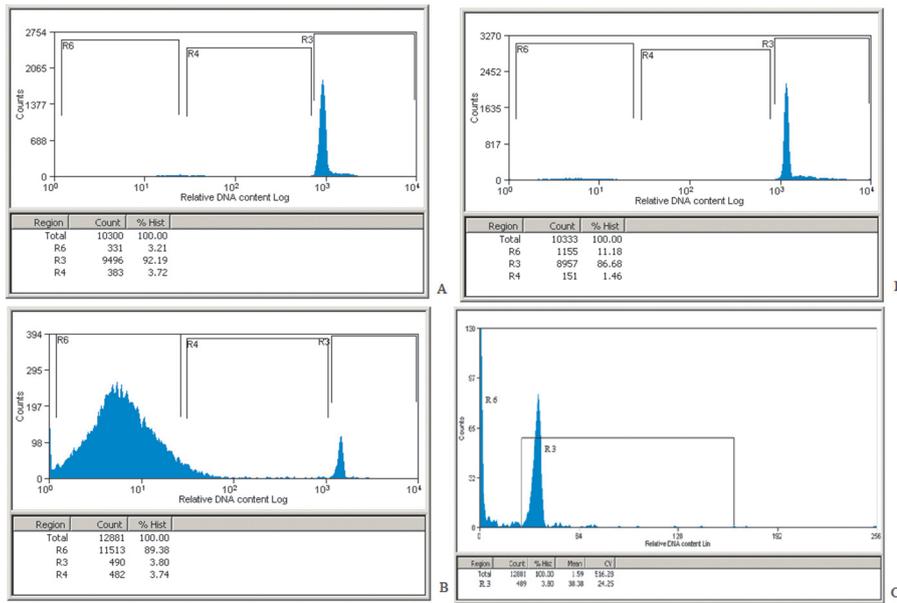


Рис. 1. Результаты цитофлуориметрического ДНК-анализа спленоцитов контрольного животного, подвергнутого в деионизованной воде гипотоническому шоку различной длительности:

A – контроль (без гипотонического шока); B – гипотонический шок в течение 10 с; C – гипотонический шок в течение 18 с в линейном режиме ДНК-анализа; A, B, C – получены в логарифмическом режиме ДНК-анализа; R3, R4, R6 – области гистограмм, соответствующие целым, неповрежденным апоптотическим и лизированным клеткам

диплоидных СП (область R3 на ДНК-гистограмме), так и от разрушенных (лизированных) клеток (область R6). При ДНК-анализе того же образца в линейном режиме с относительно небольшим числом каналов измерения невозможно было идентифицировать пик на ДНК-гистограмме, характерный для лизированных СП (рис. 1, Г), поскольку слабые импульсы ДНК-флуоресценции от разрушенных клеточных ядер не дифференцировались от фонового свечения красителя.

Полученные в логарифмическом режиме ДНК-гистограммы (рис. 2) наглядно иллюстрируют различную реакцию лейкоцитов иммунного и не иммунного организма на контакт с тулярином в условиях *in vitro*. Через 24 ч инкубации в популяциях СП и МС, выделенных из иммунного организма через три недели после иммунизации мышей живой туляремийной вакциной, клетки подвергаются в присутствии тулярина значительно более интенсивному лизису (рис. 2, Б и Г), чем в популяциях СП и МС, получен-

ных от контрольных животных (рис. 2, А и В).

В таблице представлены статистически обработанные экспериментальные данные, которые свидетельствуют, что, когда эффект исследуемых иммуномодуляторов (*in vivo* и *in vitro*) отсутствовал, соблюдалась прямая корреляция между интенсивностью лизиса СП мышей через сутки взаимодействия их с тулярином в условиях *in vitro* и интенсивностью гибели МС по типу апоптоза *in vivo* к моменту начала процесса инкубации. На 21-е сутки после иммунизации мышей живыми клетками вакцинного штамма туляремийного микроба доля МС в апоптозе увеличилась относительно нормы в 2,5 раза (в среднем с 10,3 до 24,9 %,  $p < 0,05$ ). Поэтому одной из вероятных причин более интенсивного лизиса МС, выделенных именно из иммунного организма, может быть попадание в условия *in vitro* для взаимодействия с тулярином значительно большего числа клеток с уже запущенным *in vivo* механизмом гибели.

Кроме того, нами замечено, что при исследова-

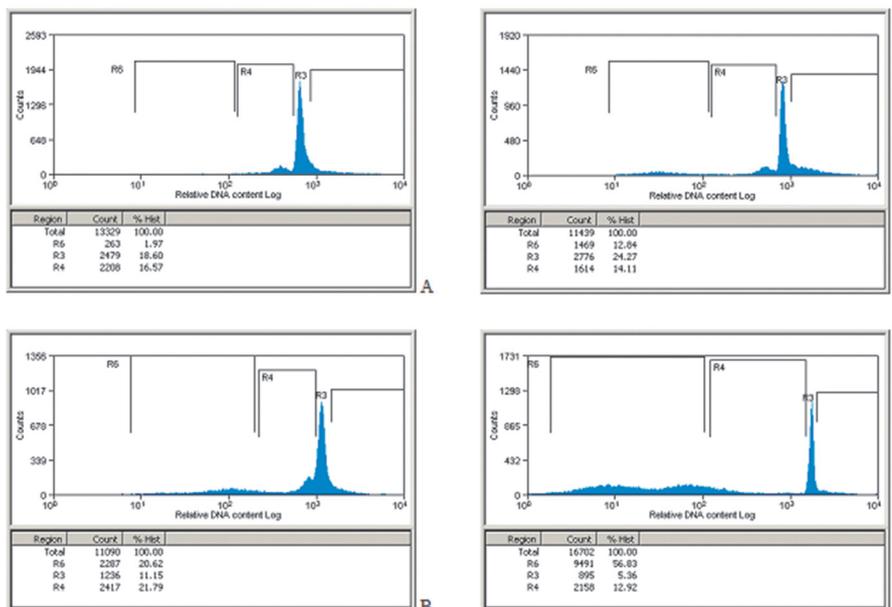


Рис. 2. Цитофлуориметрические ДНК-гистограммы, иллюстрирующие влияние противотуляремийной вакцинации на лизис спленоцитов и макрофагов селезенки, взаимодействующих *in vitro* с тулярином:

A, B – спленоциты контрольного и иммунного животного соответственно; C, D – макрофаги селезенки контрольного и иммунного животного соответственно; R3, R4, R6 – области гистограмм, соответствующие пролиферирующим, апоптотическим и лизированным клеткам

нии СП вакцинированных животных значения показателя клеточной пролиферативной активности были ниже в пробах с тулярином, где регистрировался повышенный уровень лейкоцитоллиза, чем в пробах без тулярина (таблица). Проллиферирующие лейкоциты, находящиеся на стадиях репликации ДНК, предмитоза и митоза, обладали более высокой чувствительностью к внешнему цитотоксическому воздействию. Более интенсивным аутолизом на повторный контакт с инфекционным агентом (или его антигенами) могут также отвечать лейкоциты сенсibilизированного организма, формирующие во внеклеточном пространстве бактерицидные ДНК-сети (внеклеточные ловушки), необходимые для существенного повышения эффективности киллинга бактерий в условиях *in vivo* и *in vitro* [8].

Иммуномодуляторы, добавленные к СП или МС совместно с тулярином, оказывали влияние на интенсивность реакции лейкоцитоллиза (таблица), так как в присутствии ПО или ДА тулярин фактически

утрачивал способность к запуску процесса лизиса СП и МС иммунного организма. В случае, когда ПО применялся *in vivo* при противотуляремийной вакцинации (группа *F. tularensis* + ПО), отмечали *in vitro* повышение уровня клеточной пролиферативной активности при существенном снижении интенсивности лизиса СП в присутствии тулярина. Введение ДА за 60 мин до противотуляремийной вакцинации (группа *F. tularensis* + ДА) активировало пролиферацию СП. В присутствии тулярина, а также тулярина с ДА, СП подвергались апоптозу, но фактически не лизировались.

Таким образом, полученная в работе информация согласуется с современными представлениями о важной роли индуцируемого бактериями апоптоза в развитии при туляремии процесса лейкоцитоллиза. Противотуляремийная вакцинация активировала в организме животных апоптоз селезеночных макрофагов и в результате стимулировала процесс пост-апоптотического лизиса спленоцитов, взаимодей-

**Влияние иммуномодуляторов и противотуляремийной вакцинации на показатели лизиса, апоптоза и пролиферации спленоцитов (СП) и макрофагов селезенки (МС) при взаимодействии *in vitro* с тулярином**

Группа животных	Клетки	Индуктор	N <sub>лиз</sub>	N <sub>А</sub>	N <sub>П</sub>	N <sub>А</sub> <sup>0</sup> /N <sub>П</sub> <sup>0</sup>
Контроль	СП	ФР	3,5±0,3	20,8±0,6	22,20±1,0	3,9±0,7/8,6±0,5
		Тулярин	3,0±0,6	19,8±1,2	19,7±0,8	
		Тулярин + ПО	2,8±0,2	23,3±0,9	20,6±0,6	
		Тулярин + ДА	8,8±0,7*	26,3±1,1*	29,2±1,5	
	МС	ФР	5,4±1,1	44,5±2,4	14,2±1,8	10,3±0,6/14,7±0,4
		Тулярин	24,5±2,7*	26,1±0,4*	8,2±1,3	
		Тулярин + ПО	5,5±0,1	51,8±2,8	10,6±0,1	
		Тулярин + ДА	15,5±1,7*	45,1±3,5	5,6±0,3*	
<i>F. tularensis</i>	СП	ФР	5,2±0,7	12,2±0,2	32,1±1,5*	2,1±0,7/6,6±0,4
		Тулярин	15,5±2,2*	27,5±2,6	23,9±1,9	
		Тулярин + ПО	4,9±0,7	19,7±1,5*	27,2±0,2*	
		Тулярин + ДА	6,6±1,8	30,9±0,5*	25,7±1,4	
	МС	ФР	3,2±0,8	29,2±1,6	9,4±1,0	24,9±2,4*/7,6±0,6
		Тулярин	38,4±4,6	21,1±2,1	10,9±1,5	
		Тулярин + ПО	9,6±2,6	28,5±2,3*	16,6±2,0	
		Тулярин + ДА	8,9±0,2	35,0±4,1	14,7±2,5	
<i>F. tularensis</i> + ПО	СП	ФР	1,5±0,07	16,5±1,3	33,0±0,6	2,8±0,6/11,6±1,1
		Тулярин	7,8±0,9*	17,6±1,3	25,2±0,6*	
		Тулярин + ПО	2,6±0,4	22,1±1,3	25,6±1,0*	
	МС	ФР	25,83±1,0*	23,1±0,4*	14,6±0,2	18,6±0,3/15,2±0,4
		Тулярин	19,8±3,3	39,5±0,3*	10,0±0,6	
		Тулярин + ПО	5,3±0,7	30,3±2,2*	22,5±2,0*	
<i>F. tularensis</i> + ДА	СП	ФР	2,7±0,1	18,3±2,8	37,6±2,6*	13,4±0,3/9,3±1,1
		Тулярин	5,8±0,6*	36,0±0,5*	23,8±0,3	
		Тулярин + ДА	2,9±0,3*	28,4±0,3	28,8±0,5	
	МС	ФР	5,5±1,0	55,6±0,1	10,9±0,1	33,3±1,3*/9,8±0,8
		Тулярин	10,0±0,3*	39,6±0,2*	7,0±0,8	
		Тулярин + ДА	4,4±0,4*	36,4±0,3*	11,0±0,6*	

\* достоверность различий по отношению к аналогичным показателям в контроле (p<0,05).

ПО – полиоксидоний, ДА – далаггин, ФР – физиологический раствор (0,9 % раствор натрия хлорида, рН 7,2), N<sub>лиз</sub>, N<sub>А</sub>, N<sub>П</sub> – соответственно количество лизированных, апоптотических и пролиферирующих клеток через 24 ч инкубации; N<sub>А</sub><sup>0</sup>/N<sub>П</sub><sup>0</sup> – показатели апоптоза и пролиферации интактных и вакцинированных животных на 21-е сутки иммуногенеза в момент начала культивирования *in vitro* (0 ч).

ствующих с тулярином в условиях *in vitro*. Учитывая важную роль вторичного некроза фагоцитов в развитии системного воспаления при туляремии [9], для снижения реактогенных свойств живой туляремийной вакцины перспективно использование иммуномодуляторов (ПО и ДА), подавляющих апоптоз макрофагов при противотуляремийной вакцинации, а также лизис лейкоцитов сенсibilизированного организма под влиянием специфических антигенов туляремийного микроба в условиях *in vitro*. Кроме того, полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют, что на основе метода проточной цитофлуориметрии в перспективе возможна разработка более совершенного способа учета результатов реакции лейкоцитолита в опытах с лейкоцитами крови человека и лабораторных животных.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахматова Н.К., Грубер И.М., Ахматов Э.А., Черкасова Л.С., Игнатова О.М., Михайлова Н.А. Стафилококковая вакцина: влияние на киллерную активность лейкоцитов и неспецифическую резистентность. *Иммунология*. 2014; 35(3):143–6.
2. Балачевский Б.В., Курзанов А.Н., Славинский А.А. Даларгин-индуцируемая модуляция функционально-метаболической активности нейтрофильных лейкоцитов. *Успехи совр. естествознания*. 2008; 5:75–7.
3. Дьяконова В.А., Дамбаева С.В., Голубева Н.М., Бураков В.В., Шаронов Г.В., Комогорова Е.Э., Пинегин Б.В. Изучение механизма действия иммуномодулятора полиоксидония на клеточном и молекулярном уровнях на клетках периферической крови человека в условиях *in vitro*. *Физиол. и патол. иммунной системы*. 2004; 8(2):32–6.
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
5. Сибиряк С.В., Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Оценка апоптоза в иммунологических исследованиях. Вопросы современной проточной цитометрии. Клиническое применение. Челябинск: Бумажный двор; 2008. 195 с.
6. Фримель Х. Иммунологические методы. М.: Медицина; 1987. 472 с.
7. Bi Y., Du Z., Yang H., Guo Z., Tan Y., Zhu Z., Yang R. Reduced apoptosis of mouse macrophages induced by *uscW* mutant of *Yersinia pestis* results from the reduced secretion of YopJ and relates to caspase-3 signal pathway. *Scand. J. Immunol.* 2009; 70(4):358–67. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2009.02297.x.
8. Landoni V.I., Chiarella P., Martire-Greco D., Schierloh P., van Rooijen N., Rearte B., Palermo M.S., Isturiz M.A., Fernandez

G.C. Tolerance to lipopolysaccharide promotes an enhanced neutrophil extracellular traps formation leading to a more efficient bacterial clearance in mice. *Clin. Exper. Immunol.* 2012; 168(1):153–63. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2012.04560.x.

9. Silva M.T. Bacteria-induced phagocyte secondary necrosis as a pathogenicity mechanism. *J. Leuk. Biology.* 2010; 88(5):885–96. DOI: 10.1189/jlb.0410205.

10. Silva M.T., do Vale A., dos Santos N.M. Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications. *Apoptosis*. 2008; 13(4):463–82. DOI: 10.1007/s10495-008-0187-8.

#### References

1. Akhmatova N.K., Gruber I.M., Akhmatov E.A., Cherkasova L.S., Ignatova O.M., Mikhailova N.A. [Staphylococcal vaccine: effect on killer activity of leucocytes and non-specific resistance]. *Immunologia*. 2014; 35(3):143–6.
2. Balachevsky B.V., Kurzanov A.N., Slavinsky A.A. [Dalargin-induced modulation of functional-metabolic activity in neutrophilic leucocytes]. *Uspekhi Sovrem. Estestvoznaniya*. 2008; 5:75–7.
3. D'yakonova V.A., Dambaeva S.V., Golubeva N.M., Burakov V.V., Sharonov G.V., Komogorova E.E., Pinegin B.V. [Investigation of the mechanism of action of such immune-modulator as polyoxidonium at the cellular and molecular levels by the example of human peripheral blood cells *in vitro*]. *Fiziol. i Patol. Immunnoi Sistemy*. 2004; 8(2):32–6.
4. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. M.: CJSC "Shiko"; 2013. 560 p.
5. Sibiryak S.V., Khaidukov S.V., Zurochka A.V. [Assessment of apoptosis in immunological investigations]. In: [Problems of Modern Flow Cytometry. Clinical Application]. Chelyabinsk; 2008. 195 p.
6. Frimel Kh. [Immunological Methods]. M.: "Meditsina"; 1987. 472 p.
7. Bi Y., Du Z., Yang H., Guo Z., Tan Y., Zhu Z., Yang R. Reduced apoptosis of mouse macrophages induced by *uscW* mutant of *Yersinia pestis* results from the reduced secretion of YopJ and relates to caspase-3 signal pathway. *Scand. J. Immunol.* 2009; 70(4):358–67. DOI: 10.1111/j.1365-3083.2009.02297.x.
8. Landoni V.I., Chiarella P., Martire-Greco D., Schierloh P., van Rooijen N., Rearte B., Palermo M.S., Isturiz M.A., Fernandez G.C. Tolerance to lipopolysaccharide promotes an enhanced neutrophil extracellular traps formation leading to a more efficient bacterial clearance in mice. *Clin. Exper. Immunol.* 2012; 168(1):153–63. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2012.04560.x.
9. Silva M.T. Bacteria-induced phagocyte secondary necrosis as a pathogenicity mechanism. *J. Leuk. Biology.* 2010; 88(5):885–96. DOI: 10.1189/jlb.0410205.
10. Silva M.T., do Vale A., dos Santos N.M. Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications. *Apoptosis*. 2008; 13(4):463–82. DOI: 10.1007/s10495-008-0187-8.

#### Authors:

Kravtsov A.L., Klyueva S.N., Shchukovskaya T.N., Bugorkova S.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

#### Об авторах:

Кравцов А.Л., Ключева С.Н., Щуковская Т.Н., Бугоркова С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Поступила 29.07.16..

О.М.Кудрявцева<sup>1</sup>, Т.Н.Щуковская<sup>1</sup>, Н.И.Микшиш<sup>1</sup>, С.Н.Клюева<sup>1</sup>, С.А.Бугоркова<sup>1</sup>, Д.Н.Санджиев<sup>2</sup>,  
С.В.Конусева<sup>2</sup>, С.П.Савченко<sup>2</sup>, Б.А.Хасыкова<sup>2</sup>, С.А.Щербаква<sup>1</sup>

## ВЫЯВЛЕНИЕ АССОЦИАЦИЙ ГЕНОВ HLA II КЛАССА ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ С ОСОБЕННОСТЯМИ ИММУННОГО ОТВЕТА У ЛИЦ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ЖИВОЙ ЧУМНОЙ ВАКЦИНОЙ В РЕСПУБЛИКЕ КАЛМЫКИЯ

<sup>1</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов;

<sup>2</sup>Управление Роспотребнадзора по Республике Калмыкия, Элиста, Российская Федерация

**Цель исследования:** определение аллельных вариантов гаплотипов HLA II класса у лиц, проживающих в Республике Калмыкия на территории Прикаспийского песчаного природного очага чумы, иммунизированных по эпидпоказаниям вакциной живой чумной, и поиск ассоциаций гаплотипов HLA II класса с особенностями развития поствакцинального иммунитета. **Материалы и методы.** В исследовании принимали участие 20 человек. HLA-типирование проводили методом мультиплексной ПЦР. Продукцию иммунорегуляторных цитокинов и титры антител к фракции 1 чумного микроба определяли методом иммуноферментного анализа. Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартных программ. **Результаты и выводы.** Определены аллельные варианты гаплотипов HLA-DQA1, HLA-DQB1 и HLA-DRB1 II класса главного комплекса гистосовместимости у 20 жителей Лаганского и Черноземельского районов Республики Калмыкия. Выявлены различия в соотношении аллельных вариантов HLA-DQA1 и продукции цитокинов INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 и IL-10 по районам проживания. Отмечено, что аллель HLA-DRB1\*01 сопряжена с высоким уровнем спонтанной и индуцированной продукции IL-10 в различные сроки после ревакцинации ВЖЧ. Дальнейшее изучение генов, регулирующих развитие иммунитета, наряду с иммунологическими методами позволит персонализировать применение существующей вакцины против чумы, а также прогнозировать иммуногенность и эффективность разрабатываемых профилактических препаратов.

**Ключевые слова:** чума, вакцина, люди, HLA-система, иммунологическая эффективность.

Корреспондирующий автор: Кудрявцева Ольга Михайловна, e-mail: rusrap1@microbe.ru.

O.M.Kudryavtseva<sup>1</sup>, T.N.Shchukovskaya<sup>1</sup>, N.I.Mikshish<sup>1</sup>, S.N.Klyueva<sup>1</sup>, S.A.Bugorkova<sup>1</sup>, D.N.Sandzhiev<sup>2</sup>,  
S.V.Konusheva<sup>2</sup>, S.P.Savchenko<sup>2</sup>, B.A.Khasykova<sup>2</sup>, S.A.Shcherbakova<sup>1</sup>

## Identification of HLA II Class Gene Associations of the Main Histocompatibility Complex with Peculiarities of Immune Response in Persons Vaccinated with Live Plague Vaccine in the Republic of Kalmykia

<sup>1</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; <sup>2</sup>Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Kalmykia, Elista, Russian Federation

**Objective** of the study was to determine allelic variants of HLA II class haplotypes in persons living in the Republic of Kalmykia in the territory of Pre-Caspian sandy natural focus of the plague, immunized for epidemic reasons with live plague vaccine and search for associations of HLA class II haplotypes with peculiarities of post-vaccinal immunity development. **Materials and methods.** 20 individuals took part in the study. HLA typing was performed applying multiplex PCR. Production of immune-regulatory cytokines and antibody titers to fraction 1 of the plague microbe was determined using enzyme immunoassay. Statistical processing of the results was carried out using standard programs. **Results and conclusions.** Allelic variants of haplotypes HLA-DQA1, HLA-DQB1 and HLA-DRB1 class II of the main histocompatibility complex of 20 persons residing in Lagansky and Chernozemelsky districts of the Republic of Kalmykia have been identified. Determined have been the differences in the ratio of allelic variants of HLA-DQA1 and cytokine production INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 and IL-10 by the areas of residence. Association of the HLA-DRB1\*01 allele with a high level of spontaneous and induced IL-10 cytokine production has been revealed at various times after booster vaccination. Further study of genes that regulate the development of immunity, along with immunological methods will make it possible to personalize the use of the existing vaccine against plague, and predict the immunogenicity and effectiveness of preventive drugs under development.

**Key words:** plague, vaccine, humans, HLA-system, immunological efficacy.

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

**Corresponding author:** Olga M. Kudryavtseva, e-mail: rusrap1@microbe.ru.

**Citation:** Kudryavtseva O.M., Shchukovskaya T.N., Mikshish N.I., Klyueva S.N., Bugorkova S.A., Sandzhiev D.N., Konusheva S.V., Savchenko S.P., Khasykova, B.A. Shcherbakova S.A. Identification of HLA II Class Gene Associations of the Main Histocompatibility Complex with Peculiarities of Immune Response in Persons Vaccinated with Live Plague Vaccine in the Republic of Kalmykia. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:95–99. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-95-99

Актуальность специфической профилактики чумы в настоящее время обусловлена наличием активных природных очагов данной болезни на территории Российской Федерации в сочетании с другими факторами риска возникновения ее эпидемических проявлений. В России для специфической

профилактики чумы применяется вакцина живая чумная (ВЖЧ), представляющая собой лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного применения и ингаляций. Вакцина разработана в 30-х годах прошлого столетия на основе вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV

НИИЭГ, характеризующегося обширной делецией в *pgt*-области хромосомы [1]. Для людей, проживающих на энзоотичной по чуме территории и лиц, работающих с возбудителем чумы рекомендуется однократная первичная вакцинация с последующими ежегодными ревакцинациями. Опыт более чем полувекового применения ВЖЧ свидетельствует в пользу ее безопасности и эффективности. Вместе с тем современные методы исследования предоставляют новые возможности для более детального изучения реакций макроорганизма на введение средств специфической профилактики.

При осуществлении иммунологического мониторинга в ходе массовых вакцинаций населения наряду с общими тенденциями отмечают значительные колебания показателей адаптивного иммунитета. Индивидуальные особенности зависят от множества факторов, таких как пол, возраст, сопутствующие заболевания и т.д. В настоящее время принято считать, что определяющую роль в вариабельности иммунного ответа играет полиморфизм генов иммунного ответа (Immune response genes), регулирующих активность всех звеньев и факторов иммунитета [13]. Предполагают, что они входят в систему генов человеческого лейкоцитарного антигена (HLA – Human Leukocyte Antigen) главного комплекса гистосовместимости (МНС – Major Histocompatibility Complex) или тесно связаны с ней [11].

Система генов HLA является наиболее полиморфной во всем человеческом геноме. Высокий полиморфизм HLA возник как механизм естественного отбора в результате взаимодействия человека со множеством инфекционных патогенов. Он позволяет противостоять постоянно эволюционирующему множеству патогенов [3]. Гены главного комплекса гистосовместимости HLA включают три основных региона: HLA I, II и III класса. Гены HLA I класса (локусы A, B, C) играют ведущую роль во взаимодействии между Т-киллерами (CD8+клетками) и клеткой-мишенью в процессе иммунного ответа. Продукты этих генов присутствуют практически на всех клетках организма, занимая около 1 % клеточной поверхности. Гены МНС II класса (локусы DP, DQ, и DR) наиболее полиморфны. Молекулы HLA II класса экспрессируются на антигенпрезентирующих клетках (APC – antigen-presenting cell) и опосредуют взаимодействие Т-хелперов (CD4+клеток), В-лимфоцитов и макрофагов в иммунном ответе [4, 14]. Таким образом, система генов HLA выполняет в иммунном ответе важнейшую роль, обеспечивая презентацию чужеродных пептидов для дальнейшего развития иммунного ответа.

В настоящее время достаточно интенсивно ведутся исследования по поиску ассоциаций между особенностями HLA-фенотипа или гаплотипа и состоянием защитных систем макроорганизма (компонентов комплемента, интерферонов, цитокинов, иммуноглобулинов и т.д.) [5]. Установлена большая группа аутоиммунных и онкологических заболеваний, в определенной степени ассоциированных с от-

дельными антигенами и гаплотипами HLA [7]. Кроме того, выявлены популяционные и этнические особенности ассоциаций HLA-комплекса с различными инфекционными заболеваниями, такими как острые респираторно-вирусные инфекции, вирусные гепатиты, а также бактериальные инфекции [4].

Связь генов HLA с развитием поствакцинального иммунитета в настоящее время является малоизученной областью. Проводились исследования по выявлению зависимости между характером ответной реакции организма на вакцинацию и фенотипом HLA. Такая корреляция продемонстрирована на нескольких вирусных вакцинах – против оспы, гриппа, кори, краснухи и эпидемического паротита [10]. Опубликованы данные по ассоциации между гетерозиготностью по различным гаплотипам HLA классов I (HLA-A) и II (HLA-DQA1 и HLA-DQB1) и более выраженными клеточными иммунными реакциями (пролиферация лимфоцитов) у лиц, иммунизированных американской химической сибирезывенной вакциной AVA [9].

До недавнего времени сведения об эпитопах антигенов возбудителя чумы, ассоциированных с развитием Т-клеточного иммунного ответа, были достаточно ограниченными. Однако в 2017 г. получены результаты, основанные на передовых технологиях с использованием биоинформационных ресурсов и методов прогнозирования связи Т-клеточных эпитопов бактериальных и вирусных белков с антигенами главного комплекса гистосовместимости человека [15]. Протестировано 1532 пептида на их способность вызывать специфический Т-клеточный ответ. В результате отобрали 178 эпитопов, входящих в состав 113 белков *Y. pestis*, потенциально способных вызывать специфический ответ CD8 Т-клеток. Полученные знания о новых иммуногенных эпитопах *Y. pestis* внесут вклад в определение рационального дизайна будущих вакцин.

Целью нашего исследования явилось определение аллельных вариантов гаплотипов HLA у лиц, проживающих на территории Прикаспийского песчаного природного очага чумы, вакцинированных (ревакцинированных) по эпидпоказаниям ВЖЧ, и поиск ассоциаций HLA-гаплотипов с особенностями развития клеточных и гуморальных иммунных реакций.

## Материалы и методы

В исследование взяты 20 образцов цельной периферической крови людей в возрасте от 24 до 53 лет (средний возраст – 43,3 года), проживающих на территории Прикаспийского песчаного природного очага чумы в Лаганском (г. Лагань) и Черноземельском (п. Артезиан) районах Республики Калмыкия, и ревакцинированных ВЖЧ по эпидпоказаниям (вторая ревакцинация после первичной вакцинации, проведенной в 2014 г.).

От каждого участвующего в исследовании предварительно получено письменное согласие на его осуществление. Работа одобрена этическим коми-

тетом Саратовского государственного медицинского университета. Вакцинация ВЖЧ (производства ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора) проводилась накожным способом персоналом районных больниц Лаганского и Артезианского районов Калмыкии.

Взятие крови для типирования генов HLA II класса проводили однократно перед началом второй ревакцинации. При заборе крови, предобработке и хранении материала руководствовались инструкцией к комплекту реагентов для типирования генов гистосовместимости HLA-ДНК-ТЕХ («НПО ДНК-Технология», Россия). Выделение ДНК проводили набором «Проба ГС-генетика» («НПО ДНК-Технология», Россия). Типирование генов главного комплекса гистосовместимости проводили методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе ДТ-Лайт («НПО ДНК-Технология», Россия) с использованием комплектов реагентов HLA-ДНК-ТЕХ для детекции аллелей локусов DQA1, DQB1 и DRB1 («НПО ДНК-Технология», Россия).

Для сравнения частот аллелей и их носителей использовали базу данных по распределению HLA-антигенов в мировом сообществе («Allele Frequency Search» Classical ресурса <http://www.allelefrequencies.net>).

Забор крови из локтевой вены для определения показателей адаптивного иммунитета проводили в соответствии с ГОСТ Р 53079.4-2008 до второй ревакцинации и через 1, 6 и 12 месяцев после ее осуществления. Для оценки уровня продукции цитокинов гепаринизированную венозную кровь разводили в соотношении 1:4 средой RPMI 1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 100 мкг/мл гентамицина (ФГУП им. Н.А.Семашко, Россия). В один из опытных образцов вносили Т-клеточный митоген конканавалин А (Sigma, США) в концентрации 15 мкг/мл, в контрольный – физиологический раствор. Опытный и контрольный образцы инкубировали в течение 24 ч при температуре 37 °С [2]. Уровни спонтанной и индуцированной конканавалином А продукции иммунорегуляторных цитокинов INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 и IL-10 определяли с применением коммерческих наборов реагентов для иммуноферментного определения концентрации цитокинов в крови человека («ЗАО Вектор-Бест», Россия) и спектрофотометра Genesys 10S UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, США). Для определения титров антител к фракции 1 чумного микроба использовали коммерческую тест-систему «ИФА-АТ-Ф1 YERSINIA PESTIS» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Россия) и микропланшетный фотометр Stat Fax-3200 (Awareness Technology, США).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартных статистических программ, определяли среднее значение анализируемого показателя (M), ошибку средней арифметической (m). Достоверность уровня различия сравниваемых величин оценивали с помощью U-критерия Манна-Уитни. Различия считали статистически достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

В результате типирования по восьми аллелям гена HLA-DQA1 установлено, что для 75 % исследуемых лиц, проживающих в г. Лагань Лаганского района, характерно наличие аллельного варианта DQA1\*03:01, а для 75 % тестируемых лиц, проживающих в п. Артезиан Черноземельского района – DQA1\*05:01. Согласно базе данных [www.allelefrequencies.net](http://www.allelefrequencies.net), аллельные варианты DQA1\*03:01 и DQA1\*05:01 наиболее часто встречаются у жителей России.

В процессе иммунологического исследования ревакцинированных ВЖЧ лиц, проживающих в Черноземельском и Лаганском районах, выявлены следующие общие закономерности. Непосредственно перед второй ревакцинацией (через 12 месяцев после первой) отмечали выраженный иммунный ответ, характеризующийся высокими уровнями спонтанной и индуцированной продукции цитокинов IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и низкими показателями цитокина IL-4. Через 6 месяцев после второй ревакцинации в 100 % случаев отмечалось достоверное изменение цитокинового статуса – резкое снижение продукции IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  и повышение продукции IL-4 (рис. 1).

На этом фоне нами отмечено, что выраженность иммунных процессов в исследованных группах имеет достоверные различия по районам проживания. Индивидуальные значения уровней продукции провоспалительного цитокина IFN- $\gamma$  у исследованных жителей двух районов до второй ревакцинации в Черноземельском районе в среднем были достоверно выше, чем в Лаганском (рис. 1). На этом фоне наблюдали различную реакцию на вторую ревакцинацию. Через месяц после второй ревакцинации у исследованных лиц из Черноземельского района отмечали более высокие уровни продукции IL-4 и IFN- $\gamma$  (рис. 2). Повышение уровня IL-4 (биомаркер гуморального иммунного ответа) свидетельствовало

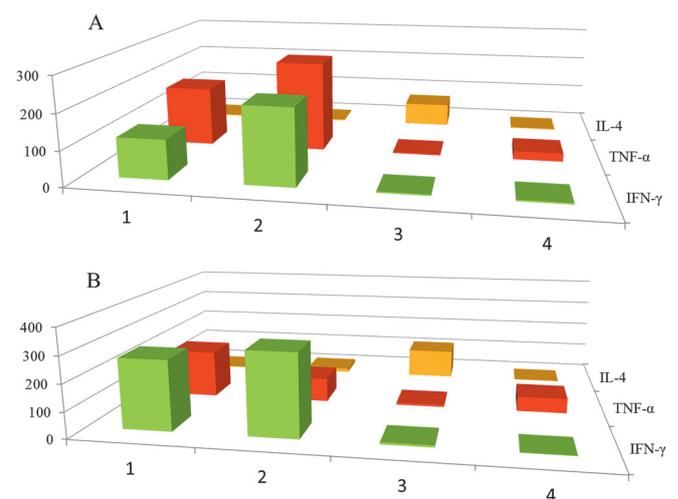


Рис. 1. Результаты определения уровней спонтанной продукции INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-4 в образцах крови лиц, проживающих в Лаганском (А) и Черноземельском (Б) районах Республики Калмыкия, до (1) и через 1 месяц (2), 6 месяцев (3), 12 месяцев (4) после второй ревакцинации ВЖЧ. По оси ординат – уровни спонтанной продукции цитокинов клетками крови (средние значения, пг/мл), по оси абсцисс – сроки ревакцинации ВЖЧ

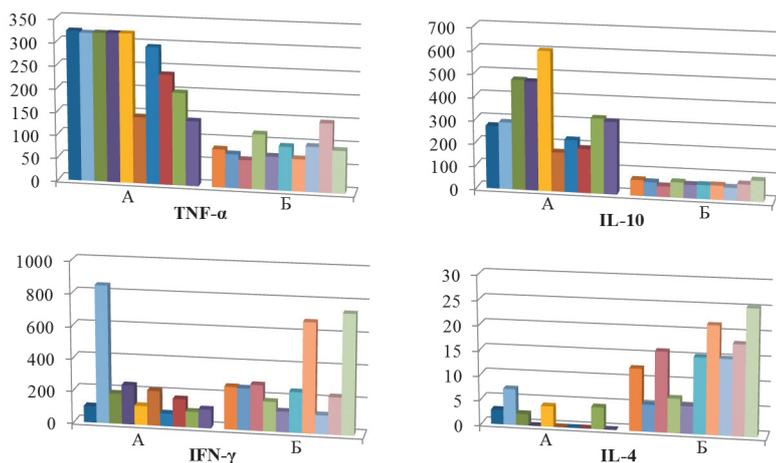


Рис. 2. Результаты определения уровней спонтанной продукции IL-4, INF-γ, TNF-α и IL-10 в образцах крови лиц, проживающих в Лаганском и Черноземельском районах Республики Калмыкия через 1 месяц после второй ревакцинации ВЖЧ. По оси ординат – уровни спонтанной продукции цитокинов клетками крови (пг/мл), по оси абсцисс – ревакцинированные лица Лаганского (А) и Черноземельского (Б) районов. Средние значения спонтанной продукции цитокинов клетками цельной крови лиц, проживающих соответственно в Лаганском и Черноземельском районах (пг/мл): IL-4 – (2,0±1,45) и (14,2±6,4); INF-γ – (217,7±7,7) и (313,2±23,8); TNF-α – (262,8±9,1) и (91,4±4,75); IL-10 – (286,9±20,3) и (64,2±11,45)

о наметившейся тенденции к изменению состояния иммунной системы, которое впоследствии выразится в переключении иммунного ответа с Th1 (клеточный) на Th2 (гуморальный). В эти же сроки у жителей Лаганского района отмечали достоверно более высокие уровни продукции TNF-α и IL-10. Цитокин IL-10, также как и IL-4, подавляет синтез IFN-γ, в то же время его ассоциируют с иммуносупрессией.

Выявленные нами различия в продукции цитокинов у людей в зависимости от района проживания могут быть связаны с превалированием аллели DQA1\*03:01 в Лаганском районе, и аллели DQA1\*05:01 в Черноземельском районе. Вместе с тем не исключено и влияние на иммунную систему внешних факторов. Для выяснения этого необходимо существенное расширение охвата обследуемых лиц.

При типировании аллелей гена HLA-DRB1, в подавляющем большинстве проб от жителей обоих районов отмечен только один из 13 известных аллельных вариантов – DRB1\*04. Исключением составил один образец, в котором выявлена аллель DRB1\*01. Согласно базе данных <http://www.allelefreqencies.net>, частота встречаемости варианта DRB1\*01 относительно других аллелей HLA-DRB1 у жителей Российской Федерации крайне низкая, в то время как гаплотип DRB1\*04 встречается чаще всех остальных.

При проведении комплексного иммунологического исследования мы обратили внимание на возможную ассоциацию аллели HLA-DRB1\*01 с вы-

соким уровнем спонтанной и индуцированной продукции IL-10, активирующего клетки гуморального иммунитета и связанного с иммуносупрессией. У единственного носителя этой аллели уровень спонтанной и индуцированной продукции IL-10 в различные сроки после ревакцинации был значительно выше нормы и среднего значения для жителей двух районов (рис. 3). Не исключено, что гиперпродукция IL-10 у носителя варианта DRB1\*01 повышает риск развития нежелательных поствакцинальных осложнений. Высокая иммунореактивность часто приводит к аутоиммунным заболеваниям [12]. В частности, есть сведения о связи аллели DRB1\*01 с развитием поствакцинального макрофагального миозита [6]. С другой стороны, вероятность ассоциации аллели HLA-DRB1\*01 с показателями иммунитета против чумы подтверждается литературными данными. Так, в исследовании по изучению взаимодействия эпитопов антиген Cafl *Y. pestis* с Т-клетками гуманизированных мышей со встроенным в геном гаплотипом DRB1, лучший Т-клеточный ответ вызывал эпитоп, ассоциированный с аллелью HLA-DRB1\*01 [8].

Скрининг других показателей поствакцинального иммунитета – уровень продукции INF-γ, TNF-α и IL-4, содержания в сыворотке крови антител к капсальному антигену фракции 1 чумного микроба, не позволил выявить статистически достоверной корреляции с гаплотипами, определенными у жителей Лаганского и Черноземельского районов Республики

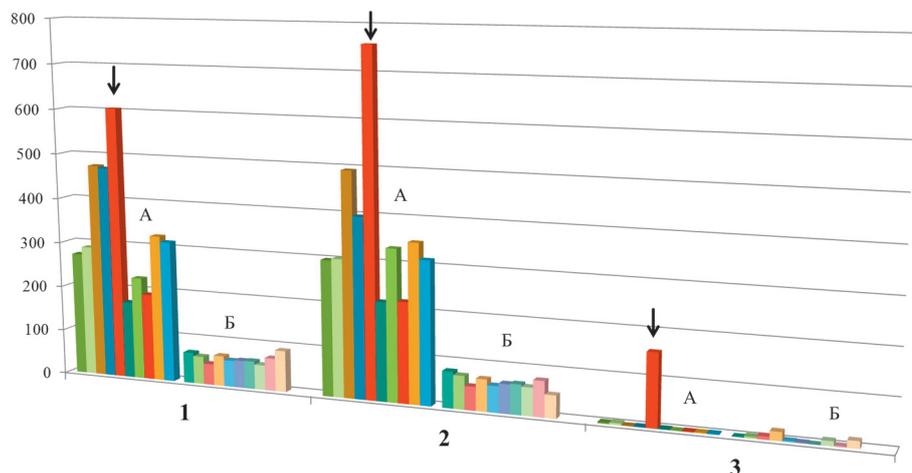


Рис. 3. Результаты определения уровней спонтанной (1) и индуцированной (2, 3) продукции IL-10 (индивидуальные значения) в образцах крови лиц, проживающих в Лаганском (А) и Черноземельском (Б) районах Республики Калмыкия через 1 месяц (1, 2) и 6 месяцев (3) после второй ревакцинации ВЖЧ. Стрелкой обозначен носитель аллели HLA-DRB1\*01

Калмыкия. Дальнейшая работа по выявлению ассоциации гаплотипов HLA-DQA1 и HLA-DRB1 с функциональной активностью клеточного и гуморального звеньев иммунитета в случаях вакцинации (ревакцинации) декретированного контингента ВЖЧ предполагает расширение охвата обследуемых лиц.

Таким образом, нами определены аллельные варианты гаплотипов HLA-DQA1, HLA-DQB1 и HLA-DRB1 II класса главного комплекса гистосовместимости у жителей Лаганского и Черноземельского районов Республики Калмыкия, проживающих на территории Прикаспийского природного очага чумы и ревакцинированных ВЖЧ по эпидпоказаниям. Выявлены различия в распределении аллельных вариантов HLA-DQA1 и выраженности продукции Th1 и Th2-ассоциированных цитокинов (INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 и IL-10) по районам проживания. Отмечено, что аллель HLA-DRB1\*01 сопряжена с высоким уровнем спонтанной и индуцированной продукции IL-10 в различные сроки после ревакцинации ВЖЧ. Дальнейшее изучение генов, кодирующих или регулирующих активность клеточных и гуморальных факторов иммунитета, наряду с иммуногенетическими методами позволит прогнозировать индивидуальный ответ на иммунизацию существующей вакциной для специфической профилактики чумы, персонифицировать ее применение, а также прогнозировать иммуногенность и эффективность разрабатываемых вакцинных препаратов.

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зверев В.В., Семенов Б.Ф., Хаитов Р.М., редакторы. Вакцины и вакцинация: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011. 880 с.
2. Шуковская Т.Н., Смолькова Е.А., Шмелькова Т.П., Ключева С.Н., Бугоркова С.А. Индуцированная продукция IFN $\gamma$  и IL-4 как показатель функциональной активности Th1- и Th2-клеток у вакцинированных против чумы людей. *Эпидемиол. и вакцинопрофилактика*. 2011; 6(61):78–83.
3. Barreiro L.B., Quintana-Murci L. From evolutionary genetics to human immunology: how selection shapes host defence genes. *Nat. Rev. Genet.* 2010; 11:17–30. DOI: 10.1038/nrg2698.
4. Cardozo D.M., Marangon A.V., Sell A.M., Visentainer L.J.E., de Souza C.A. HLA and Infectious Diseases. In: Yongzhi Xi, editor. HLA and Associated Important Diseases. InTech; 2014. Available from: <https://www.intechopen.com/books/hla-and-associated-important-diseases/hla-and-infectious-diseases>. DOI: 10.5772/57496.
5. Castiblanco J., Anaya J.M. Genetics and vaccines in the era of personalized medicine. *Curr. Genomics.* 2015; 16(1):47–59. DOI: 10.2174/1389202916666141223220551.
6. Guis S., Pellissier J.F., Nicoli F., Reviron D., Mattei J.P., Gherardi R.K., Pelletier J., Kaplanski G., Figarella-Branger D., Roudier J. HLA-DRB1\*01 and macrophagic myofasciitis. *Arthritis Rheumatism.* 2002; 46(9):2535–7. DOI: 10.1002/art.10465.
7. Matzaraki V., Kumar V., Wijmenga C., Zernakova A. The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases. *Genome Biology.* 2017; 18(1):76. DOI: 10.1186/s13059-017-1207-1.
8. Musson J.A., Ingram R., Durand G., Ascough St., Waters E.L., Hartley M.G., Robson T., Maillere B. Repertoire of HLA-DR1-Restricted CD4 T-Cell Responses to Capsular Cpf1 Antigen of *Yersinia pestis* in Human Leukocyte Antigen Transgenic Mice. *Infect. Immun.* 2010; 78(10):4356–62. DOI: 10.1128/IAI.00195-10.
9. Ovsyannikova I.G., Pankratz V.S., Vierkant R.A., Pajewski N.M., Quinn C.P., Kaslow R.A., Jacobson R.M., Poland G.A. Human leukocyte antigens and cellular immune responses to anthrax vaccine adsorbed. *Infect. Immun.* 2013; 81(7):2584–91. DOI: 10.1128/IAI.00269-13.
10. Ovsyannikova I.G., Poland G.A. Vaccinomics: current findings, challenges and novel approaches for vaccine development.

11. Poland G.A., Ovsyannikova I.G., Jacobson R.M., Smith D.I. Heterogeneity in vaccine immune response: the role of immunogenetics and the emerging field of vaccinomics. *Clin. Pharmacol. Therap.* 2007; 82(6):653–64. DOI: 10.1038/sj.clpt.6100415.
12. Reviron D., Foutrier C., Guis S., Mercier P., Roudier J. DRB1 alleles in polymyalgia rheumatica and rheumatoid arthritis in southern France. *Eur. J. Immunogenet.* 2001; 28(1):83–7.
13. Tan P.L., Jacobson R.M., Poland G.A., Jacobsen S.J., Pankratz V.S. Twin studies of immunogenicity-determining the genetic contribution to vaccine failure. *Vaccine.* 2001; 19(17–19):2434–9. DOI: 10.1016/S0264-410X(00)00468-0.
14. Trowsdale J., Knight J.C., Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2013; 14:301–23. DOI: 10.1146/annurev-genom-091212-153455.
15. Zvi A., Rotem S., Zauberman A., Elia U., Aftalion M., Bar-Haim E., Mamroud E., Cohen O. Novel CTL epitopes identified through a *Y. pestis* proteome-wide analysis in the search for vaccine candidates against plague. *Vaccine.* 2017 Jun 9. pii: S0264-410X(17)30762-4. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.05.092. [Epub ahead of print].

#### References

1. Zverev V.V., Semenov B.F., Khaitov R.M., editors. [Vaccines and Vaccination: National Guidelines]. M.: "Geotar-Media"; 2011. 880 p.
2. Shchukovskaya T.N., Smol'kova E.A., Shmel'kova T.P., Klyueva S.N., Bugorkova S.A. [Induced production of IFN $\gamma$  and IL-4 as an index of functional activity of Th1- and Th2-cells in persons vaccinated against plague]. *Epidemiol. Vaksino profilakt.* 2011; 6(61): 78–83.
3. Barreiro L.B., Quintana-Murci L. From evolutionary genetics to human immunology: how selection shapes host defence genes. *Nat. Rev. Genet.* 2010; 11:17–30. DOI: 10.1038/nrg2698.
4. Cardozo D.M., Marangon A.V., Sell A.M., Visentainer L.J.E., de Souza C.A. HLA and Infectious Diseases. In: Yongzhi Xi, editor. HLA and Associated Important Diseases. InTech; 2014. Available from: <https://www.intechopen.com/books/hla-and-associated-important-diseases/hla-and-infectious-diseases>. DOI: 10.5772/57496.
5. Castiblanco J., Anaya J.M. Genetics and vaccines in the era of personalized medicine. *Curr. Genomics.* 2015; 16(1):47–59. DOI: 10.2174/1389202916666141223220551.
6. Guis S., Pellissier J.F., Nicoli F., Reviron D., Mattei J.P., Gherardi R.K., Pelletier J., Kaplanski G., Figarella-Branger D., Roudier J. HLA-DRB1\*01 and macrophagic myofasciitis. *Arthritis Rheumatism.* 2002; 46(9):2535–7. DOI: 10.1002/art.10465.
7. Matzaraki V., Kumar V., Wijmenga C., Zernakova A. The MHC locus and genetic susceptibility to autoimmune and infectious diseases. *Genome Biology.* 2017; 18(1):76. DOI: 10.1186/s13059-017-1207-1.
8. Musson J.A., Ingram R., Durand G., Ascough St., Waters E.L., Hartley M.G., Robson T., Maillere B. Repertoire of HLA-DR1-Restricted CD4 T-Cell Responses to Capsular Cpf1 Antigen of *Yersinia pestis* in Human Leukocyte Antigen Transgenic Mice. *Infect. Immun.* 2010; 78(10):4356–62. DOI: 10.1128/IAI.00195-10.
9. Ovsyannikova I.G., Pankratz V.S., Vierkant R.A., Pajewski N.M., Quinn C.P., Kaslow R.A., Jacobson R.M., Poland G.A. Human leukocyte antigens and cellular immune responses to anthrax vaccine adsorbed. *Infect. Immun.* 2013; 81(7):2584–91. DOI: 10.1128/IAI.00269-13.
10. Ovsyannikova I.G., Poland G.A. Vaccinomics: current findings, challenges and novel approaches for vaccine development. *AAPS J.* 2011; 13(3):438–44. DOI: 10.1208/s12248-011-9281-x.
11. Poland G.A., Ovsyannikova I.G., Jacobson R.M., Smith D.I. Heterogeneity in vaccine immune response: the role of immunogenetics and the emerging field of vaccinomics. *Clin. Pharmacol. Therap.* 2007; 82(6):653–64. DOI: 10.1038/sj.clpt.6100415.
12. Reviron D., Foutrier C., Guis S., Mercier P., Roudier J. DRB1 alleles in polymyalgia rheumatica and rheumatoid arthritis in southern France. *Eur. J. Immunogenet.* 2001; 28(1):83–7.
13. Tan P.L., Jacobson R.M., Poland G.A., Jacobsen S.J., Pankratz V.S. Twin studies of immunogenicity-determining the genetic contribution to vaccine failure. *Vaccine.* 2001; 19(17–19): 2434–9. DOI: 10.1016/S0264-410X(00)00468-0.
14. Trowsdale J., Knight J.C., Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2013; 14:301–23. DOI: 10.1146/annurev-genom-091212-153455.
15. Zvi A., Rotem S., Zauberman A., Elia U., Aftalion M., Bar-Haim E., Mamroud E., Cohen O. Novel CTL epitopes identified through a *Y. pestis* proteome-wide analysis in the search for vaccine candidates against plague. *Vaccine.* 2017 Jun 9. pii: S0264-410X(17)30762-4. DOI: 10.1016/j.vaccine.2017.05.092. [Epub ahead of print].

#### Authors:

Kudryavtseva O.M., Shchukovskaya T.N., Mikshis N.I., Klyueva S.N., Bugorkova S.A., Shcherbakova S.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.  
 Sandzhiev D.N., Konusheva S.V., Savchenko S.P., Khasyikova B.A. Rosptrebnadzor Administration in the Republic of Kalmykia. 8, Balakaeva St., Elista, 358000, Russian Federation. E-mail: rpnrk1@yandex.ru.

#### Об авторах:

Кудрявцева О.М., Шуковская Т.Н., Микуш Н.И., Ключева С.Н., Бугоркова С.А., Щербакова С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.  
 Санджиев Д.Н., Конушева С.В., Савченко С.П., Хасыикова Б.А. Российская Федерация, 358000, Республика Калмыкия, г. Элиста, ул. Балакаева, д. 8. E-mail: rpnrk1@yandex.ru.

Получила 03.07.17.

М.В.Овчинникова, А.В.Комиссаров, Е.Г.Абрамова, М.Н.Киреев, А.Ю.Ульянов, Д.Н.Бибиков,  
М.Н.Исляева, А.К.Никифоров

## РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ГОТОВОГО ПРЕПАРАТА ПРОТИВОХОЛЕРНОГО ИММУНОЭНТЕРОСОРБЕНТА

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

**Цель исследования:** экспериментальное обоснование возможности получения лекарственной формы противохолерного иммуноэнтеросорбента в форме таблетки. **Материалы и методы:** Экспериментальный антитоксический противохолерный иммуноэнтеросорбент, стабилизированный методом лиофильного высушивания. Остаточную влажность лиофилизата энтеросорбента определяли с использованием влагомера Sartorius MA 150. Ситовой анализ порошков и гранулятов проводили просеиванием образцов сыпучего материала через набор сит с отверстиями различного размера. Определение насыпной плотности проводили с помощью прибора SVM-10. Гранулирование специфического энтеросорбента проводили на аппарате GPCG 2 LabSystem. Изготовление таблеток осуществляли на таблеточном прессе MiniTabT. Определение твердости таблеток проводили с использованием тестера ТВН 125 TD. Испытания на истираемость таблеток осуществляли на приборе GTA 120. **Результаты и выводы.** Экспериментально обосновано использование в качестве вспомогательных веществ для гранулирования лактозы моногидрата, целлюлозы микрокристаллической и поливинилпирролидона. Установлено, что полученный гранулят с удовлетворительными значениями технологических характеристик может являться основой для готовой лекарственной формы специфического энтеросорбента. Определена оптимальная масса таблеток-ядер противохолерного энтеросорбента. Показана возможность применения кишечнорастворимого покрытия Acryl-eze для нанесения защитной оболочки на таблетки. Изучена специфическая активность таблетированного энтеросорбента в тесте *in vitro*, подтверждена его устойчивость в условиях, моделирующих желудочно-кишечный тракт. В результате проведенных исследований разработана технология получения противохолерного антитоксического иммуноэнтеросорбента – таблетки, покрытой кишечнорастворимой оболочкой. В долгосрочных испытаниях при хранении сконструированного лечебно-профилактического препарата при температуре от 4 до 8 °С в течение 24 мес (срок наблюдения) выявлено сохранение активности энтеросорбента, что свидетельствует о его стабильности, определен срок годности специфического противохолерного иммуноэнтеросорбента в таблетированной форме.

**Ключевые слова:** противохолерный иммуноэнтеросорбент, гранулирование, таблетирование, нанесение защитного покрытия, специфическая активность, стабильность.

Корреспондирующий автор: Овчинникова Мария Владимировна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

M.V.Ovchinnikova, A.V.Komissarov, E.G.Abramova, M.N.Kireev, A.Yu.Ul'yanov, D.N.Bibikov, M.N.Islyayeva,  
A.K.Nikiforov

## Development of Pharmaceutical Dosage Form of Anti-Cholera Immune-Enterosorbent

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

**Objective** of the study is to experimentally substantiate the possibility of production of anti-cholera immune-enterosorbent in the pharmaceutical form of a pill. **Materials and methods:** experimental antitoxic immune-enterosorbent against cholera, stabilized using cool dehumidification. Residual moisture of enterosorbent lyophilizate was determined by means of Sartorius MA 150 moisture meter. Screen assay of the powders and granulates was performed applying the sieving of bulk material samples through screen set with sieve openings of various sizes. Specification of tap density was carried out with the help of SVM-10 unit. Granulation of specific enterosorbent was done using GPCG 2 LabSystem. The pills were manufactured in tablet press, MiniTabT. The hardness of the pallets was carried out by means of TBH 125 TD tester. The test for friability of the pills was performed in GTA 120. **Results and conclusions.** Utilization of cellulose microcrystalline and polyvinyl pyrrolidone as pharmaceutical aids for granulation of lactose monohydrate is experimentally substantiated. It is established that the obtained granulate with passable values of technological parameters can serve as the basis for pharmaceutical dosage form of specific enterosorbent. Identified has been optimum mass of anti-cholera enterosorbent tablet cores. Demonstrated has been the possibility of Acryl-eze enteric coating application as protective shell of the pills. Studied has been specific activity of the pelleted enterosorbent *in vitro*, verified is its resistance capacity under conditions modeling gastrointestinal tract. In consequence of the performed trials and tests, technology for the production of antitoxic enterosorbent against cholera – enteric-coated tablet – has been developed. Long-term trials: the storage of the constructed preparation at 4–8°C within 24 months period (the observation time) – have revealed retention of enterosorbent activity, which testifies to its stability and defined the shelf life of specific tableted anti-cholera immune-enterosorbent.

**Key words:** anti-cholera immune-enterosorbent, granulation, pelletizing, application of protective coating, specific activity, stability.

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

Corresponding author: Maria V. Ovchinnikova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Ovchinnikova M.V., Komissarov A.V., Abramova E.G., Kireev M.N., Ul'yanov A.Yu., Bibikov D.N., Islyayeva M.N., Nikiforov A.K. Development of Pharmaceutical Dosage Form of Anti-Cholera Immune-Enterosorbent. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:100–104. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-100-104

Протекающая в настоящее время седьмая пандемия холеры характеризуется появлением новых штаммов холерного вибриона O1 серогруппы, обладающих повышенными вирулентностью и адаптацией к условиям внешней среды [9]. Сложившиеся обстоятельства диктуют в дополнение к существующей традиционной терапии необходимость разработки и внедрения в практическое здравоохранение новых подходов к лечению и профилактике данной конвенционной болезни [7].

Ранее исследователями РосНИПЧИ «Микроб» разработана экспериментальная технология получения антитоксического энтеросорбента для интраинтестинальной нейтрализации экзотоксина холерного вибриона. Препарат представляет собой хитозановую матрицу с иммобилизованными на ее поверхности антитоксическими противохолерными иммуноглобулинами, выделенными из сыворотки крови животных, иммунизированных холерным токсином [1, 6]. Полученный иммуоэнтеросорбент стабилизирован лиофильным высушиванием с добавлением 2,5 % глицина и 1 % сахарозы, однако вопрос о лекарственной форме экспериментального препарата остался открытым.

Готовые лекарственные формы выпуска энтеросорбционных препаратов, зарегистрированных на территории Российской Федерации, представлены в виде порошков для приготовления растворов, гранулятов, капсул, болюсов. Однако опыт производства лекарственных средств в России и за рубежом свидетельствует, что таблетированная форма препаратов занимает одно из ведущих мест на рынке фармацевтической продукции. Точность дозирования, компактность, удобность упаковки, простота хранения, транспортировки и возможность целевого применения даже при отсутствии питьевой воды делают данную лекарственную форму оптимальной в санитарной и противоэпидемической практиках [10].

Вышесказанное определило цель исследования, заключающуюся в разработке лекарственной формы противохолерного иммуоэнтеросорбента в виде таблетки, покрытой кишечнорастворимой оболочкой.

### Материалы и методы

Остаточную влажность определяли с использованием влагомера Sartorius MA 150 (Германия). Ситовой анализ порошков и гранулятов проводили с использованием автоматического процесса просеивания образца сыпучего материала через набор сит с отверстиями различного размера с использованием анализатора ВА 200N: 2500, 1000, 500, 112, дно. Просеивание проводили в течение 5 мин при амплитуде, равной 1,5. Для определения сыпучести в сухую воронку, выходное отверстие которой закрыто заслонкой, помещали без уплотнения навеску испытуемого вещества массой 50 г, взвешенную с точностью до 0,01 г. Включали виброустройство и через 20 с открывали заслонку. Определяли время,

необходимое для полного истечения испытуемого вещества из воронки. Сыпучесть рассчитывали по формуле (1):

$$C = \frac{m}{t - 20}, \quad (1)$$

где  $C$  – сыпучесть испытуемого порошка или гранулята;  $m$  – масса навески испытуемого вещества, г;  $t$  – время истечения испытуемого вещества, с.

Для определения насыпной плотности порошков и гранулятов навеску образца с заранее измеренной массой помещали в градуированный цилиндр вместимостью 100 мл. Отношение массы навески к заполненному объему ( $V_0$ ) цилиндра являлось насыпной плотностью до утряски. После проведения утряски на приборе SVM-10 (Erweka, Германия) при количестве встряхиваний последовательно 500, 750 и 1250 измеряли заполненный объем цилиндра ( $V_k$ ) и определяли насыпную плотность после утряски. Угол естественного откоса  $\alpha$  определяли при насыпании материала на ровную поверхность.

Гранулирование специфического энтеросорбента проводили на аппарате GPCG 2 LabSystem (Glatt, Германия), реализующем гранулирование материалов методом псевдооживленного слоя с подачей связующего вещества сверху. Для изготовления таблеток проводили прессование гранулята на таблеточном прессе MiniTabT (Luxner, Германия). Определение твердости таблеток проводили с использованием тестера ТВН 125 TD, используя режим работы перемещения измерительного молотка «постоянная скорость» при величине ньютон-фактора, равной 19,0. Количество таблеток каждой серии составляло не менее 10. Испытания на истираемость таблеток осуществляли на приборе GTA 120 (Erweka, Германия) при числе качаний флакона в минуту, равном 300, в течение 3 мин. В каждом флаконе находилось по 20 таблеток. Истираемость таблеток вычисляли по формуле (2). Нанесение покрытия на таблетку осуществляли в коутере GMPC I Mini (Glatt, Германия).

$$И = \frac{M_1 - M_2}{M} \times 100 \%, \quad (2)$$

где  $И$  – истираемость таблеток специфического энтеросорбента, %;  $M_1$  – масса таблеток до испытания, г;  $M_2$  – масса таблеток после испытания, г.

Определение распадаемости таблеток проводили в соответствии с ОФС «Распадаемость таблеток и капсул» [2]. Таблетки в количестве трех штук помещали во флакон вместимостью 100 мл с 25 мл 0,1 М раствора соляной кислоты и выдерживали при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 3 ч при периодическом встряхивании (3–4 раза через каждые 10 мин). Затем кислоту удаляли, таблетки заливали 25 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида и выдерживали при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 1 ч при периодическом встряхивании (3–4 раза через каждые 10 мин).

Опыт по взаимодействию специфического энтеросорбента и неиммобилизованных антитоксиче-

ских иммуноглобулинов с протеолитическими ферментами проводили в два этапа. На первом этапе к раствору неиммобилизованного иммуноглобулина и таблеткам специфического энтеросорбента добавляли 200 мг пепсина и 1 мл 0,1 М раствора соляной кислоты, значение рН смесей соответствовало ( $2,0 \pm 0,1$ ), что является оптимумом для пепсина. Смесью инкубировали в течение 2 ч при температуре ( $37 \pm 1$ ) °С. Далее проводили нейтрализацию 0,1 Н раствором натрия гидроксида до рН ( $7,8 \pm 0,1$ ) – оптимуме для трипсина.

На втором этапе к полученным «нейтрализованным» реакционным смесям добавляли 300 мл трипсина и инкубировали в течение 3 ч при температуре ( $37 \pm 1$ ) °С. После экспозиции с целью инактивации трипсина добавляли 0,1 М раствор соляной кислоты до установления рН ( $4,0 \pm 1,0$ ) и нейтрализовали 0,1 Н раствором натрия гидроксида до рН ( $7,2 \pm 0,1$ ). Далее экспериментальные образцы центрифугировали 10 мин при 14 тыс. об./мин, супернатанты декантировали. Из осажденных взвесей готовили 10 % суспензии специфического энтеросорбента и 10 % растворы антитоксического иммуноглобулина в 0,01 М фосфатном буфере рН ( $7,3 \pm 1,0$ ) для определения специфической активности образцов в непрямом варианте дот-иммуноанализа (ДИА).

Специфическую активность противохолерного иммуноэнтеросорбента выявляли *in vitro* в дот-иммуноанализе с использованием диагностикума на основе наночастиц коллоидного золота и белка *A Staphilococcus aureus*.

### Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований выявлено, что распределение частиц по размеру в лиофилизате энтеросорбента, определенное ситовым методом, составляло следующие величины: пыль – 38 %; 112–500 мкм – 40 %; 500 мкм – 1,0 мм – 12 %; 1,0–2,5 мм – 5 %; >2,5 мм – 5 %. Потеря в массе при высушивании составила ( $1,1 \pm 0,3$ ) %. Насыпная плотность (до/после утряски) составила 0,04/0,05 г/см<sup>3</sup>. Выявленная величина угла естественного откоса, равная 65°, и значение сыпучести, равное 0, свидетельствовали о крайне низкой сыпучести лиофилизованного материала [12].

На основании изучения технологических характеристик порошка-лиофилизата можно сделать вывод, что данная субстанция является крайне неоднородной по фракционному составу, при этом большое количество лиофилизата находится в виде пыли. Неудовлетворительные показатели сыпучести, насыпной плотности и угла естественного откоса свидетельствуют о непригодности данной субстанции для получения готовой лекарственной формы. В связи с этим необходимо было получить субстанцию в виде гранулята.

Анализ литературных данных показал, что в технологии гранулирования лекарственных пре-



Рис. 1. Гранулят лиофилизованного противохолерного энтеросорбента

паратов достаточно широко применяются такие вспомогательные вещества, как целлюлоза микрокристаллическая и лактозы моногидрат, а в качестве связующего вещества – водные растворы поливинилпирролидона. Свой выбор остановили на следующей рецептуре, рекомендованной рядом исследователей: по 50 массовых процентов микрокристаллической целлюлозы и лактозы [3, 5], а в качестве связующего – 10 % раствор поливинилпирролидона (Plasdone K90) [3, 5]. В работе использовали технологические режимы, обоснованные А.В.Комиссаровым и соавт. при гранулировании компонентов холерной химической вакцины [4, 6].

После гранулирования энтеросорбента (рис. 1) проводили изучение технологических характеристик гранулята: форма и размер частиц, распределение частиц по размеру, насыпная плотность, сыпучесть, угол естественного откоса, потеря в массе при высушивании.

Выявлены следующие технологические характеристики гранулята: распределение частиц по размеру: пыль (<112 мкм) – 3 %; 112–500 мкм – 13 %; 500 мкм – 1,0 мм – 42 %; 1,0–2,5 мм – 42 %; >2,5 мм – нет; насыпная плотность (до/после утряски) составила 0,35/0,41 г/см<sup>3</sup>; значение текучести – 13 г/с; величина угла естественного откоса – 21°, что свидетельствовало об удовлетворительной его сыпучести [12]. Потеря в массе при высушивании имела значение ( $1,9 \pm 0,2$ ) %.

Учитывая значения характеристики полученного гранулята иммуноэнтеросорбента, можно сделать вывод о возможности его дальнейшей дозировки в кишечнорастворимые капсулы или получения готовой лекарственной формы в виде таблетки.

Изготовление таблетированной формы – процесс многостадийный, включающий в себя этапы подготовки лекарственного вещества, смешение основного и вспомогательных компонентов, их сушка, гранулирование и непосредственно таблетирование.

Для удобства применения таблетированного энтеросорбента *per os* массу таблетки, содержащей необходимое количество активного вещества, устанавливали в пределах от 0,240 до 0,260 г. Результаты исследований характеристик таблеток-ядер противохолерного иммуноэнтеросорбента при прессовании гранулята представлены в табл. 1.

Анализируя данные таблицы, можно сделать вывод, что при значениях давления прессования, превы-

Таблица 1

Результаты исследований характеристик таблеток-ядер противохолерного иммуноэнтеросорбента

Давление прессования, кН	Механическая прочность на сжатие, Н	Истираемость, %
5	20,00±1,20	3,70±0,80
10	50,00±1,50	2,10±0,45
15	77,00±3,08	1,50±0,33
20	90,00±3,50	1,10±0,30
25	120,00±4,10	0,50±0,04

шающих 20 кН, таблетки-ядра обладают значениями механической прочности на сжатие, позволяющими спрогнозировать повышенное время растворения таблетки, а таблетирование при 5 кН приводит к повышенной истираемости – (3,7±0,8) при требовании не более 3 % [2]. Следовательно, оптимальным диапазоном давления прессования являются значения от 10 до 15 кН.

Нанесение защитной оболочки на таблетку осуществляли 20 % водным раствором кишечнорастворимого покрытия Acryl-EZE до увеличения массы таблетки на 8 %. Для нанесения пленочного покрытия на водной основе использовали технологические режимы, разработанные для готовой лекарственной формы холерной химической вакцины [4, 5]. Масса таблетки с нанесенным покрытием в среднем составила (270±1,5) мг. Гладкое и равномерное желтое пленочное покрытие закрывало все кромки таблеток (рис. 2). Необходимо отметить, что механическая прочность на сжатие таблетки с покрытием возросла до 110 Н.

В результате определения распадаемости было выявлено, что при выдерживании в 0,1 М растворе соляной кислоты в течение 3 ч каждая таблетка энтеросорбента сохраняла форму и оболочку; при воздействии 0,1 М раствором натрия гидроксида в течение 40 мин таблетка распадалась до рыхлой массы без сохранения оболочки. Это свидетельствовало о хорошем качестве кишечнорастворимого покрытия и правильном выборе диапазона прессования гранулята.

Сконструированный экспериментальный анти-



Рис. 2. Готовая лекарственная форма противохолерного энтеросорбента

токсический энтеросорбент предполагает применение *per os*, являющееся наиболее простым и распространенным способом эфферентной терапии. Однако во всех отделах пищеварительного тракта, особенно в желудке и кишечнике, сорбент неизбежно будет подвергнут воздействию желудочного сока и ферментов, которые могут инактивировать специфические компоненты препарата. Практический и научный интерес представляло изучение стабильности полученного таблетированного энтеросорбента в условиях, моделирующих желудочно-кишечный тракт. Стабильность энтеросорбента исследовали в соответствии с [2], с некоторыми модификациями, описанными ранее А.Л.Сироко и соавт. при изучении угольных энтеросорбентов [8].

В работе использовали три серии неиммобилизованного антитоксического иммуноглобулина и три серии экспериментального специфического энтеросорбента в таблетированной форме. Протеолитические ферменты – пепсин кристаллический и трипсин кристаллический применяли для моделирования условий желудочно-кишечного тракта.

Полученные данные свидетельствовали, что после взаимодействия с протеолитическими ферментами произошло заметное снижение специфической активности неиммобилизованных иммуноглобулинов, титры антитоксических антител в ДИА составили 1:640, тогда как до обработки ферментами их активность составляла 1:12800–1:6400. Специфический энтеросорбент, в отличие от неиммобилизованного иммуноглобулина, наиболее чувствительного к действию пепсина и трипсина, сохранил свои антитоксические свойства на высоком уровне, в ДИА были зарегистрированы значения активности препарата до и после обработки ферментами 1:12800–1:6400 и 1:6400–1:3200 соответственно.

Учитывая перспективу практического применения экспериментального антитоксического энтеросорбента для профилактики и лечения холеры, несомненный интерес представляло изучение стабильности препарата при хранении с соблюдением оптимального температурного режима согласно [11].

При исследовании стабильности таблетированного энтеросорбента в долгосрочных испытаниях выявляли активность *in vitro* в непрямом ДИА трех экспериментальных серий препарата на момент получения и после хранения при температуре от 2 до 8 °С в течение 6, 12 и 24 мес (срок наблюдения). Проводили не менее трех испытаний каждой серии энтеросорбента. Результаты оценки активности исследуемых серий экспериментального препарата в процессе хранения приведены в табл. 2. Из полученных данных следует, что при хранении энтеросорбента при температуре от 2 до 8 °С [11] в течение обозначенного времени активность таблетированного препарата оставалась на высоком уровне, что свидетельствует о стабильности сконструированного лечебно-профилактического препарата. На основании полученных результатов был определен срок

Таблица 2

## Активность экспериментальных серий таблетированного антитоксического энтеросорбента в процессе хранения

Срок наблюдения	Титры специфических антител в дот-иммуноанализе		
	Серия 01	Серия 02	Серия 03
На момент получения	1:25600	1:12800	1:6400
6 месяцев	1:10240	1:12800	1:5120
12 месяцев	1:10240	1:12800	1:6400
24 месяца	1:10240	1:10240	1:5120

годности иммуноэнтеросорбента – 2 года.

Таким образом, в результате проведенных исследований была разработана экспериментальная таблетированная форма противохолерного иммуноэнтеросорбента, подтверждена стабильность ее свойств, что позволяет приступить к этапу доклинических испытаний препарата.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аленкина Т.В., Овчинникова М.В., Киреев М.Н., Никифоров А.К. Перспективные сорбционные матрицы для конструирования антитоксического холерного энтеросорбента. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 2:66–70.
2. Государственная Фармакопея РФ. Издание 13. Том II. М.; 2015. 1004 с.
3. Комиссаров А.В., Еремин С.А., Задохин С.Н., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Ливанова Л.Ф., Никифоров А.К. Гранулирование компонентов холерной химической вакцины. Современные проблемы науки и образования. 2014; 3. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.science-education.ru/117-13326> (дата обращения 12.11.2015).
4. Комиссаров А.В., Еремин С.А., Задохин С.Н., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Ливанова Л.Ф., Никифоров А.К. Экспериментальное обоснование внедрения пленочного покрытия на водной основе для готовой лекарственной формы холерной химической вакцины. Современные проблемы науки и образования. 2013; 6. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.science-education.ru/113-11114> (дата обращения 12.11.2015).
5. Комиссаров А.В., Еремин С.А., Задохин С.Н., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Ливанова Л.Ф., Никифоров А.К. Новые подходы в технологии получения таблетки вакцины холерной бивалентной химической. *Биофармацевтический журнал.* 2015; 7(1):30–9.
6. Овчинникова М.В., Киреев М.Н., Никифоров А.К. Сорбционные свойства полимерного энтеросорбента и его специфического модификанта в модельных растворах холерного токсина *in vitro*. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 4:71–4.
7. Реализация новых рекомендаций по ведению диареи. Руководство для лиц, ответственных за принятие решений, и программных менеджеров. Женева; 2006. 36 с. [Электронный ресурс]. URL: [http://w.euro.who.int/data/assets/pdf\\_file/0007/127618/9244594218R.pdf](http://w.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0007/127618/9244594218R.pdf) (дата обращения 14.11.2015).
8. Сироко А.Л., Яфаев Р.Х., Адамов А.К. Реакция агломе-

рации угольной сыворотки. *Вестник Акад. мед. наук.* 1960; 5: 23–33.

9. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Кутырев В.В. Эволюция генома возбудителя холеры в современный период. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2010; 4:11–9.

10. Тихонов И.В., Грязнева Т.Н., Лиморенко А.П., Скворцов А.Э., Васильев П.Г. Разработка технологии производства пробиотика «Биод-5» и методов его контроля. *Ветеринарн. патол.* 2003; 1:161–3.

11. Условия транспортирования и хранения медицинских иммунобиологических препаратов СП 3.3.2.1248-03. М.; 2003. 7 с.

12. Хишова О.М. Таблетирование лекарственного растительного сырья. Витебск; 2005. 164 с.

## References

1. Alenkina T.V., Ovchinnikova M.V., Kireev M.N., Nikiforov A.K. [Prospective sorption matrices for antitoxic cholera enterosorbent constructing]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 2:66–70.
2. [State Pharmacopeia (Russian Federation)]. 13<sup>th</sup> Edition. Vol. II. M.; 2015. 1004 p.
3. Komissarov A.V., Eremin S.A., Zadokhin S.N., Shul'gina I.V., Lobovikova O.A., Vasin Yu.G., Klokova O.D., Livanova L.F., Nikiforov A.K. [Granulation of the components of cholera chemical vaccine]. *Sovrem. Probl. Nauki i Obrazovaniya.* 2014; 3. [Internet]. (Cited 12 Nov 2015). Available from: <http://www.science-education.ru/117-13326>.
4. Komissarov A.V., Eremin S.A., Zadokhin S.N., Shul'gina I.V., Lobovikova O.A., Vasin Yu.G., Klokova O.D., Livanova L.F., Nikiforov A.K. [Experimental substantiation of water-based film coating application for pharmaceutical dosage form of cholera chemical vaccine]. *Sovrem. Probl. Nauki i Obrazovaniya.* 2013; 6. [Internet]. (Cited 12 Nov 2015). Available from: <http://www.science-education.ru/113-11114>.
5. Komissarov A.V., Eremin S.A., Zadokhin S.N., Shul'gina I.V., Lobovikova O.A., Livanova L.F., Nikiforov A.K. [Novel approaches to manufacturing technology for the production of chemical bivalent cholera vaccine tablets]. *Biofarmatsevt. Zh.* 2015; 7(1):30–9.
6. Ovchinnikova M.V., Kireev M.N., Nikiforov A.K. [Sorption properties of polymeric enterosorbent and its specific modified analogue in simulated cholera toxin solutions *in vitro*]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 4: 71–4.
7. [Implementation of New Recommendations on Diarrhea Management. Guidelines for authorized decision-makers and project managers]. Geneva; 2006. 36 p. [Internet]. (Cited 14 Nov 2015). Available from: [http://w.euro.who.int/data/assets/pdf\\_file/0007/127618/9244594218R.pdf](http://w.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0007/127618/9244594218R.pdf).
8. Siroko A.L., Yafaev R.Kh., Adamov A.K. [Charcoal serum aggregation assay]. *Bulletin of the Academy of Medical Sciences.* 1960; 5:23–33.
9. Smirnova N.I., Goryaev A.A., Kutyrev V.V. [Evolution of cholera agent genome in the modern period]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2010; 4:11–9.
10. Tikhonov I.V., Gryazneva T.N., Limorenko A.P., Skvortsov A.E., Vasil'ev P.G. [Development of manufacturing technology for the production of probiotic “Biod-5” and methods for its control]. *Veterinar. Patol.* 2003; 1: 161–3.
11. [Terms and conditions of transportation and storage of medical immunobiological preparations]. SR 3.3.2.1248-03. M.; 2003. 7 p.
12. Khishova O.M. [Pelletizing of Medicinal Plant Raw Material]. Vitebsk; 2005. 164 p.

## Authors:

Ovchinnikova M.V., Komissarov A.V., Abramova E.G., Kireev M.N., Ulyanov A.Yu., Bibikov D.N., Islyayeva M.N., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

## Об авторах:

Овчинникова М.В., Комиссаров А.В., Абрамова Е.Г., Киреев М.Н., Ульянов А.Ю., Бибиков Д.Н., Исляева М.Н., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Поступила 15.02.16.

А.В.Степанов, Н.А.Осина, Н.В.Майоров

## ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ СХЕМЫ ПРОИЗВОДСТВА ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ГЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ УЧЕТОМ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

**Цель:** оптимизация технологической схемы получения препарата для генной диагностики чумы с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов, связанная с подбором условий синтеза и метода очистки входящих в состав набора олигонуклеотидных зондов, несущих метки флуорофора (6-карбоксифлуоресцеин) и гасителя флуоресценции (Black Hole Quencher-1), оценка их качества и внедрения новой технологической линии в производство. **Материалы и методы.** Объектом для исследования являлся набор реагентов «Ген *Yersinia pestis* идентификация–РГФ» и входящие в его состав праймеры и зонд, обеспечивающие амплификацию *hmsH* гена. Синтез праймеров и зондов осуществляли в восьмиканальном синтезаторе ДНК ASM-800 (Биосет, Россия) твердофазным фосфитамидным методом. Для проведения исследований использовали очистку полученных зондов либо с помощью электрофореза в 20 % полиакриламидном геле размером 20×20 или 8×10 см с последующей очисткой на RP-картриджах в полуавтоматическом режиме на системе OPS-201 и вручную, либо только с RP-картриджами вручную, либо методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Специфическую активность полученных зондов проверяли в полимеразной цепной реакции с использованием ДНК, выделенной из бактериальных суспензий штамма *Yersinia pestis* C-624 с концентрациями  $1 \cdot 10^3$ – $1 \cdot 10^6$  м.к./мл. **Результаты и выводы.** Оптимизирована технология синтеза и подобран метод очистки олигонуклеотидных зондов, несущих флуорофор-6-карбоксифлуоресцеин и гаситель флуоресценции Black Hole Quencher-1. Показана целесообразность использования для очистки таких олигонуклеотидов, либо комплекса ВЭЖХ, либо электрофореза в 20 % полиакриламидном геле с 7 М мочевиной и последующей хроматографией на RP-картриджах в ручном режиме. Внедрение оптимизированной технологической схемы при производстве препаратов для генной индикации идентификации особо опасных патогенов с гибридизационно-флуоресцентной детекцией позволит сократить сроки их изготовления на 50 % и снизить себестоимость на 66 %.

**Ключевые слова:** Black Hole Quencher-1, генодиагностические препараты, детекция, 6-карбоксифлуоресцеин, патогенные биологические агенты, синтез зондов.

Корреспондирующий автор: Степанов Андрей Владимирович, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

A.V.Stepanov, N.A.Osina, N.V.Mayorov

## Optimization of the Technological Scheme for the Production of Preparations for Gene Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases Using Polymerase Chain Reaction with Hybridization-Fluorescent Registration of Results

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

**Objective** of the study was to optimize technological scheme for the production of preparation for gene diagnostics of plague with hybridization-fluorescent registration (HFR) of results, which is associated with the assessment and selection of synthesis conditions and method of oligonucleotide probe purification included into the kit and carrying fluorophore (6-carboxyfluorescein) and quencher (Black Hole Quencher-1) tags, as well as to evaluate their properties and implement this new technological line into manufacturing. **Materials and methods.** The object of investigation was the reagent panel "Gene *Yersinia pestis* Identification-HFR" and its constituent elements, probes and primers, providing for *hmsH* gene amplification. Synthesis of the primers and probes was carried out in 8-well DNA synthesizer ASM-800 (BioSet, Russia), using solid phosphite amid method. For the experiments the probes obtained were purified either by means of electrophoresis in 20 % polyacrylamide gel (size 20×20) or (size 8×10) with further purification through RP-cartridges in semi-automated mode in OPS-201 system and manually, or on RP-cartridges only in manual mode; or applying high-performance liquid chromatography (HPLC). Specific activity of the produced probes was tested by polymerase chain reaction using the DNA isolated from bacterial suspensions of *Yersinia pestis* C-624 strain, in concentrations up to  $1 \cdot 10^3$  –  $1 \cdot 10^6$  mc/ml. **Results and conclusions.** Optimized has been synthesis technology; selected has been the method for oligonucleotide probe purification, carrying phluorophore-6-carboxyphluorescein and Black Hole Quencher-1. Demonstrated is viability of applying the stated oligonucleotides or HPLC, or electrophoresis in 20 % polyacrylamide gel with 7 M urea and further purification through RP-cartridges in manual mode for purification purposes. Introduction of the optimized technological scheme in manufacturing of preparations for gene indication and identification of particularly dangerous pathogens with hybridization-fluorescent detection will allow for the reduction of lead time by 50 % and original cost – by 66 %.

**Key words:** Black Hole Quencher-1, gene diagnostic preparations, detection, 6-carboxyfluorescein, pathogenic biological agents, probe synthesis.

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

Corresponding author: Andrey V. Stepanov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

**Citation:** Stepanov A.V., Osina N.A., Mayorov N.V. Optimization of the Technological Scheme for the Production of Preparations for Gene Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases Using Polymerase Chain Reaction with Hybridization-Fluorescent Registration of Results. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 3:105–109. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-105-109

К настоящему времени полимеразная цепная реакция (ПЦР) является одним из наиболее совершенных диагностических методов молекулярной биологии и клинической лабораторной диагностики. Основными ее достоинствами являются высокая чувствительность, универсальность технологических процедур в виде использования единого набора оборудования, реактивов, подготовки проб и постановки анализа.

В настоящее время в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» освоен выпуск зарегистрированных в установленном порядке наборов реагентов для индикации и идентификации возбудителей особо опасных инфекционных агентов методом ПЦР с электрофоретической и гибридационно-флуоресцентной детекцией. При производстве препаратов с электрофоретическим учетом результатов технологическая схема состоит из пяти этапов: получение олигонуклеотидных праймеров (ОНП); препарата ПКО (положительного контрольного образца); приготовление компонентов набора; контроль готового препарата; маркировка, фасовка и упаковка комплектов набора.

При изготовлении наборов с учетом результатов в режиме реального времени необходим еще один дополнительный этап – получение зондов, меченых флуорофором и гасителем флуоресценции. Технология синтеза последних существенно отличается от классической схемы получения праймеров [5]. Одним из важных этапов в данном процессе является очистка модифицированных олигонуклеотидов, поскольку от этого напрямую зависит качество выпускаемого препарата [6].

Технология синтеза праймеров используется в институте с 2003 г., тогда как синтез зондов до сих пор оставался не внедренным в производство. В связи с этим очевидна необходимость проведения работ по освоению технологии введения флуоресцентных меток в состав олигонуклеотида, оптимизации способов очистки модифицированных зондов и внедрения подобранных технологических схем в практику.

В качестве объекта для исследования представляется перспективным использование набора реагентов «Ген *Yersinia pestis* – идентификация», включающего в свой состав по два зонда, меченых флуорофорами FAM, R6G, ROX [1].

Целью данной работы явилась оптимизация технологической схемы производства препарата для генной диагностики чумы с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов, направленная на подбор условий синтеза и методов очистки входящих в состав набора олигонуклеотидных зондов, несущих метки флуорофор-6-карбоксифлуоресцеин (FAM) и гаситель флуоресценции Black Hole Quencher-1 (BHQ1), оценка их качества и внедрения усовершенствованной технологической линии в практику.

## Материалы и методы

В качестве объекта исследований выбрали прай-

меры и зонд, входящие в состав набора реагентов «Ген *Yersinia pestis* идентификация-РГФ», и обеспечивающие амплификацию *hmsH* гена [1].

Синтез праймеров и зондов осуществляли в восьмиканальном синтезаторе ДНК ASM-800 (Биоссет, Россия) твердофазным фосфитамидным методом с использованием стандартных коммерческих реагентов: амидофосфитных производных нуклеозидов, нуклеозид-полимеров. Для получения зондов использовали 6-(3',6'-дипивалоилфлуоресценил-6-карбоксамидо)-гексил-1-О-(2-цианоэтил)-(N,N-диизопропил)-фосфорамидит и 4'-(2-нитро-4-толуилдиазо)-2'-метокси-5'-метил-азобензен-4''-(N-этил-2-О-(4,4'-дитетокситриил))-N-этил-2-О-гликолат-CPG.

Праймеры и зонды синтезировали в масштабе 200 нмоль. Очистку синтезированных праймеров осуществляли методом обращенно-фазовой хроматографии на RP-картриджах (ChemGenes, США) на двухканальной системе очистки OPS-201 (Биоссет, Россия). После этого их переосаждали 6 % перхлоратом лития (Fluka, Швейцария) в ацетоне (Экрос, Россия), отмывали от солей ацетоном и подсушивали этоксиэтаном (Вектон, Россия). Очистку полученных зондов проводили либо с помощью электрофореза в 20 % полиакриламидном геле размером 20×20 или 8×10 см с последующей очисткой на RP-картриджах в полуавтоматическом режиме на системе OPS-201 и вручную, либо только с RP-картриджами вручную, либо методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Для проведения ВЭЖХ использовали систему «Waters» с программным обеспечением «Breeze», включающую бинарный градиентный насос Waters 1525, ручной инжектор Rheodyne 7725i, нагреватель колонок Waters, двухволновой детектор Waters 2487, сканирующий программируемый флуоресцентный детектор Waters 2475, колонки Macherey-Nagel Nucleosil размером 250/4,6 мм с носителем C18, размером частиц 5 мкм и размером пор 300 Å. Подвижная фаза: А: 0,1 М водный раствор ацетата аммония; В: 50 % ацетонитрил в 0,1 М водном растворе ацетата аммония. Градиент: с А/В (70:30) до А/В (30:70) за 30 мин. Скорость потока: 1 мл/мин.

Качество синтезированных классических олигонуклеотидов проверяли методом электрофореза в денатурирующих условиях (с 7 М мочевиной) в 20 % ПААГ. В качестве лидирующего красителя использовали смесь 0,05 % бромфенолового синего и 0,05 % ксиленцианола (Диа-М, Россия) в 95 % водном растворе формамида (Merck, Германия) с 10 мМ NaOH (Хеликон, Россия). Для окрашивания полос и визуализации результата использовали 0,75 % Stains-all (Serva, Германия) в 50 % водном растворе формамида.

Оптическую плотность праймеров и зондов определяли при 260 нм на спектрофотометре СФ-56 (ЛОМО, Россия). Концентрацию олигонуклеотидов и зондов рассчитывали с помощью программы «Олиго Кальк» [2].

Аналитическую и специфическую активность праймеров и зондов проверяли с использованием реагентов, входящих в состав набора реагентов «Ген *Yersinia pestis* идентификация-РГФ». Для исследования готовили бактериальные суспензии штамма *Y. pestis* C-624 в 0,9 % растворе натрия хлористого до конечной концентрации  $1 \cdot 10^3$  м.к./мл. Обеззараживание бактериальных суспензий проводили в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». Выделение ДНК осуществляли методом нуклеосорбции с использованием коммерческого набора «ДНК-сорб-В» («ИнтерЛабСервис», Россия). Работу проводили в соответствии с инструкцией к препарату. Полученную ДНК изучали в ПЦР с реакционной смесью, приготовленной по ТУ 9398-034-01898109-2011.

Термоциклирование осуществляли в приборах «RotorGene 3000», «RotorGene 6000» («Corbett Life Science», Австралия) и «RotorGene Q» QIAGEN (Германия) по следующей программе: предварительная денатурация при 95 °С в течение 5 мин, затем 10 циклов, включающих 3 шага по 30 с каждый: денатурация при 95 °С, отжиг при 60 °С и синтез при 72 °С; затем 35 циклов по 20 с каждый: денатурация при 95 °С, отжиг при 56 °С и синтез при 72 °С. Уровень флуоресценции определяли при 56 °С (во втором блоке циклирования) по каналам FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange. Для учета флуоресценции активировали функцию «Slope Correct»/«Коррек. уклона», функция «More settings»/«Outlier Removal»/«Устранение выбросов» – 5 %, значения Threshold/Порог – 0,05. Полученные данные обрабатывали с применением стандартных статистических методов [3].

### Результаты и обсуждение

Для исследования синтезировали зонд, компле-

ментарный нуклеотидной последовательности *hmsH* гена возбудителя чумы, длиной 24 нуклеотида, несущий на 5`-конце 6-карбоксихлорофлуоресцеин (FAM), а на 3`-конце – Black Hole Quencher-1 (BHQ1) [1].

В ходе ряда экспериментов установлено, что для синтеза зондов в традиционном реакционном цикле амидофосфитного синтеза олигонуклеотидов время конденсации необходимо увеличить с 1 до 6 мин для того, чтобы максимально обеспечить присоединение флуорофора 6-карбоксихлорофлуоресцеина к олигонуклеотидной цепи, а для аммонолиза использовать концентрированный водный раствор аммиака при температуре 45 °С в течение 12 ч.

Очистка зондов от примесей является необходимым условием для освобождения от неполноценных олигонуклеотидов без флуорофора и гасителя, разрушившихся в ходе синтетических реакций и используемых при этом растворителей, присутствие которых в ПЦР может исказить результаты вплоть до полного ингибирования. Поэтому на следующем этапе нашей работы была проведена оценка эффективности различных методов очистки полученных меченых олигонуклеотидов (таблица).

В результате проведенных экспериментов установлено, что наибольший количественный выход зонда отмечен при использовании для его очистки RP-картриджей в ручном режиме – (27,9±0,81) ОЕ.

Практически одинаковое количество зонда получено при проведении электрофореза в денатурирующих условиях в 20 % полиакриламидном геле размером 8×10 см с 7 М мочевиной с дальнейшей очисткой на RP-картриджах в полуавтоматическом и ручном режиме: (4,5±0,92) и (4,6±1,18) ОЕ соответственно. При использовании полиакриламидного геля размером 20×20 см увеличение выхода зонда не отмечено: (6,8±1,36) и (3,31±0,87) ОЕ соответственно. Более того, при очистке олигонуклеотидов после электрофореза на геле размером 20×20 см с помощью RP-картриджей в ручном режиме, их ко-

Использованные в работе методы очистки олигонуклеотидов, меченных флуорофорами FAM и BHQ1

Наименование зонда	Характеристика метода	Тип буфера	Тип элюата
hms_p1	Электрофорез в денатурирующих условиях (7 М мочевины) в 20 % полиакриламидном геле (20×20 см) с дальнейшей очисткой на RP-картриджах, с помощью системы OPS-201 (в полуавтоматическом режиме)	0,1 М водный раствор ацетата аммония	30 % водный раствор ацетонитрила
hms_p2	Электрофорез в денатурирующих условиях (7 М мочевины) в 20 % полиакриламидном геле (20×20 см) с дальнейшей очисткой на RP-картриджах (в ручном режиме)	0,1 М водный раствор ацетата аммония	30 % водный раствор ацетонитрила
hms_p3	Электрофорез в денатурирующих условиях (7 М мочевины) 20 % полиакриламидном геле (8×10 см) с дальнейшей очисткой на RP-картриджах, с помощью системы OPS-201 (в полуавтоматическом режиме)	0,1 М водный раствор ацетата аммония	30 % водный раствор ацетонитрила
hms_p4	Электрофорез в денатурирующих условиях (7 М мочевины) 20 % полиакриламидном геле (8×10 см) с дальнейшей очисткой на RP-картриджах (в ручном режиме)	0,1 М водный раствор ацетата аммония	30 % водный раствор ацетонитрила
hms_p5	Очистка на RP-картриджах (в ручном режиме)	водный раствор 2 М триэтиламиноацетата и 0,1 М триэтиламиноацетат в 8 % водном растворе ацетонитрила	20 % водный раствор ацетонитрила
hms_p6	Высокоэффективная жидкостная хроматография «Waters» на колонке Macherey-Nagel Nucleosil размером 250/4,6 мм с носителем C18 с размером частиц 5 мкм и размером пор 300 Å. Сбор фракций в течение 2,5 мин	0,1 М водный раствор ацетата аммония и 50 % ацетонитрил в 0,1 М водном растворе ацетата аммония	0,1 М водный раствор ацетата аммония и 50 % ацетонитрил в 0,1 М водном растворе ацетата аммония

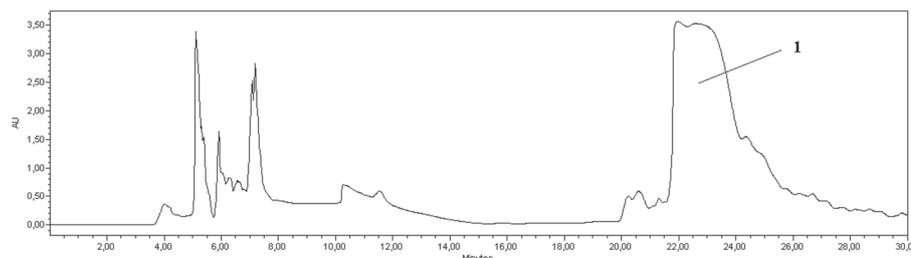


Рис. 1. Очистка зонда hms\_p6 методом ВЭЖХ:

1 – пик выхода зонда меченного FAM и ВНQ1

личество было в два раза меньше, чем при работе в полуавтоматическом режиме.

Применение ВЭЖХ позволило получить до  $(7,7 \pm 0,68)$  ОЕ зонда. Установлено, что элюция зонда отмечалась на 22-й минуте (рис. 1).

На следующем этапе экспериментов изучены аналитические свойства зондов. С этой целью готовили реакционные смеси, содержащие различные концентрации зонда: от 4 до 1 пмоль и праймеров – 8 и 6 пмоль. Для анализа использовали препараты ДНК, выделенные из бактериальных суспензий штамма *Y. pestis* C-624 (*hmsH+*) с концентрацией  $1 \cdot 10^6 - 1 \cdot 10^3$  м.к./мл. С полученной ДНК проводили ПЦР на амплификаторах типа «RotorGene» (3000, 6000, Q) (рис. 2).

Установлено, что во всех случаях, вне зависимости от способа очистки зондов, чувствительность реакции  $1 \cdot 10^3$  м.к./мл достигается при внесении в реакцию 6 пмоль праймеров и 3 пмоль зонда, что в полной мере соответствует требованиям ТУ 9398-034-01898109-2011 на «Набор реагентов для ускоренной идентификации штаммов *Yersinia pestis* методом мультилокусной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (Ген *Yersinia pestis* идентификация-РГФ)».

Максимальное накопление флуоресценции в пробирках – до 0,4 ед. – отмечено при проведении ПЦР с зондами hms\_p6, hms\_p2 и hms\_p4, очистку которых проводили с помощью ВЭЖХ, в первом случае, и электрофореза в денатурирующих условиях в 20 % полиакриламидном геле с 7 М мочевиной и на RP-картриджах в ручном режиме. При этом на эффективность очистки не влияли размеры используемого геля (20×20 или 8×10 см).

Применение зондов hms\_p1 и hms\_p3, очистка которых осуществлялась методом электрофореза в денатурирующих условиях в 20 % полиакриламидном геле с 7 М мочевиной и на RP-картриджах в полуавтоматическом режиме, продемонстрировало меньший уровень флуоресцентного сигнала – до 0,35 ед. В ПЦР с зондами hms\_p5, очистку которых проводили только с помощью RP-картриджей, интенсивность флуоресценции составляла не более 0,25 ед.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования для очистки зондов, меченых флуоресцентными метками FAM и ВНQ1, либо системы ВЭЖХ, либо комплексной схемы, предусматривающей проведение электрофореза в денатурирующих условиях в 20 % полиакриламидном геле с 7 М мочевиной и последующей очисткой на RP-картриджах в ручном режиме.

В процессе выполнения исследований, посвященных изучению качества модифицированных олигонуклеотидов, нами отмечалась особенность детекции их сигнала в диапазоне 510–555 нм. Из литературных источников известно, что карбоксифлуоресцеин имеет относительно широкий спектр 500–550 нм [4], и его флуоресценция может детектироваться по «JOE/Yellow» каналу. В проведенных исследованиях нами установлено, что присутствие в реакционной смеси одного зонда, имеющего флуорофор FAM и гаситель ВНQ1, сигнал с усилением (Gain) равным 10 может слабо детектироваться по «JOE/Yellow» каналу, но при добавлении второго зонда, содержащего флуорофор R6G, флуоресценция в этой части спектра не отмечается. Результаты экспериментов свидетельствуют о возможности при-

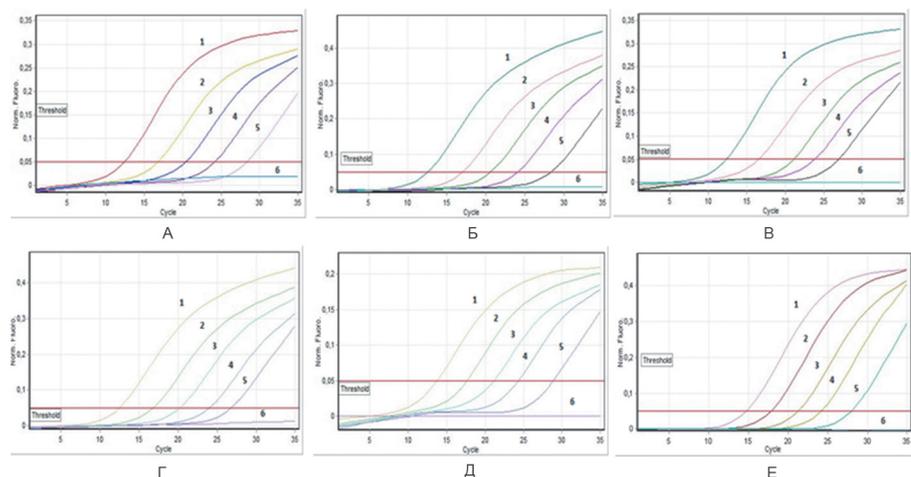


Рис. 2. Результаты амплификации *hmsH* гена с праймерами и зондами, очищенными различными способами:

1 – положительный контроль; 2 – *Y. pestis* C-624 ( $1 \cdot 10^6$  м.к./мл); 3 – *Y. pestis* C-624 ( $1 \cdot 10^5$  м.к./мл); 4 – *Y. pestis* C-624 ( $1 \cdot 10^4$  м.к./мл); 5 – *Y. pestis* C-624 ( $1 \cdot 10^3$  м.к./мл); 6 – отрицательный контроль. А – hms\_p1 (электрофорез в геле размером 20×20 см и на RP-картриджах в полуавтоматическом режиме); Б – hms\_p2 (электрофорез в геле размером 20×20 см и на RP-картриджах в ручную); В – hms\_p3 (электрофорез в геле размером 8×10 см и на RP-картриджах в полуавтоматическом режиме); Г – hms\_p4 (электрофорез в геле размером 8×10 см и на RP-картриджах в ручную); Д – hms\_p5 (на RP-картриджах в ручную); Е – hms\_p6 (ВЭЖХ)

менения синтезированных модифицированных олигонуклеотидов в составе наборов для постановки мультиплексной ПЦР-РВ.

Для изучения активности в отдаленных сроках наблюдения зонды помещали в морозильную камеру при температуре минус 20 °С. Затем, в течение двух лет с интервалом 3 месяца, образцы изучали в ПЦР-РВ. Специфическую и аналитическую активность модифицированных олигонуклеотидов проверяли посредством их использования в составе коммерческого препарата «Ген *Yersinia pestis* идентификация-РГФ» с ДНК, выделенной из бактериальных суспензий штамма *Y. pestis* C-624 (*hmsH+*). За время наблюдения (2 года) зонды сохраняли свою аналитическую чувствительность, что превышает срок хранения препарата, составляющего 6 мес.

Таким образом, в РосНИПЧИ «Микроб» усовершенствована технология получения препарата для генной диагностики чумы с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов за счет оптимизации синтеза и подбора методов очистки олигонуклеотидных зондов, несущих флуорофор-6-карбоксихлорофлуоресцеин (FAM) и гаситель флуоресценции Black Hole Quencher-1 (BHQ1). Определены их специфические и аналитические характеристики, соответствующие требованиям ТУ 9398-034-01898109-2011. Показана целесообразность использования для очистки таких олигонуклеотидов, либо комплекса ВЭЖХ, либо электрофореза в 20 % полиакриламидном геле с 7 М мочевиной и последующей хроматографией на RP-картриджах в ручном режиме. Используемые методические подходы получения зондов могут применяться для синтеза других олигонуклеотидов, несущих в своей структуре молекулы красителя и гасителя флуоресценции.

Внедрение оптимизированной технологической схемы производства препаратов для генной индикации и идентификации особо опасных патогенов с гибридационно-флуоресцентной детекцией, позволит сократить сроки их изготовления на 50 %, отказаться от приобретения зондов в сторонних организациях и существенно снизить финансовые затраты на 66 %.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куклев В.Е., Осина Н.А., Бугоркова Т.В., Кутырев В.В. Набор и способ для ускоренной идентификации чумного микроба с одновременной дифференциацией вирулентных и авирулентных штаммов *Y. pestis*, определением их плазмидного профиля. Патент РФ № 2473701. 2013. Бюлл. 3 от 27.01.2013.
2. Олиго Кальк: Программа для расчета свойств олигонуклеотидов (праймеров). Интернет-портал биологического факультета Белорусского Государственного Университета. <http://bio.bsu.by/molbiol/index.php?pg=oligocalc> (дата обращения 24.04.2017).
3. Поллард Дж. Справочник по вычислительным методам статистики. М.: Финансы и статистика; 1982. 344 с.
4. Ke G., Zhu Z., Wang W., Zou Y., Guan Z., Jia S., Zhang H., Wu X., Yang C.J. A Cell-Surface-Anchored Ratiometric Fluorescent Probe for Extracellular pH Sensing. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2014; 6(17):15329–34. DOI: 10.1021/am503818n.
5. Mullah B., Livak K., Andrus A., Kenney P. Efficient synthesis of double dye-labeled oligodeoxyribonucleotide probes and their application in a real time PCR assay. *Nucleic Acids Res*. 1998; 26(4):1026–31. DOI: 10.1093/nar/26.4.1026.
6. Tatarinova O.N., Lukyanova T.N., Zaitseva M.A., Veremeev K.Y., Karpov V.A., Chuvilin A.N., Petrunin D.D., Pozmogova G.E. Significance of Methods for Purification of Oligodeoxyribonucleotide Probes for the Efficiency of Gene Diagnosis by Real-Time PCR. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2008; 145(3):312–6. DOI: 10.1007/s10517-008-0078-6.

References

1. Kuklev V.E., Osina N.A., Bugorkova T.V., Kutuyev V.V. [The kit and methodology for rapid identification of plague microbe with simultaneous differentiation between virulent and avirulent *Y. pestis* strains, and specification of their plasmid profile]. RF Patent No 2473701. 2013. Bulletin N 3 dated January 27, 2013.
2. [Oligo Calc: software for calculation of oligonucleotide properties (primers)]. Internet-portal of the Biology Department, Belorussian State University. (cited 24 Apr 2017). Available from: <http://bio.bsu.by/molbiol/index.php?pg=oligocalc>.
3. Pollard G. [Reference Book on Statistical Computational Methods]. M.; 1982. 344 p.
4. Ke G., Zhu Z., Wang W., Zou Y., Guan Z., Jia S., Zhang H., Wu X., Yang C.J. A Cell-Surface-Anchored Ratiometric Fluorescent Probe for Extracellular pH Sensing. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2014; 6(17):15329–34. DOI: 10.1021/am503818n.
5. Mullah B., Livak K., Andrus A., Kenney P. Efficient synthesis of double dye-labeled oligodeoxyribonucleotide probes and their application in a real time PCR assay. *Nucleic Acids Res*. 1998; 26(4):1026–31. DOI: 10.1093/nar/26.4.1026.
6. Tatarinova O.N., Lukyanova T.N., Zaitseva M.A., Veremeev K.Y., Karpov V.A., Chuvilin A.N., Petrunin D.D., Pozmogova G.E. Significance of Methods for Purification of Oligodeoxyribonucleotide Probes for the Efficiency of Gene Diagnosis by Real-Time PCR. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2008; 145(3):312–6. DOI: 10.1007/s10517-008-0078-6.

Authors:

Stepanov A.V., Osina N.A., Mayorov N.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Об авторах:

Степанов А.В., Осина Н.А., Майоров Н.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Поступила 23.05.17.

**МЕМОРИАЛ, ПОСВЯЩЕННЫЙ УЧАСТНИКАМ ЛИКВИДАЦИИ ПОСЛЕДСТВИЙ СПИТАКСКОГО ЗЕМЛЕТРЯСЕНИЯ 7 ДЕКАБРЯ 1988 г.**

В городе Спитак (Республика Армения) установлен мемориал благодарной памяти от армянского народа за помощь при ликвидации последствий Спитакского землетрясения 7 декабря 1988 г.

Комплекс представляет собой памятник, изображающий стоящего на вершине холма бронзового солдата, держащего на руках девочку, и глыбы из туфа, с прикрепленными на них мемориальными табличками.



Рис. 1. Текст на памятнике:

«Советским воинам – участникам ликвидации последствий землетрясения в г. Спитак в декабре 1988 года»



Рис. 2. На глыбах из туфа, расположенных вдоль дороги к вершине холма, прикреплены мемориальные таблички, посвященные участникам ликвидации последствий Спитакского землетрясения

**В августе 2017 года были установлены камни, посвященные четырем СПЭБ научно-исследовательских противочумных институтов Минздрава СССР.**



Рис. 3. Текст на камне:

«В 1988 году 12 декабря Правительство СССР направило 4 оперативные специализированные противоэпидемические бригады СПЭБ в зону разрушительного землетрясения в Армении.

В городе Спитак работала СПЭБ Саратовского Всесоюзного научно-исследовательского противочумного института «Микроб».

Руководители СПЭБ:

Кокушкин Александр Михайлович – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией чумы и холеры.

Касьян Андрей Феодосьевич – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории чумы и холеры, начальник СПЭБ»



Рис. 4. Текст на камне:

«В городе Ленинакан работала СПЭБ Ставропольского научно-исследовательского противочумного института.

Руководитель СПЭБ: Савельев Вилорий Николаевич – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией микробиологии холеры, начальник СПЭБ.

Своим профессиональным и гражданским подвигом ученые, врачи, эпидемиологи и гигиенисты, лаборанты предотвратили массовые инфекционные заболевания и эпидемии.

Самоотверженный скоординированный труд всех медицинских работников содействовал плану восстановительных работ, но особенно ценной была помощь местным властям и населению в преодолении трудностей и кризисного стресса»



Рис. 5. Текст на камне:

«В городе Степанаван работала СПЭБ Волгоградского научно-исследовательского противочумного института. Руководитель СПЭБ: Яковлев Анатолий Трофимович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории индикации, начальник СПЭБ. В городе Ленинанкан работала – СПЭБ Ростовского научно – исследовательского противочумного института. Руководитель СПЭБ: Терентьев Александр Николаевич – кандидат медицинских наук, заведующий отделом биотехнологии, начальник СПЭБ»

В городе Ленинанкан работала СПЭБ Ростовского научно-исследовательского противочумного института. Руководитель СПЭБ: Терентьев Александр Николаевич – кандидат медицинских наук, заведующий отделом биотехнологии, начальник СПЭБ»



Рис. 6. Текст на камне:

«Армянский народ будет всегда уважать труд и помощь друзей, которые пришли на помощь в самые трудные, судьбоносные дни нашей общей истории.

Особую благодарность и низкий поклон, от имени Спитакцев выражаем: Руководителю и координатору оперативных групп СПЭБ от Минздрава СССР в зоне бедствия большому другу Армении: Онищенко Геннадию Григорьевичу»

ПАМЯТИ НОННЫ МИХАЙЛОВНЫ ОСТРОУМОВОЙ

28 июля 2017 года на 90-м году жизни после тяжелой болезни скончалась доктор медицинских наук, профессор, бывшая заведующая лабораторией холерных диагностических фагов с музеем института «Микроб» Нонна Михайловна Остроумова.

Нонна Михайловна была известным ученым-микробиологом, ведущим специалистом по холерным фагам в нашей стране. Она внесла значительный вклад в изучение холеры, разработала научные основы фагодиагностики возбудителя этой особо опасной болезни. Вся трудовая деятельность Н.М.Остроумовой связана с институтом «Микроб», где она проработала свыше 40 лет. Нонна Михайловна – автор более 200



научных трудов, многие из которых получили высокую оценку как в России, так и за рубежом. Под ее руководством защищено 10 кандидатских диссертаций.

Эрудиция, высокий профессионализм, талант организатора и исследователя, активная жизненная позиция сочетались в Нонне Михайловне с мудростью, справедливым и доброжелательным отношением к людям. Светлая память о ней навсегда сохранится в сердцах ее учеников и коллег.

Редакционная коллегия и редакционный совет журнала «Проблемы особо опасных инфекций» выражают искренние соболезнования семье и близким Нонны Михайловны Остроумовой.