

ПРОБЛЕМЫ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

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

Главный редактор член-корреспондент РАМН,
доктор медицинских наук, профессор **В.В.Кутырев**

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

Выпуск 103

1 · 2010

САРАТОВ

Адрес редакции:

410005, Саратов,
ул. Университетская, 46
Тел. (845-2) 51-82-22
Факс (845-2) 51-52-12
E-mail: microbe@san.ru
www.microbe.ru

Зав. редакцией Л.С.Пронина

Тел. (845-2) 51-82-22

Редактор *Л.С.Пронина*

Технический редактор
Т.К.Меркулова

Перевод на английский
Т.Б.Караваевой
А.Ю.Мощиной

Подписано в печать 18.02.10
Формат 60×88 1/8
Бумага офсетная
Печать офсетная
Усл. печ. л. 9,2
Гарнитура Таймс
Заказ 153

Подписной индекс – 24687

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

ISSN 0370-1069. Пробл. особо
опасных инф. 2010. Вып. 103. 1–78

Журнал отпечатан
в ООО «ИППОЛиТ-XXI век»
410012, Саратов, Б. Казачья, 79/85

ISSN 0370-1069



9 770370 106008 >

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

В.В.Алексеев, докт. мед. наук, профессор (Волгоград),
В.Е.Безсмертный, канд. мед. наук (Москва),
И.В.Борисевич, докт. мед. наук (Киров),
А.Л.Гинцбург, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва),
И.Г.Дроздов, докт. мед. наук, профессор (Кольцово),
И.А.Дятлов, докт. мед. наук, профессор (Оболенск),
А.Н.Куличенко, докт. мед. наук, профессор (Ставрополь),
В.В.Кутырев, докт. мед. наук, член-корр. РАМН (Саратов),
Ю.М.Ломов, докт. мед. наук, профессор (Ростов-на-Дону),
Д.К.Львов, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва),
В.П.Бондарев, докт. мед. наук (Сергиев Посад),
В.В.Малеев, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва),
В.П.Сергиев, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва),
Ю.М.Федоров, докт. мед. наук (Москва)

*Журнал включен в Реферативный журнал и Базы данных ВИНИТИ.
Сведения о журнале ежегодно публикуются в международной
справочной системе по периодическим и продолжающимся
изданиям «Ulrich's Periodicals Directory»*

*Электронные версии статей размещены на сайте Научной
электронной библиотеки (www.e-library.ru)*

© Федеральное государственное учреждение здравоохранения
Российский научно-исследовательский противочумный
институт «Микроб», 2010

**Problemy
osobo opasnyh infekcij**

ISSN 0370-1069

**Problems
of Particularly Dangerous Infections**

СОДЕРЖАНИЕ

Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Топорков А.В., Осин А.В. Современное состояние коллекционной деятельности, связанной с использованием возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности 5

Обзоры

Грачева И.В., Плотников О.П., Осин А.В. Современное состояние процедуры депонирования микроорганизмов в коллекционных центрах 11

Терешкина Н.Е., Михеева Е.А., Девдариани З.Л., Адамов А.К., Григорьева Г.В. Иммунодиагностика холеры: современное состояние проблемы 18

Эпидемиология, биобезопасность

Попов Н.В., Безсмертный В.Е., Топорков В.П., Иванова С.М., Удовиков А.И., Кузнецов А.А., Князева Т.В., Шилова Л.Д., Кутырев В.В. Прогноз эпизоотической активности природных очагов чумы Российской Федерации на 2010 г. 24

Адъяасурэн З., Цэрэнноров Д., Отгонбаатар Д., Балахонов С.В., Иннокентьева Т.И., Агиймаа Ш., Косилко С.А. Клинико-эпидемиологические особенности чумы в Монголии 30

Куклев Е.В., Раздорский А.С., Сафронов В.А., Адамов А.К., Лопатин А.А., Топорков В.П. Разработка структуры базы данных по рискам в области биологической безопасности на уровне субъекта Российской Федерации 34

Малюкова Т.А., Бобров А.Ф., Щербланов В.Ю., Тихомирова Л.А., Бойко А.В., Топорков А.В. Методологические основы оценки надежности профессиональной деятельности персонала, работающего с микроорганизмами I–II групп патогенности 37

Попов Н.В., Куклев Е.В., Топорков В.П., Адамов А.К., Щербакова С.А., Малецкая О.В., Ковтунов А.И., Яшкулов К.Б., Кабин В.В., Подсвилов А.В., Кологоров А.И., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Князева Т.В., Григорьев М.П., Санджиев В.Б.-Х., Осипов В.П., Пискунова Н.В., Сангаджиева Г.В. Сочетанные природные очаги бактериальных, риккетсиозных и вирусных инфекционных болезней в регионе Северо-Западного Прикаспия 44

CONTENTS

Onishenko G.G., Kutyrev V.V., Toporkov A.V., Ossin A.V. Current State of Collection Activity Relative to the Use of Infectious Agents of I–II Pathogenicity Groups

Review

Gracheva I.V., Plotnikov O.P., Ossin A.V. Current State of Microorganisms Depositing Procedure in Collection Centers

Tereshkina N.E., Mikheeva E.A., Devdariani Z.L., Adamov A.K., Grigoryeva G.V. Immunodiagnosics of Cholera: Current State of the Problem

Epidemiology, Biosafety

Popov N.V., Bezsmertny V.E., Toporkov V.P., Ivanova S.M., Udovikov A.I., Kuznetsov A.A., Knyazeva T.V., Shilova L.D., Kutyrev V.V. Prognosis of Epizootic Activity of Natural Plague Foci in the Russian Federation for the Year of 2010

Ad'yasuren Z., Tserennorov D., Otgonbaatar D., Balakhonov S.V., Innokentyeva T.I., Agiymaa Sh., Kosilko S.A. Clinical-Epidemiological Features of Plague in Mongolia

Kouklev E.V., Razdorskiy A.S., Safronov V.A., Adamov A.K., Lopatin A.A., Toporkov V.P. Development of the Structure of the Database on the Risks in the Sphere of Biological Safety at the Level of Constituent Unit of the Russian Federation

Malyukova T.A., Bobrov A.F., Scheblanov V.Yu., Tikhomirova L.A., Boiko A.V., Toporkov A.V. Methodological Background of the Assessment of Reliability of the Professional Activity of the Personnel Working with PBA of Pathogenicity Groups I–II

Popov N.V., Kouklev E.V., Toporkov V.P., Adamov A.K., Scherbakova S.A., Maletskaya O.V., Kovtunov A.I., Yashkulov K.B., Kabin V.V., Podsvirov A.V., Kologorov A.I., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Knyazeva T.V., Grigoryev M.P., Sandzhiev V.B.-Kh., Ossipov V.P., Piskunova N.V., Sangadzhieva G.V. Combined Natural Foci of Bacterial, Rickettsial and Viral Infectious Diseases in the North-West Precaspian Region

Микробиология, иммунодиагностика, иммунопрофилактика

- Оборин В.А., Пименов Е.В., Ивонин А.Г.** Изучение адгезии бактерий вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам животных фотоколориметрическим методом 48
- Плясунов И.В., Сергеев А.А., Шишкина Л.Н., Сергеев Ал.А., Титова К.А., Агафонов А.П., Евтин Н.К., Ставский Е.А., Дроздов И.Г.** Клинические исследования вакцины против оспы на основе рекомбинантного штамма осповакцины b7,5S2-S в условиях двукратной оральной вакцинации 51
- Фирстова В.В., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Зырина Е.В., Иванов С.А., Киселева Н.В., Копылов П.Х., Анисимов А.П., Дятлов И.А.** Определение экспрессии маркера ранней активации CD69 на лимфоцитах иммунных мышей после стимуляции их антигенами чумного микроба 56
- Шабалин Б.А., Охупкина В.Ю., Дармов И.В., Кузнецов С.Л.** Изучение патогенных свойств возбудителей бруцеллеза в условиях искусственной иммуносупрессии 60
- Шарапова Н.А., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Киреев М.Н., Савицкая Л.В., Минаева Л.Н., Михеева Т.А., Галкина М.В., Краснов Я.М.** Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе 63

Биотехнология

- Афанасьев Е.Н., Тюменцева И.С., Коготкова О.И., Ляпустина Л.В., Жарникова И.В., Савельева И.В., Бudyка Д.А.** Разработка новых подходов к получению гипериммунных сывороток для производства медицинских иммунобиологических препаратов 67
- Еремин С.А., Микшис Н.И., Волох О.А., Кудрявцева О.М., Шепелев И.А., Гончарова А.Ю., Попов Ю.А., Никифоров А.К.** Изучение биокинетических особенностей и оптимизация условий культивирования рекомбинантного аспорогенного штамма-продуцента протективного антигена сибиреязвенного микроба 70

Краткие сообщения

- Афанасьева Г.А., Чеснокова Н.П., Захарова Н.Б.** Закономерности изменений уровня IL-1 α в крови при экспериментальной чумной интоксикации 75

Памяти коллеги

- Памяти Александра Семеновича Марамовича (1937–2009) 77

Microbiology, Immunodiagnosics, Immunophylaxis

- Oborin V.A., Pimenov E.V., Ivonin A.G.** Analysis of Adhesion of *Yersinia pestis* Vaccine Strain EV to Erythrocytes of the Animals Using Photocolorimetric Method 48
- Plyasunov I.V., Sergeev A.A., Shishkina L.N., Sergeev Al.A., Titova K.A., Agafonov A.P., Evtin N.K., Stavskiy E.A., Drozdov I.G.** Clinical Studies of Vaccine Against Smallpox on the Base of Recombinant *Vaccinia* b7,5S2-S Strain under the Conditions of Double Oral Vaccination 51
- Firstova V.V., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Zyrina E.V., Ivanov S.A., Kisseleva N.V., Kopylov P.Kh., Anisimov A.P., Dyatlov I.A.** Determination of the Expression of CD69 Marker of Early Activation in the Immune Mice Lymphocytes after their Stimulation with Plague Agent Antigens 56
- Shabalin B.A., Okhupkina V.Yu., Darmov I.V., Kuznetsov S.L.** Study of Pathogenic Properties of Brucellosis Agents under Artificial Immunosuppression Conditions 60
- Sharapova N.A., Abramova E.G., Nikiforov A.K., Kireev M.N., Savitskaya L.V., Minaeva L.N., Mikheeva T.A., Galkina M.V., Krasnov Ya.M.** Determination of the Activity of the Anti-Rabies Sera and Heterologous Anti-Rabies Immunoglobulin *in vitro* in the Dot Immunoassay 63

Biotechnology

- Afanasiev E.N., Tyumentseva I.S., Kogotkova O.I., Lyapustina L.V., Zharnikova I.V., Savelyeva I.V., Budyka D.A.** Development of New Approaches of Obtaining the Hyperimmune Sera for Production of Medical Immunobiological Preparations 67
- Eremin S.A., Mikshis N.I., Volokh O.A., Kudryavtseva O.M., Shepelev I.A., Goncharova A.Yu., Popov Yu.A., Nikiforov A.K.** Study of Biokinetic Properties and Optimization of the Conditions of Propagation of Recombinant Asporogenic Strain Producing Anthrax Agent Protective Antigen 70

Brief Communications

- Afanasieva G.A., Chesnokova N.P., Zakharova N.B.** Patterns of the Alterations of IL-1 α Blood Level in Experimental Plague Intoxication 75

Revering the Memory of the Colleague

- Of blessed memory of Alexandr Semenovich Maramovich (1937–2009) 77

Г.Г.Онищенко¹, В.В.Кутырев², А.В.Топорков², А.В.Осин²**СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ КОЛЛЕКЦИОННОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ,
СВЯЗАННОЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ
I–II ГРУПП ПАТОГЕННОСТИ**¹Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва;²ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

В обзоре представлена нормативно-правовая база, регламентирующая коллекционную деятельность, связанную с использованием возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности. Рассмотрены приоритетные направления деятельности, которые должны быть реализованы ведущими коллекциями патогенных микроорганизмов. Предложены перспективные подходы к совершенствованию работы коллекционных центров, требующие решения на современном организационно-правовом, техническом и научно-методическом уровне.

Ключевые слова: коллекции патогенных микроорганизмов, штаммы микроорганизмов, технологии хранения, таксономия, молекулярная биология, паспортизация штаммов, каталоги микроорганизмов.

Коллекционная деятельность направлена на сохранение и рациональное использование биологического разнообразия микроорганизмов – возбудителей инфекционных заболеваний человека и животных. Целью коллекционной деятельности является централизованный сбор и хранение входящих в коллекционный фонд биологических ресурсов с гарантией их воспроизводства и неизменности – природных, генетически модифицированных штаммов микроорганизмов I–IV групп патогенности, непатогенных штаммов с фрагментами генома I–II групп патогенности (опасности), а также штаммов микроорганизмов, используемых в биотехнологическом производстве медицинских иммунобиологических препаратов.

Действующая в настоящее время нормативно-правовая база, регламентирующая работу коллекций патогенных микроорганизмов, включает в себя законодательные акты как национального, так и международного значения. На международном уровне коллекционная деятельность в отношении микроорганизмов регулируется Будапештским договором от 28.04.1977 г. о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры (Российская Федерация (правопреемник СССР) участница договора с 22.04.1981), в котором заложены основные принципы депонирования штаммов микроорганизмов в авторизированных коллекциях для целей патентной процедуры, а также Конвенцией о биологическом разнообразии от 05.06.1992, (ратифицирована Российской Федерацией 17.02.1995 года), направленной на сохранение биологического разнообразия, устойчивое использование его компонентов и совместное получение на справедливой и равной основе выгод, связанных с использованием генетических ресурсов, в том числе путем предоставления необходимого доступа к генетическим ресурсам и путем надлежащей передачи соответствующих технологий с учетом всех прав на такие ресурсы и технологии, а также путем должного финансирования.

В Российской Федерации коллекционная деятельность, связанная с использованием патогенных для человека микроорганизмов, осуществляется в соответствии с действующей нормативно-правовой базой.

Общие положения, связанные с правом на осуществление коллекционной деятельности, регулируются: Федеральным законом Российской Федерации «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ; Постановлениями Правительства Российской Федерации «О мерах по сохранению и рациональному использованию коллекций микроорганизмов, культивируемых клеток высших растений, перевиваемых соматических клеток позвоночных» от 24.06.1996 г. № 725-47 и «О разграничении полномочий федеральных органов исполнительной власти в области обеспечения биологической и химической безопасности Российской Федерации от 16 мая 2005 г. № 303 (с изменениями от 23 марта 2006 г. и 13 марта 2008 г.).

Биологическая безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности регламентирована Федеральным законом Российской Федерации «О лицензировании отдельных видов деятельности» от 8 августа 2001 г. № 128-ФЗ; Постановлением Правительства Российской Федерации «Об утверждении Положения о лицензировании деятельности, связанной с использованием возбудителей инфекционных заболеваний» от 22 января 2007 г. № 31, а также Санитарными правилами «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» (СП 1.3.1285-03) и «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности и гельминтами» (СП 1.3.2518-09).

Обращение штаммов микроорганизмов I–IV групп патогенности, их хранение и передача на территории Российской Федерации и за ее пределы осуществляется согласно Федеральному закону Российской Федерации «Об экспортном контроле»

от 19 июля 1999 г. № 183-ФЗ; Указу Президента Российской Федерации «Об утверждении списка микроорганизмов, токсинов, оборудования и технологий, подлежащих экспортному контролю» от 20 августа 2007 г. № 1083; Постановлению Правительства Российской Федерации «О внесении изменений в постановление Правительства Российской Федерации» от 29 августа 2001 г. № 634 «Об утверждении Положения об осуществлении контроля за внешнеэкономической деятельностью в отношении возбудителей заболеваний (патогенов) человека, животных и растений, генетически измененных микроорганизмов, токсинов, оборудования и технологий» от 11 сентября 2007 г. № 580, а также Санитарным правилам «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности» (СП 1.2.036-95).

Защита интеллектуальной собственности в области использования патогенных микроорганизмов регулируется Федеральным законом Российской Федерации «О введении в действие части четвертой Гражданского кодекса Российской Федерации» (раздел VII. Права на результаты интеллектуальной деятельности и средства индивидуализации) от 18 декабря 2006 г. № 231-ФЗ.

Таким образом, в Российской Федерации существует обширная нормативно-правовая база, регламентирующая коллекционную деятельность, связанную с использованием патогенных микроорганизмов, тем не менее необходимо ее дальнейшее совершенствование. Совершенствование должно быть направлено на формирование единых подходов к ранжированию коллекций микроорганизмов, созданию единых алгоритмов их функционирования и направлений деятельности, принятию мер по государственной поддержке ведущих коллекционных центров микроорганизмов.

Формирование коллекций микроорганизмов является важнейшим этапом в развитии микробиологии. Впервые «живая» коллекция культур была создана Франтишек Кралом в 1890 г. на медицинском факультете Института гигиены в Праге. Эта частная коллекция содержала несколько сотен культур и препаратов, фиксированных на предметных стеклах, большая часть которых после смерти Краля была вывезена в США и впоследствии включена в Американскую коллекцию типовых культур [29]. Другие коллекции, созданные в эти же годы в различных странах Европы отдельными лицами или научными организациями, а также коллекция, созданная в Японии в 1884 г. [34], на сегодняшний день утрачены. В 1920 г. в Великобритании была основана Национальная коллекция типовых культур (NCTC), в состав которой вошли более 5000 бактериальных штаммов. Созданная в США пятью годами позже Американская коллекция типовых культур (ATCC) считается в настоящее время крупнейшим в мире биоресурсным центром по хранению и изучению микроорганизмов. Коллекция располагает 18000 бак-

териальных штаммов, принадлежащих к 750 родам. В ATCC хранится более 3600 типовых штаммов, составляющих основу для изучения систематики бактерий. Формирование микробных коллекций в России началось в 30-е годы прошлого века, а пик их организации приходится на 50–60-е годы, когда были образованы в общей сложности 36 коллекций [7]. Одними из первых коллекций патогенных микроорганизмов бактериальной природы с официально закрепленным статусом (приказ Минздрава СССР № 205/а от 30 апреля 1955 г.) являются коллекции патогенных микроорганизмов I–II групп патогенности в Российском научно-исследовательском противочумном институте «Микроб» и III–IV групп патогенности при Государственном институте стандартизации и контроля им. Л.А.Тарасевича. Согласно этому приказу официальный статус коллекций получили музеи живых культур Института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалея, Института вирусологии им. Д.И.Ивановского, Иркутского противочумного института и ряда других учреждений. В настоящее время в Российской Федерации наиболее значимые коллекции микроорганизмов I–II групп патогенности находятся в подведомственных учреждениях Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Российской академии наук, Российской академии медицинских наук, Министерства обороны Российской Федерации, Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, Российской академии сельскохозяйственных наук.

В последнее время значение коллекции микроорганизмов расширяется, переходя от функций простых хранилищ штаммов возбудителей инфекционных болезней к формированию центров («государственных коллекций»), обеспечивающих хранение, комплексное изучение с помощью современных методов и использование коллекционных штаммов.

В связи с этим основными задачами таких центров являются:

- поддержание, пополнение и учет коллекционного фонда патогенных микроорганизмов и их стандартных образцов;
- осуществление номенклатурной ревизии штаммов коллекции на основе традиционных и современных молекулярно-генетических методов исследования;
- проведение таксономических исследований, направленных на выявление и комплексный анализ новых видов и новых патогенных штаммов, сформировавшихся внутри вида;
- уточнение таксономического положения культур с атипичным фено- и генотипом;
- совершенствование методов консервации, разработка и внедрение новых технологий, направленных на сохранение коллекционных штаммов в жизнеспособном исходном состоянии;
- обеспечение научных, практических учреждений и производств микробиологического профи-

ля качественными образцами эталонных штаммов микроорганизмов, полностью соответствующих заявляемым свойствам;

- осуществление деятельности в качестве национального органа по депонированию микроорганизмов; проведение процедуры патентного и авторского депонирования штаммов микроорганизмов;

- ведение баз данных и каталогов коллекционных штаммов;

- консультативная и научно-методическая помощь по вопросам систематики и номенклатуры, поиску штаммов.

Важная роль в осуществлении коллекционной деятельности отводится проведению микробиологической, молекулярно-генетической и эпидемиологической паспортизации природных и генетически измененных коллекционных штаммов микроорганизмов, а также формированию панелей типовых и референтных штаммов микроорганизмов для научно-исследовательских работ, производственных работ микробиологического профиля и учебного процесса.

Одной из основных целей микробиологической коллекции является формирование и поддержание фонда культур в условиях, исключающих их утрату, морфологические изменения, изменение или утрату биохимических, серологических и токсических свойств, или изменение чувствительности к антибиотикам [4, 31]. В связи с этим любые, включаемые в коллекцию штаммы, должны неизменно содержаться в тех же условиях, в которых они были изначально выделены в виде чистой культуры, а для этих целей необходимо использование современных методов, позволяющих сохранять микроорганизмы в неизменном виде. Поддержание бактериальных культур методом постоянного пересева способствует накоплению генетических мутаций и, как следствие, изменению свойств бактериальной клетки. Кроме того, с увеличением коллекционного фонда процесс постоянных пересевов становится трудоемким. Для предотвращения накопления мутационных изменений в геноме бактериальных штаммов разработан ряд методов стабилизации свойств и длительного хранения коллекционных микроорганизмов: лиофилизация, хранение при низких температурах и криоконсервация.

Метод лиофилизации заключается в высушивании культур под вакуумом при низких температурах (-20, -50 °С). Лيوфилизованные культуры могут сохраняться в течение длительного времени (30 и более лет), если их хранить без доступа кислорода, влаги и света при пониженных температурах. Лيوфилизация обеспечивает для широкого круга микроорганизмов большую стабильность, по сравнению с обычными способами высушивания и периодических пересевов. Использование этого подхода имеет преимущество перед иными способами консервации еще и в том, что позволяет хранить большое число ампул каждой культуры, увеличивая тем самым сохранность коллекционного фонда, а также удобный, не

требующий дополнительных затрат, способ транспортировки штаммов микроорганизмов [10].

Другим вариантом длительного сохранения жизнеспособных клеток микроорганизмов является хранение при низких температурах. Многие микроорганизмы могут храниться при температуре ниже -60 °С с сохранением высокого содержания жизнеспособных клеток в течение многих лет. Преимущества данного метода консервации состоят в его простоте и удобстве, минимуме подготовительной работы, быстром извлечении хранимого материала для восстановления после замораживания, большей безопасности при возможном размораживании материала. При использовании этого метода консервации довольно редки генетические изменения, а культуры микроорганизмов, сохраняемые таким методом, оказываются менее поврежденными и имеют более высокий уровень жизнеспособности, чем при высушивании и лиофилизации. В то же время надежность метода низкотемпературной консервации связана с безотказной работой холодильников и требует постоянного энергопитания [13].

Известен также способ длительного хранения биоматериала в жидком азоте – криоконсервация. Криоконсервация предназначена для длительного сохранения биологических объектов. При хранении материала в температурном режиме -196 °С удается получить высокий уровень жизнеспособных клеток, титр которых при длительном хранении в жидком азоте сохраняется на исходном уровне, что делает практически неограниченным возможное время хранения. Определенную сложность представляет подбор условий такого хранения, поскольку универсальных способов криоконсервации не существует. Тем не менее, к настоящему времени отработаны режимы криоконсервации для целого ряда видов и штаммов микроорганизмов [23]. Несмотря на все описанные выше преимущества, данный способ хранения микроорганизмов не стал доминирующим, поскольку для консервации большого числа коллекционных штаммов требуется организация автоматизированного криогенного хранилища и выделение отдельного помещения для его установки, кроме того, стоимость доставки хранившегося таким способом материала до сторонних организаций выше, чем у лиофилизованных культур.

В настоящее время основным регламентированным методом консервации патогенных бактерий является лиофильное высушивание [3]. Однако в последние годы разработан широкий спектр современного высокотехнологичного оборудования для сохранения в неизменном виде штаммов микроорганизмов. В связи с этим для стандартизации и унификации методов консервации патогенных микроорганизмов требуется создание регламента и единых правил хранения штаммов возбудителей инфекционных заболеваний в Государственных коллекциях Российской Федерации.

Одним из важнейших аспектов коллекционной

деятельности, связанной с пополнением, хранением и изучением микроорганизмов, является составление каталогов поддерживаемых штаммов. В Российской Федерации работы в этом направлении велись в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН – Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ). Часть каталогов ВКМ 2003 была представлена в формате XML (от англ. Extensible Markup Language) [22].

В рамках государственной программы «Биоразнообразие» (1999–2001 гг.) был подготовлен в электронном виде объединенный каталог Российских коллекций немедицинского профиля. Базовой организацией по выполнению данного проекта была Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ ИБФМ РАН), а в качестве соисполнителей выступали 17 российских коллекций, в том числе и Государственная коллекция патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб». Окончательный вариант электронной версии Объединенного каталога (Consolidated Catalogue of Microbial Cultures Held in Russian Non-medical Collections. CD version, release 1.0 (Fall 2002) был размещен в Интернете на Web-сайте ВКМ [22], в формате электронной книги MS eReader в 5 томах на английском языке [21]. Из иностранных каталогов, находящихся в открытом доступе, наиболее детально представлены каталоги Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) и NCTC, расположенные в сети Интернет [16, 18].

Однако форма этих каталогов удобна лишь с точки зрения поиска микроорганизмов по номеру штамма, но не позволяет подбирать их по интересующим характеристикам. Создание полноценной базы данных как инструмента для проведения многофакторного анализа коллекционных штаммов является одной из приоритетных задач коллекционной деятельности.

Разработки по созданию такой базы данных микроорганизмов велась в Институте микробиологии РАН. Созданная база данных UNIQEM (UNIQue and Extremophilic Microorganisms) позволяла накапливать и поддерживать списочную информацию о широком спектре микроорганизмов – каталожная БД, а также осуществлять сбор, обработку и публикацию самой разнообразной информации по этим микроорганизмам и их характеристикам – БД свойств. При этом UNIQEM была изначально ориентирована на сбор любой микробиологической информации. В результате проведенной работы, авторами был создан программный комплекс, реализующий возможности хранения, обработки и опубликования информации о 1000 и более штаммов, характеризующихся не более чем по 1000 групп монофункциональных свойств; хранения связанной графической информации; хранения текстовой информации, включающей состав сред, секвенсы, текстовые описания штаммов [1]. В литературе отсутствуют сведения по разработкам баз данных подобной структуры, направленных на ката-

логизацию патогенных микроорганизмов, что указывает на высокую актуальность и приоритетность разработок, ведущихся в этом направлении.

Другим не менее важным направлением коллекционной деятельности является установление принадлежности штаммов к той или иной таксономической группе. Традиционно такие исследования проводятся с использованием культурально-морфологических, физиологических и серологических методов. Тем не менее, с развитием приборной базы большое значение приобретают методики, связанные с изучением генома коллекционных штаммов. Для определения генетических детерминант вирулентности и патогенности, видоспецифичных маркеров широкое применение получила полимеразная цепная реакция (ПЦР) [5].

В настоящее время имеется широкий спектр молекулярно-генетических методов, позволяющих проводить типирование возбудителей инфекционных заболеваний с целью уточнения их таксономической принадлежности и определения происхождения. При этом полностью универсального подхода к молекулярному типированию всех возбудителей особо опасных инфекций не существует. Кроме того, использование одного методического приема связано с риском получения недостоверных результатов. Поэтому требуется разработка комплексного алгоритма молекулярного типирования для каждого из возбудителей особо опасных инфекций, который включал бы не менее 2–3 методов, дополняющих друг друга. Наиболее перспективными подходами для типирования возбудителей чумы, холеры, туляремии, бруцеллеза, сапа и мелиоидоза являются мультилокусное секвенирование (MLST – от англ. Multi Locus Sequence Typing), риботипирование, мультилокусный VNTR анализ (MLVA – от англ. Multiple Loci VNTR Analysis) [9, 11, 12, 14, 24, 25, 26, 27, 30, 32]. Для микроорганизмов, изучаемых с помощью MLST и MLVA, созданы базы данных <http://www.mlst.net/> и <http://minisatellites.u-psud.fr/MLVAnet/>, соответственно. Также для создания геномных «портретов» штаммов *V. cholerae* хорошо зарекомендовал себя метод риботипирования. Этот подход представляет собой вариант полиморфизма длин рестриционных фрагментов и основан на анализе генов рибосомальной РНК, обладает хорошей воспроизводимостью и простотой обработки результатов. С его помощью можно дифференцировать штаммы холерных вибрионов, сформировавшиеся на различных эндемичных по холере территориях [28, 35]. Одним из примеров практического применения молекулярного типирования является расследование источника случаев «почтового» терроризма в США в 2001 г. Изучение молекулярно-генетических свойств (в частности, метод MLVA) используемого для этих целей штамма и сравнение полученных характеристик с соответствующими характеристиками набора коллекционных штаммов возбудителя сибирской язвы позволило установить название штамма, источник и автора распылки сибирезвонных спор [33].

Применение систем молекулярного типирования для определения таксономического положения коллекционных штаммов используется в ряде зарубежных коллекций. В коллекции АТСС для определения аутентичности штаммов используется комплекс методов, включающий в себя классические микробиологические подходы и генотипирование, основанное на секвенировании генов и рибопринтинге [20]. В Национальной коллекции типовых культур (NCTC) применяют методы изоферментного анализа, ДНК фингерпринтинга и микросателлитного генотипирования, основанного на ПЦР [19]. Для идентификации бактериальных штаммов и их принадлежности к таксономическим группам в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) используют секвенирование 16S рДНК, рибопринтинг, VNTR-анализ и ДНК-ДНК гибридизацию [15]. В Российской Федерации молекулярно-генетические методы идентификации и филогенетического родства штаммов проводят в таких коллекциях немецкого профиля, как Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ) и Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПМ) [17, 22]. Для патогенных микроорганизмов, в частности возбудителей I–II групп патогенности, решение этого вопроса пока остается открытым.

Таким образом, одной из важных задач в изучении таксономии патогенных бактерий является выработка единого алгоритма применения молекулярно-генетических методов исследования и создание баз данных, позволяющих анализировать полученные сведения. Реализация этого направления в деятельности коллекционных центров необходима как для уточнения таксономического положения коллекционных штаммов, так и для выявления происхождения и путей распространения возбудителей инфекционных болезней как в случае эпидемических вспышек, так и при актах биотерроризма. Кроме того, необходимо разработать документацию, нормативно закрепляющую комплексные подходы в изучении возбудителей инфекционных заболеваний, для их стандартизации и унификации в коллекциях патогенных микроорганизмов.

Приказом Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней» от 17.03.2008 г. № 88 регламентировано создание Национальных центров верификации диагностической деятельности и Национальных центров, осуществляющих функции государственных коллекций, на базе четырех учреждений Роспотребнадзора: ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», ФГУН «ГНЦ ПМБ», ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» и ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича.

В настоящее время в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности (2009–2013 гг.)» осуществляется финансирование мероприятий, направ-

ленных на укрепление материально-технической базы и изучение штаммов микроорганизмов ведущих коллекционных центров.

Принципиальной функцией коллекционных центров является комплексный подход к пополнению коллекционного фонда микроорганизмов, в основе которого лежит депонирование штаммов микроорганизмов, обеспечивающее их сохранность в жизнеспособном состоянии. Обычно различают три формы депонирования, принимаемых на хранение штаммов, включающие ряд требований: свободное хранение, когда информация о поступивших штаммах общедоступна, а их выдача осуществляется по заявкам заинтересованных лиц без получения разрешения от депозитора; гарантированное хранение, обеспечивающее сохранность информации о поступивших штаммах, и их выдача возможна только по письменному разрешению депозитора; патентное депонирование, осуществляемое в уполномоченных коллекциях, когда на депонируемый штамм планируется подать заявку на оформление патента, включающее национальное и международное патентное депонирование. Депонирование для целей патентной процедуры считается осуществленным, если штамм, линия клеток или консорциум помещены в международный орган по депонированию, предусмотренный Будапештским договором о международном признании депонирования для целей патентной процедуры [2], или в уполномоченную на их депонирование российскую коллекцию, гарантирующую поддержание жизнеспособности объекта в течение, по меньшей мере, срока действия патента и удовлетворяющую другим установленным требованиям к коллекциям, осуществляющих депонирование для целей патентной процедуры [6]. Согласно последним данным, опубликованным Федеральным институтом промышленной собственности (ФИПС), в Российской Федерации к коллекциям, уполномоченным осуществлять депонирование патогенных для человека микроорганизмов, относятся: Государственная коллекция патогенных бактерий при ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб», коллекция микроорганизмов Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» и коллекция ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича [8].

Подводя итог обзору коллекционной деятельности, связанной с использованием патогенных для человека микроорганизмов, следует отметить основные перспективные направления развития ведущих коллекций возбудителей инфекционных болезней, требующих государственной поддержки. Во-первых, это разработка и введение единого положения о коллекционной деятельности, связанной с использованием микроорганизмов I–II группы патогенности (опасности) в Российской Федерации, формирование перечня коллекций с нормативно закрепленным статусом «Государственная» и правом по осуществлению охраноспособного депонирования с целью осуществления национальной патентной процедуры. Во-вторых, создание комплексных унифицированных и нормативно

закрепленных алгоритмов анализа штаммов патогенных микроорганизмов и внедрение молекулярно-генетической паспортизации штаммов возбудителей инфекционных болезней с использованием современных методов исследований. И, наконец, модернизация материально-технической базы «Государственных» коллекций с целью совершенствования существующих методов консервации, разработки и внедрения новых технологий, направленных на сохранение коллекционных штаммов в жизнеспособном и исходном состоянии и применение современных информационных подходов каталогизации, паспортизации и учета движения патогенных штаммов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахлынин Д.С., Гальченко В.Ф. Микробиологическая база данных UNIQEM: проблемы и перспективы. Микробиол. 2000; 69:574–80.
2. Будапештский договор о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры. Будапешт; 1977.
3. Инструкция по лиофильному высушиванию возбудителей инфекционных заболеваний I–IV групп на коллекторном аппарате системы К.Е. Долинова от 21 марта 1979 г. МЗ СССР, 1979.
4. Маркин В.А. Коллекции патогенных вирусов в решении общебиологических проблем. Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 6: 84–93.
5. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. М.: Медицина; 2009. 470 с.
6. О правилах составления, подачи и рассмотрения заявки на выдачу патента на изобретение: Приказ российского агентства по патентам и товарным знакам № 82 от 06.06.2003. Рос. газ. 08.10.2003; № 202. С. 8.
7. Озерская С.М., Кочкина Г.А., Иванушкина Н.Е., Запретова К.М., Еремичева С.С., Князева Е.В. Состояние коллекций микроорганизмов в России. Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. 2006; 2; 3:51–61.
8. Уткина Е., Гаврилова Е., Скородумова О. Депонирование штаммов микроорганизмов для целей национальной патентной процедуры и предоставления к ним доступа третьим лицам. Интеллектуальная собственность. Промышленная собственность. 2008; 10:17–23.
9. Achtman M., Morelli G., Zhu P., Wirth T., Diehl I., Kusecek B. et al. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. PNAS. 2004; 101:17837–42.
10. Ashwood-Smith M.J. Low temperature preservation in medicine and biology. Tunbridge Wells: Pitman Medical. 1980. 323 p.
11. Farlow J., Smith K. L., Wong J., Abrams M., Lytle M., Keim P. *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis. J. Clin. Microbiol. 2001; 39:3186–92.
12. Ghosh R., Nair G.B., Tang L., Morris J.G., Sharma N.C., Ballal M. et al. Epidemiological study of *Vibrio cholerae* using variable number of tandem repeats. FEMS Microbiol. Letters. 2008; 288:196–01.
13. Gibson L.F., Houry J.T. Storage and survival of bacteria by ultra-freeze. Lett. Appl. Microbiol. 1986; 3:127–9.
14. Helgason E., Tourasse N. J., Meisal R., Caugant D. A., Kolsto A. Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. Appl. Environ. Microbiol. 2004; 70:191–01.
15. http://www.dsmz.de/identification/main.php?menu_id=2 (методы идентификации различных культур в коллекции DSMZ).
16. http://www.dsmz.de/microorganisms/bacteria_catalogue.php (Каталог бактериальных штаммов Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур DSMZ)
17. <http://www.genetika.ru/vkpm/index.htm> (сайт Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов)
18. <http://www.hpacultures.org.uk/products/bacteria/search.jsp> (Каталог бактериальных штаммов Национальной коллекции типовых культур NCTC)
19. <http://www.hpacultures.org.uk/services/celllineidentity-verification/celllineidentityverification.jsp> (методы идентификации и верификации микроорганизмов в коллекции NCTC).
20. <http://www.lgcstandards-atcc.org/ATCCScience/CollectionsResearchandDevelopment/Microbiology/tabid/1259/Default.aspx> (сайт ATCC, работы, проводимые в микробиологической коллекции).
21. <http://www.sevin.ru/collections/microcoll/consolidated.html> (Объединенный каталог Российских коллекций немедицинского профиля)
22. <http://www.vkm.ru> (сайт Всероссийской коллекции микроорганизмов).
23. Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology. 2003; 46:205–29.
24. Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K.L., Schupp J.M., Okinaka R. et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. 2000; 182:2928–36.
25. Kingston J.J., Tuteja U., Kapil M., Murali H.S., Batra H.V. Genotyping of Indian *Yersinia pestis* strains by MLVA and repetitive DNA sequence based PCRs. Antonie van Leeuwenhoek. 2009; 96:303–12.
26. Le Flèche P., Jacques I., Grayon M., Al Dahouk S., Bouchon P., Denoed F. et al. Evaluation and selection of tandem repeat loci for a *Brucella* MLVA typing assay. BMC Microbiol. 2006; 6:1–14.
27. Mohapatra S.S., Ramachandran D., Mantri C.K., Colwell R.R., Singh D.V. Determination of relationships among non-toxicogenic *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor strains from housekeeping gene sequences and ribotype patterns. Res. Microbiol. 2009; 160:57–62.
28. Popovic T., Bopp C., Olsvik O., Wachsmuth K. Epidemiologic application of a standardized ribotype scheme for *Vibrio cholerae* O1. J. Clin. Microbiol. 1993; 31:2474–82.
29. Porter J.R. The role of culture collections in the era molecular biology. ATCC 50th Anniversary Symposium, American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1976:62–72.
30. Scholz H.C., Hubálek Z., Sedláček I., Vergnaud G., Tomaso H., Al Dahouk S. et al. *Brucella microti* sp. nov., isolated from the common vole *Microtus arvalis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008; 58:375–82.
31. Seeliger H.P.R. The Medical Culture Collection. Impact of science on society. 1990; 158:167–74.
32. Svensson K., Larsson P., Johansson D., Bystrom M., Forsman M., Johansson A. Evolution of subspecies of *Francisella tularensis*. J. Bacteriol. 2005; 187:3903–8.
33. Traeger M.S., Wiersma S.T., Rosenstein N.E., Malecki J.M., Shepard C.W., Raghunathan P.L. et al. First case of bioterrorism-related inhalational anthrax in the United States, Palm Beach County, Florida, 2001. Emerg. Infect. Dis. 2002; 8:1029–34.
34. Tsunematsu Y. Japanese Federation of Culture Collections. Proc. Int. Conference on Culture Collections. 1970:79–83.
35. *Vibrio cholerae*: Genomics and Molecular Biology. Edited by: Faruque S.M., Nair G.B. Norfolk, UK: Caster Academic Press; 2008. 220 p.

G.G.Onishenko, V.V.Kutyrev, A.V.Toporkov, A.V.Ossin

Current State of Collection Activity Relative to the Use of Infectious Agents of I–II Pathogenicity Groups

Federal Service of Surveillance in the Sphere of Consumer's Rights Protection and Human Welfare, Moscow;
Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov.

Subject of present survey is the regulatory background specifying collection activity relative to the use of infectious agents of I–II pathogenicity group. Revised are the preferred activities which are to be realized by the leading collections of pathogenic microorganisms. Suggested are promising approaches for the improvement of the work of collection centers that are to be solved at the modern organizational, legal, technical and scientific-methodological level.

Key words: collections of pathogenic microorganisms, strains of microorganisms, storage technology, taxonomy, molecular biology, passportization of strains, catalogues of microorganisms.

Об авторах:

Онищенко Г.Г. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Москва.
Кутырев В.В., Топорков А.В., Осин А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Onishenko G.G. Federal Service for Supervision in the Sphere of Consumer's Rights Protection and Human Welfare. Moscow.
Kutyrev V.V., Toporkov A.V., Ossin A.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 27.01.10.

И.В.Грачева, О.П.Плотников, А.В.Осин

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОЦЕДУРЫ ДЕПОНИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ В КОЛЛЕКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ*ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

В работе рассмотрены основные формы депонирования микроорганизмов в коллекционных центрах и регламентирующие их нормативно-методические документы. Обсуждаются некоторые проблемы, возникающие в контексте депонирования патогенных бактерий в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» ФГУЗ «РосНИПЧИ «Микроб», практика их решения, основанная на действующих документах и проекте Правил по порядку и условиям депонирования микроорганизмов для целей национальной патентной процедуры, разработанной Федеральным институтом промышленной собственности.

Ключевые слова: депонирование, микроорганизмы, уполномоченная коллекция, микробиологическое изобретение.

Практика депонирования микроорганизмов в коллекционных центрах получила признание во всем мире. Под депонированием понимают передачу в коллекцию микроорганизмов для регистрации, хранения и выдачи их образцов. Целью депонирования является сохранение в признанных коллекциях наиболее ценных штаммов микроорганизмов, выделенных из природных источников или созданных исследователями в процессе научной деятельности, для обеспечения их доступности научному сообществу при соблюдении прав депозиторов.

Формы депонирования микроорганизмов. В соответствии со сложившейся практикой коллекции осуществляют депонирование по трем основным формам – депонирование для открытого доступа или хранение (public deposit), сохранное депонирование или гарантированное хранение (safe deposit), патентное депонирование (patent deposit) [10, 13, 15, 16]. От формы депонирования зависят правила обращения с депозитами, в первую очередь, правила выдачи образцов и информации о них третьим лицам.

Депонирование для открытого доступа рассматривается как услуга депозитора научному сообществу. Депозитор передает в коллекцию штаммы, выделенные из природных источников, либо полученные в лабораторных условиях, для свободного использования в исследовательских или иных видах микробиологической деятельности, получая при этом, как правило, льготное право на приобретение других штаммов из коллекции. Коллекция выполняет роль посредника в передаче штаммов от депозитора научному сообществу, принимая на себя обязательства за сохранение не только жизнеспособности микроорганизмов, как в случае других видов депонирования, но и аутентичности свойств. Данный вид депонирования является одним из источников формирования общедоступных коллекционных фондов сервисных коллекций. Международный кодекс номенклатуры бактерий обязывает исследователей, описавших но-

вые виды или подвиды микроорганизмов, передавать типовые и референтные штаммы в признанные коллекции культур, чтобы сделать их доступными для всех заинтересованных лиц. В случае депонирования для открытого доступа коллекции самостоятельно разрабатывают правила и критерии, предъявляемые к депозитам, принимают решение о целесообразности депонирования новых штаммов согласно своему профилю, статусу, техническим возможностям, направлению собственных научных исследований. Критерии приема штаммов на рассматриваемый вид депонирования в некоторые сервисные европейские коллекции приведены в таблице.

Если исследователю необходимо сохранить штамм и при этом полностью ограничить доступ к нему третьих лиц, выбирается форма сохранного депонирования. Микроорганизмы, принимаемые на сохранное или патентное депонирование, могут не отвечать критериям, предъявляемым к доступным депозитам, и должны соответствовать только типу специализации коллекции. Данный вид депонирования осуществляется на период, оговоренный двухсторонним соглашением, на коммерческой основе. Коллекция не имеет права распоряжения штаммом без разрешения депозитора, сохраняет конфиденциальность информации о факте депонирования и принимает на себя обязательства только за поддержание жизнеспособности и чистоты сохраняемой культуры.

Третья форма депонирования – патентное депонирование, как следует из названия, тесно связана с процедурой получения патента на изобретение, предметом которого является микроорганизм. Требование раскрытия сущности изобретения с полнотой, достаточной для его воспроизведения специалистами в данной области, заложены в патентные законодательства многих стран. Для выполнения этого требования в отношении микробиологических изобретений был создан институт патентного depo-

Критерии, предъявляемые к депозитам для открытого доступа, в зарубежных коллекциях культур [16]

Belgian coordinated collections of microorganisms (BCCM) (Бельгия)	Centraal bureau voor schimmelcultures (CBS) (Нидерланды)	Deutsche sammlung von mikroorganismen und zellkulturen (DSMZ) (Германия)
1. Бактерии 1-й и 2-й групп риска по Европейской системе классификации	1. Таксон не представлен в коллекции, либо представлен единственным штаммом, либо материал, сохраняемый в коллекции, больше не считается типичным	1. Все виды микроорганизмов, кроме принадлежащих к 3-й группе риска по Европейской системе классификации
2. Грибы 1-й группы риска, имеющие значение для биомедицины, окружающей среды, сельского хозяйства, промышленности.	2. Штамм может рассматриваться как референтный, по мнению таксономической рабочей группы, по данным влиятельной статьи либо тестовых процедур (контроль качества, тесты на чувствительность к антибиотикам)	2. Генетически модифицированные организмы принимаются, если с ними можно работать с уровнями безопасности 1 и 2 по классификации Директивы от 23.04.1990 г. о безопасности использования ГМО
3. Типовые и референтные штаммы	3. Штамм был использован в важных таксономических, биомедицинских или биотехнологических исследованиях	3. Депонируемые штаммы должны использоваться в работе, которая уже опубликована или готовится к печати
4. Штаммы, используемые в национальных и международных процедурах контроля (например, референт-штаммы для контроля качества или определения чувствительности к антибиотикам)	4. Штамм имеет экономическое значение	4. К депозиту должна прилагаться информация, достаточная для определения риска
5. Штаммы, используемые в важных исследовательских проектах	5. Штамм был выделен из интересного географического источника или экологической ниши	
6. Плазмиды 1-й и 2-й категорий по классификации Консультативного комитета по генетическим манипуляциям Великобритании	6. Штамм важен для текущих научных исследований CBS	
	7. К культуре штамма должна прилагаться достаточная и надлежащая информация	

нирования микроорганизмов в коллекциях культур. Факт депонирования подтверждает существование жизнеспособной культуры микроорганизма, а обязательства, которые принимает на себя депонирующая коллекция, гарантируют доступность штамма и возможность осуществления связанного с ним изобретения третьими лицами.

Первое депонирование штамма микроорганизма в связи с регистрацией изобретения микробиологического характера было проведено в 1949 г. В Сельскохозяйственной коллекции культур для исследовательских целей был депонирован штамм *Streptomyces aureofaciens* Duggar A-377 – продуцент антибиотика хлортетрациклина. В настоящее время патентные законодательства большинства стран мира предусматривают перед регистрацией изобретений, связанных с микроорганизмами, депонирование последних в уполномоченной коллекции, как механизм передачи обществу микробиологического изобретения [1, 2, 12, 17].

Согласно национальным правилам, депонированию в уполномоченной коллекции подлежат микроорганизмы, под которыми понимают биологические организмы микроскопических размеров, в частности, бактерии, вирусы, микроводоросли, микроскопиче-

ские грибы, бактериофаги, консорциумы микроорганизмов, а также клеточные линии [1]. В последнее время расширяется перечень биологических объектов, на которые может быть получен охраненный документ. Кроме общепринятых объектов изобретений, патентная охрана предоставляется нуклеотидным последовательностям, пептидам, плазмидам, векторам. Поэтому в международных документах, касающихся вопросов патентования биотехнологических изобретений, в частности в Директиве 98/44 Европейского Союза (статья 2.1), вместо термина «микроорганизм», используется термин «биологический материал», под которым понимают любой материал, содержащий генетическую информацию и способный к самовоспроизводству или воспроизводству в биологической системе [7].

Выделяют две основные формы патентного депонирования – международное и национальное. Депонирование по форме «международное» проводится в случае испрашивания патента на биотехнологическое изобретение в нескольких зарубежных странах. Евразийское патентное депонирование является разновидностью международного и проводится, если планируется подача заявки в Евразийское патентное ведомство на получение патента, действующего на территории стран содружества независимых государств.

Патентное депонирование имеют право проводить только специально уполномоченные коллекции. Международное патентное депонирование признается состоявшимся, если проведено в коллекции, определенной в качестве Международного органа по депонированию (далее МОД) Всемирной организацией интеллектуальной собственности [5]. Статус МОД в соответствии с Будапештским Договором к настоящему времени приобрели три коллекции Российской Федерации: Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов (ВКПИМ), Всероссийская коллекция микроорганизмов (ВКМ), Всероссийский научный центр антибиотиков (ВНЦА) [2]. Коллекции, уполномоченные осуществлять национальное патентное депонирование определенных видов биологического материала, устанавливаются государственными органами страны.

Нормативно-методические документы, регламентирующие патентное депонирование микроорганизмов. Основным документом, регламентирующим международное патентное депонирование, является Будапештский договор (далее Договор) о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры и Инструкция к нему. Договор и Инструкция, которые определяют круг обязанностей МОД, меру их ответственности, правила обращения с микроорганизмами, позволяют унифицировать процедуру международного патентного депонирования в уполномоченных коллекциях разных стран [5]. Выполнение статей Инструкции и Договора является обязательным для всех коллекций, имеющих статус МОД.

Однако анализ практической деятельности коллекций со статусом МОД показал, что Инструкция к Договору не регулирует ряд вопросов частного характера, с которыми коллекции сталкиваются в практической работе, и не дает абсолютно точных указаний для всех возможных случаев [3]. Это приводит к тому, что каждая коллекция проводит депонирование по несколько различающимся схемам. В целях гармонизации и унификации международного патентного депонирования был проведен ряд совещаний представителей различных депозитариев под эгидой Всемирной федерации коллекций культур, разработан Практический кодекс (далее Кодекс) для международных органов по депонированию, опубликованный в 1998 г. под редакцией М. Bosscherts [3]. Кодекс не является нормативным документом. Он рекомендован в качестве практического руководства в сложных ситуациях, позволяющего применять для всех МОД сходные принципы и схемы проведения процедуры депонирования.

Учитывая возрастающую роль биотехнологий в промышленном развитии Европейского Союза, Европейским Парламентом и Советом разработана Директива 98/44 ЕС «О правовой охране биотехнологических изобретений» [7]. Основная цель Директивы – скоординированная и эффективная правовая охрана биотехнологических изобретений во всех государствах Евросоюза. Статьи 13, 14 раздела 4 Директивы регулируют депонирование биологического материала, относящегося к заявке на получение европейского патента. Статьи посвящены наиболее спорным вопросам, возникающим в контексте депонирования: о необходимости депонирования, крайней дате на которую должен быть депонирован биологический материал, правила доступа третьих лиц к депозиту.

В СССР депонирование микроорганизмов в определенной коллекции при подаче заявок на изобретение было законодательно закреплено с 1976 г. [11]. Государство установило коллекции-депозитарии, уполномоченные осуществлять депонирование определенных видов микроорганизмов для целей национальной патентной процедуры. В 1990 г. были опубликованы методические рекомендации «Правила депонирования микроорганизмов в связи с патентной процедурой» (далее Правила в редакции 1990 г.), разработанные Комитетом по изобретениям [10]. Основные положения методических рекомендаций в части даты, процедуры первоначального и повторного депонирования, обязательного срока хранения, критериев отказа в приеме на депонирование, соответствуют статьям Инструкции к Договору.

С января 2008 г. нормативно-правовое регулирование в сфере охраны изобретений осуществляется частью 4 Гражданского кодекса Российской Федерации (далее ГК РФ), Административным регламентом по организации приема заявок на изобретения (далее Регламент) [1, 6]. Планируется разработка дополнительных документов для детализации

частных вопросов в данной сфере. Федеральным институтом промышленной собственности проводится ревизия перечня коллекций, уполномоченных осуществлять национальное патентное депонирование разных видов микроорганизмов, подготовлен проект Правил по порядку и условиям депонирования микроорганизмов для целей национальной патентной процедуры [14]. Цель документа, во-первых унификация правил патентного депонирования во всех уполномоченных коллекциях Российской Федерации, во-вторых, приведение их в соответствие с действующими документами.

Депонирование патогенных бактерий в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб». Государственная коллекция патогенных бактерий «Микроб» (ГКПБ «М»), существующая с 1955 г., проводит депонирование патогенных бактерий I–IV групп с 1976 г. по двум формам: авторское и охраноспособное депонирование [9]. Депонированию в качестве авторских подлежат штаммы «с выявленными или наделенными новыми свойствами, имеющие научно-практическое или теоретическое значение, заслуживающие освещения в печати, но не представляющие предмет изобретения» [9]. Авторское депонирование является одной из форм внедрения исследователем в практику результатов научных разработок. Депонирование проводится с правом выдачи образцов штаммов третьим лицам, поэтому оно может рассматриваться аналогом депонирования для открытого доступа. Решение о приеме или отказе в депонировании новых штаммов принимает Постоянно действующая экспертная комиссия. Через 10 лет хранения штамма на основании анализа спроса коллекция имеет право решать вопрос о его перспективности и целесообразности дальнейшего хранения [9].

ГКПБ «М» вошла в список коллекций Российской Федерации, уполномоченных осуществлять депонирование определенных видов микроорганизмов для целей национальной патентной процедуры [8,14]. Приказом руководителя федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 88 от 17.03.2008 г. она определена в качестве национальной коллекции с правом охраноспособного депонирования всех патогенов I–II групп бактериальной природы по национальной системе классификации.

При разработке первых методических рекомендаций по депонированию патогенных бактерий были приняты во внимание основные положения Инструкции к Договору, ввиду отсутствия национальных документов, регулирующих депонирование микроорганизмов. На современном этапе представляется закономерным и необходимым переработка нормативно-методической базы, регулиющей депонирование штаммов патогенных бактерий в коллекции, с учетом накопленного опыта, приведение ее в соответствие с ГК РФ, Регламентом и проектом Правил. В практической работе по depo-

нированию коллекция сталкивается с вопросами, которые детально не проработаны в существующих нормативно-методических документах и по которым, в отсутствие четких норм, могут приниматься разные решения. Поэтому разработке новых правил должно предшествовать обсуждение проблемных вопросов, возникающих в контексте депонирования, в первую очередь патентного, принципиальные положения которого регулируются на национальном уровне, и возможных вариантов их решения. К наиболее проблемным в деятельности нашей коллекции относятся вопросы, связанные с целесообразностью депонирования вновь поступающих штаммов и условиями выдачи образцов депозитов третьим лицам.

Целесообразность депонирования штаммов микроорганизмов в коллекционных центрах. Необходимость существования практики депонирования микроорганизмов в коллекциях культур не подвергается сомнениям. Решение о целесообразности депонирования нового штамма для открытого доступа или авторском депонировании принимает коллекция, исходя из критериев, предъявляемых к депозитам, стоящих перед коллекцией задач, направления научных исследований и потребности в штамме обслуживаемого круга лиц.

В случае патентного депонирования коллекция не наделена правом решать вопрос об охраноспособности микроорганизма, относящегося к изобретению, и необходимости его депонирования. Данный вопрос входит в область компетенции патентного ведомства. Международные и национальные документы однозначно обязывают коллекцию, получившую статус уполномоченного депозитария, принять на патентное депонирование любой штамм, соответствующий ее профилю, и быть доступной для всех на равных условиях [5, 12]. Определены ситуации, когда депозитарий имеет право отказать в приеме штамма на патентное депонирование: а) депозит не соответствует типу депонируемых в данном депозитарии микроорганизмов; б) свойства микроорганизма настолько исключительны, что депозитарий технически не способен выполнить свои обязанности по поддержанию образцов; в) микроорганизм получен в нежизнеспособном состоянии; г) при контаминации предоставленных образцов; д) не предоставлены все документы, предусмотренные правилами (правило 6.4 Инструкции к Договору, п. 5.5 проекта Правил).

Поэтому решение о депонировании штамма в связи с подачей заявки на получение патента всегда принимает автор изобретения. При принятии решения он должен руководствоваться принципом целесообразности, который заложен в документы, имеющие отношение к депонированию биологического материала.

Так, согласно п. 1 статьи 13 Директивы ЕС 98/44, «если изобретение предусматривает использование или касается биологического материала, не доступного для широкой публики, и который не может быть описан в заявке на патент таким образом, чтобы это

изобретение могло быть воспроизведено специалистом в данной области техники, то описание считается неадекватным для целей патентного закона за исключением случаев, когда биологический материал был депонирован не позднее даты, на которую заявка на патент была подана в признанный депозитарный институт» [8].

Принцип целесообразности депонирования микроорганизмов заложен и в национальные нормативные документы. В пункте 10.3 Регламента указывается, что «к заявке на изобретение, относящееся к штамму микроорганизма, линии клеток растений или животных либо к средству с использованием неизвестных штаммов микроорганизма или линии клеток, содержащей указание на их депонирование в уполномоченной на это коллекции микроорганизмов, прилагается документ о депонировании» [1]. Толкования термина «неизвестные» не приводится, но под ним, вероятно, понимаются штаммы неизвестные и недоступные для специалистов в данной области. Согласно статье L.612-5 Кодекса по интеллектуальной собственности Франции «если изобретение касается использования микроорганизма, который не является общедоступным, то описание изобретения не будет считаться раскрывающим изобретение настолько, чтобы позволить осуществить его, за исключением, если культура микроорганизма не была депонирована в уполномоченном для депонирования учреждении» [4].

Правила в редакции 1990 г. предусматривали несколько конкретных ситуаций, когда депонирование штамма микроорганизма не являлось необходимым и обязательным [11]. Так п. 1.6 гласит, что патентное депонирование нецелесообразно в отношении типовых, неотиповых, референтных или иных штаммов, которые могут быть без ограничения получены заинтересованными лицами, ввиду их широкого распространения в микробиологической практике. В качестве критерия доступности штамма указывается наличие его не менее чем в двух коллекциях Российской Федерации, одна из которых уполномоченная. Поскольку такие штаммы могут быть без ограничений (за исключением ограничений по выдаче патогенных микроорганизмов) получены третьими лицами, то необходимости в закладке на хранение культуры такого штамма нет и депонирование в этом случае теряет свой изначальный смысл – сделать штамм, являющийся собственностью автора, доступным научному сообществу, поместив его в признанную коллекцию.

Когда депонируется генетически измененный штамм, депозит, как правило, является собственностью автора, поскольку получен им в ходе выполнения определенных исследований и поэтому неизвестен и недоступен для общества. Часто получение штамма является следствием ряда случайных событий (мутагенеза, селекции) и поэтому трудно воспроизводимо. Если изобретение связано конкретно с таким штаммом, а он является собственностью ав-

тора, то депонирование, безусловно, целесообразно и необходимо за одним исключением. В Регламент введен пункт, согласно которому в отношении рекомбинантных штаммов, которые могут быть сконструированы генно-инженерными методами на основании сведений, приведенных в описании изобретения, депонирование не является обязательным (факультативное) [1].

Природный штамм микроорганизма, т.е. выделенный из окружающей природной среды, может являться предметом патента, если отвечает критериям охраноспособности: новизне, изобретательскому уровню и промышленной применимости [6, 7].

Наша практика показывает, что исследователь, выявив природные штаммы, которые соответствуют требованиям к патентоспособным изобретениям или критериям к авторским депозитам, передает в коллекцию на депонирование их образцы, не учитывая наличие штамма в общедоступном фонде коллекции и распространенность в микробиологической практике. Следствием этого является закладывание на хранение образцов штаммов, уже имеющих в коллекционном фонде, и регистрация их под новыми номерами. Ревизия коллекции показала, что более 44 % депонированных штаммов имеются в общедоступном фонде.

Распространенность обсуждаемой ситуации в нашей коллекции, безусловно, связана с особенностями обращения бактерий, высокопатогенных для человека, которое регулируется санитарными правилами СП 1.2.036-95, специальными приказами, распоряжениями. В соответствии с этими особенностями исследователь, как правило, получает штаммы для работы из общедоступного фонда специализированных коллекций, в том числе и уполномоченной проводить патентное депонирование. Фонд специализированных коллекций высокопатогенных микроорганизмов формируется главным образом за счет штаммов, выделенных при диагностических исследованиях, поступивших на идентификацию, полученных из других коллекций на основании обмена или покупки.

К дублированию штамма и регистрации его в коллекции более чем под одним номером приводит депонирование штамма дважды, не связанное с процедурой повторного депонирования [5, 11]. Может быть выявлена новая область применения или неизвестные свойства у ранее депонированного штамма. Поскольку в требованиях к новым депозитам нет критерия – отсутствие штамма в коллекции, вновь поступающие образцы регистрируются под новым номером и закладываются на хранение.

Строго говоря, в обсуждаемой ситуации, в первую очередь при авторском депонировании, депонируется не новый штамм, а новая информация о штамме, поддерживаемом в коллекции, и области его применения. Депонирование штаммов, уже имеющих в коллекции, регистрация одного штамма под несколькими номерами приводит, на наш взгляд, к не

рациональному использованию коллекции как хранилища микробиологических ресурсов.

Введение пошлин за услуги по патентному депонированию, которое сегодня проводится без финансовых затрат для депозиторов, безусловно, повысило бы их ответственность при решении вопроса о целесообразности депонирования и частично способствовало урегулированию проблемы.

Правила выдачи штаммов, депонированных по форме «патентное» третьим лицам. Наиболее проблемными традиционно являются вопросы, связанные с правилами выдачи образцов депозитов и информации о них третьей стороне, поскольку депозиторы, как правило, с трудом соглашаются на выдачу своих штаммов. Эти вопросы решаются неодинаково при разных формах патентного депонирования. В случае международного патентного депонирования коллекции обязаны выдавать образцы депозитов в строгом соответствии с правилом 11 Инструкции к Договору. Правила выдачи штаммов, депонированных по форме «национальное», могут иметь свои особенности. В любом случае, правила доступа к депозитам всегда ставятся в зависимость от этапа патентной процедуры [5, 7, 10, 11, 13].

До подачи заявки на получение патента на изобретение, относящееся к депонированному биологическому материалу, образцы могут быть выданы только депозитору или по его письменному разрешению. После подачи заявки и до первой ее публикации образец микроорганизма дополнительно может быть выдан ведомству промышленной собственности, в которое подана заявка на патент, содержащая ссылку на депонирование микроорганизма, при условии его использования исключительно для целей патентной процедуры. В период между публикацией заявки и выдачей патента, несмотря на временную охрану изобретения, микроорганизмы, как правило, не выдаются третьим лицам. Однако, согласно Директиве 98/44 ЕС, биологический материал, депонированный в связи с получением европейского патента, на этом этапе уже может быть выдан любому, кто об этом просит, при определенных условиях [7]. Под определенными условиями понимается принятие получателем штамма обязательств в течение срока, когда патент, относящийся к депозиту, остается в силе в государствах-участниках Европейской патентной конвенции, использовать его исключительно для целей эксперимента и не передавать третьим лицам, о чем заявляется в ходатайстве. Ходатайство заинтересованного лица направляется в Европейское патентное ведомство (далее ЕПВ), которое подтверждает факт подачи заявки на патент и право ходатайствующего лица на доступ к этому материалу. ЕПВ направляет заверенную копию ходатайства в учреждение по депонированию, которое выдает образец штамма. Вместе с тем Директива дает возможность изобретателю ограничить доступ к биологическому материалу на этом этапе и передавать его только через независимого эксперта [7].

После выдачи патента на изобретение, относящийся к нему биологический материал может быть выдан любому, кто об этом ходатайствует, но либо по разрешению ведомства промышленной собственности, в которое подана заявка на патент, либо по разрешению депозитора, при соблюдении запрашивающей стороной вышеуказанных условий. В первом случае патентное ведомство удостоверяет депозитарий, что ходатайствующее лицо имеет право на получение образца микроорганизма в соответствии с законодательством, регулирующим патентную процедуру в данном ведомстве [4,5].

Директива ЕС 98/44 дает депозитору право ограничить доступ к депонированному материалу в течение 20 лет от даты подачи заявки на европейский патент, в случаях получения отказа или отзыва последней [7]. Такая норма представляется оправданной, поскольку после депонирования согласно Договору депозит не подлежит отзыву из уполномоченной коллекции в течение обязательного срока хранения [3, 11].

После прекращения действия патента изобретение попадает в общественную сферу. Что касается биологического материала, относящегося к патенту, то доступ разрешен любому, кто об этом ходатайствует и никакие ограничения в отношении доступа к депозиту, в том числе и использование его в коммерческих целях, не могут действовать [7]. После окончания обязательного периода хранения депозитарий, по согласованию с депозитом, обеспечивает либо уничтожение материала, либо возвращение его депозитору, либо переводит его в разряд общедоступных. В случае отсутствия соглашения с депозитом коллекция использует третий вариант [3].

Правилам выдачи образцов микроорганизмов, депонированных по форме «патентное», посвящен раздел 7 проекта Правил. В соответствии с ним в период действия патента образцы депозитов могут быть выданы третьим лицам только по письменному разрешению депозитора, независимо от цели их использования, при соблюдении третьими лицами ст. 1358 и 1359 ГК РФ. Вместе с тем в проекте Правил недостаточно четко определены полномочия депозитария в части доступа третьих лиц к депозитам, относящимся к патентам, действие которых прекращено досрочно. Согласно ГК РФ срок действия патента на изобретение ограничен во времени и составляет 20 лет, при условии его поддержания [6]. Действие патента может быть прекращено досрочно, например, в случае неуплаты ежегодной пошлины за поддержание.

Анализ коллекционного фонда ГКПБ «М» показывает, что в настоящее время поддерживается менее 5 % патентов, относящихся к штаммам, депонированным по форме «охраноспособное». Важность данного вопроса и реальная ситуация, складывающаяся при патентном депонировании в коллекции, когда действие исключительного права патентообладателя на распоряжение изобретением в большинстве случаев прекращается через 3–5 лет после выдачи патента по причине неуплаты пошлины, требуют детализации

правил выдачи образцов депонированного материала. При этом необходимо учитывать два обстоятельства. Во-первых, предоставление ГК РФ возможности восстановления патента. Во-вторых, стимулирование ГК РФ активного использования третьими лицами изобретений, патент на которые не поддерживается в соответствии с законодательством.

Согласно проекту Правил, уполномоченная коллекция прекращает выполнение своих обязательств в отношении депозитов после истечения срока действия патента (вероятно, и досрочного). При этом не указывается какие это обязательства – ограничения на выдачу, сохранение депозита в течение определенного периода хранения. На наш взгляд, после прекращения действия исключительного права патентообладателя на распоряжение изобретением, должны меняться и правила выдачи связанных с ним депозитов заинтересованным лицам. В тоже время коллекция должна продолжать выполнение обязательства по сохранению штамма, депонированного в связи с получением патента, в течение обязательного периода хранения.

Что касается обязательного периода хранения депозита, то в соответствии с разделом 2 проекта Правил он определен как срок действия патента. Согласно Инструкции к Договору (правило 9.1) и Правилам в редакции 1990 г. (п. 2.2) он составляет не менее 5 лет после последней выдачи образцов и в любом случае не менее 30 лет, считая от даты депонирования. На наш взгляд, норма сохранения депозитов в течение определенного периода после окончания действия патента является приемлемой и в случае национального патентного депонирования, поскольку обеспечивает практическую реализацию статьи 1364 ГК РФ.

Полностью прекратить свои обязанности в отношении депозитов, т.е. аннулировать патентное депонирование, коллекция имеет право только если депозитор в течение определенного срока не подал заявку на изобретение, относящееся к депонированному материалу. Новый проект Правил предоставляет коллекции право самостоятельно устанавливать такой срок.

В практической деятельности уполномоченные коллекции сталкиваются и с другими ситуациями, по которым могут приниматься разные варианты решений, при отсутствии установленных правил. Нормирование патентного депонирования на национальном уровне, разработка руководящих принципов для решения спорных ситуаций, во-первых, позволит коллекциям-депозитариям сформировать свою нормативную базу, полностью адекватную национальному патентному законодательству, во-вторых, применять коллекциями при решении спорных ситуаций сходные принципы, и в целом унифицировать данную процедуру во всех уполномоченных коллекциях Российской Федерации. Нормативно-методическая база патентного депонирования должна защищать, с одной стороны, имущественные и авторские инте-

рессы депозитора, с другой – способствовать рациональному использованию коллекций как хранилищ микроорганизмов и более эффективному использованию коллекционных фондов для фундаментальных и прикладных научных исследований. Актуальность этой проблемы повышается на современном этапе в связи с увеличением количества патентов в области генетической инженерии и медицинской биотехнологии в целом, связанных с производством диагностических и профилактических препаратов.

Выражаем благодарность главному специалисту ФГУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Белозерцевой О.Г. за обсуждение нашей работы и высказанные критические замечания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Административный регламент по организации приема заявок на изобретение. Утвержден приказом № 327 Министерства образования и науки Российской Федерации от 29 октября 2008 г.
2. Бобровски Й. Раскрытие сущности объектов биотехнологии, Будапештское соглашение и последовательности ДНК. В кн.: Биотехнология и патенты. Москва; 2001. С. 34–57.
3. Босхертс М., редактор. Будапештский договор: практический кодекс для международных органов по депонированию. Бельгия, 1998. Микробиология. 1999; 3:423–30.
4. Буве Ф., Федорова В., Угрюмов В. Сравнительный доклад по патентоспособности биотехнологических и фармацевтических изобретений во Франции и России. <http://www.chernogolovka.org/comparereport-ru.doc/>
5. Будапештский договор о международном признании депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры. Инструкция от 31.01.1981. Официальный русский текст. ВОИС. Женева; 1982. 53 с.
6. Гражданский кодекс Российской Федерации, часть 4.
7. Директива 98/44/ЕС Европейского парламента и Совета от 6 июля 1996 г. о правовой охране биотехнологических изобретений. В кн.: Биотехнология и патенты. М.; 2001. С. 159–69.
8. Коллекции, уполномоченные осуществлять депонирование микроорганизмов. Пробл. промышленной собственности. 1997; 6:137–9.
9. Методические указания по депонированию охраноспособных и авторских штаммов возбудителей особо опасных инфекций в коллекции живых культур института «Микроб». Саратов; 1984. 20 с.
10. Правила депонирования штаммов микроорганизмов во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов. Биотехнология. 2001; 5:82–9.
11. Рыбальский Н.Г., редактор. Правила депонирования микроорганизмов при подаче заявок на изобретения. Объекты биологии и биотехнологии. Методические рекомендации по правовой охране. М.; 1990. С. 263–82.
12. Рыбальский Н.Г., Вассер С.П., Дудка И.А. Патентоспособность биологических объектов. Киев: Наукова Думка; 1988. 323 с.
13. Синецкий С.П., Агранович А.М. Депонирование штаммов микроорганизмов во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов. Биотехнология. 2001; 5:75–81.
14. Уткина Е., Гаврилова Е., Скородумова О. Депонирование штаммов микроорганизмов для целей национальной патентной процедуры и предоставление к ним доступа третьим лицам. Интеллектуальная собственность. Промышленная собственность. 2008; 10:17–23.
15. Сайт Американской коллекции типовых культур ATCC. <http://www.lgcstandards-atcc.org/>
16. Сайт объединения европейских коллекций CABRI. <http://www.cabri.org/>
17. Sekar S., Kandavel D. The future of patent deposition of microorganisms. Trends in biotechnology. 2004; 22:213–8.

I.V.Gracheva, O.P.Plotnikov, A.V.Ossin

Current State of Microorganisms Depositing Procedure in Collection Centers

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Main forms of microorganisms depositing procedures in collection centers and normative and methodical documents that regulate them are considered in the paper. Discussed are some problems arising in the context of pathogenic microorganisms depositing in the "Microbe" State Collection of Pathogenic Bacteria of the RARI "Microbe", the practice of their solving, based on the documents in force and Draft Guidelines on the order and conditions of microorganisms depositing for the purpose of the national patent procedure developed by the Federal Institute for Industrial Property.

Key words: depositing, microorganisms, authorized collection, microbiological invention.

Об авторах:

Грачева И.В., Плотников О.П., Осин А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Gracheva I.V., Plotnikov O.P., Ossin A.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 29.10.09.

Н.Е.Терешкина, Е.А.Михеева, З.Л.Девдариани, А.К.Адамов, Г.В.Григорьева

ИММУНОДИАГНОСТИКА ХОЛЕРЫ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Представлен обзор отечественной и зарубежной литературы, посвященный вопросам совершенствования иммунодиагностики холеры. Рассмотрены проблемы и перспективы конструирования различных препаратов, предназначенных для обнаружения холерных вибрионов и серологической диагностики заболевания.

Ключевые слова: холера, *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio cholerae* O139, иммунодиагностика, серодиагностика, иммунодиагностические препараты.

Холера – тяжелая острая инфекционная болезнь, вызываемая токсигенными штаммами холерного вибриона O1 и O139 серогрупп [19, 22, 34, 42]. В условиях продолжающейся седьмой пандемии холеры активные миграционные процессы и существование современных высокоскоростных транспортных средств создают постоянную угрозу заноса инфекции в любую точку земного шара в кратчайшие сроки. Противоэпидемические мероприятия по недопущению распространения этой особо опасной инфекции во многом зависят от того, насколько быстрые и точные методы используются для обнаружения холерного вибриона. Поэтому сохраняется актуальность совершенствования имеющихся и разработки новых средств лабораторной диагностики холеры и, в частности, иммунодиагностики как одного из наиболее технически простых и экспрессных методов детекции бактериальных патогенов.

Иммунодиагностика холеры включает в себя комплекс иммунологических реакций, различающихся по регистрируемому эффекту и технике постановки, основанных на взаимодействии специфических антигенов холерного вибриона и гомологичных антител [3, 42]. Иммунологические методы диагностики холеры используются как в рамках бактериологического исследования (ускоренные методы обнаружения возбудителя и идентификации культур) [3, 14, 42], так и самостоятельно – для индикации холерного вибриона в материале, зараженном этим возбудителем [31, 47], и при проведении серологических исследований с целью ретроспективного выявления переболевших и вибрионосителей, а также оценки эффективности вакцинопрофилактики [3, 14, 20, 42, 48, 55].

Как известно, все представители вида *Vibrio cholerae* имеют сходные культурально-морфологические и биохимические свойства, но отличаются структурой липополисахарида (ЛПС), а именно его О-полисахаридных цепей (О-антигена), определяющей серологическую специфичность вибрионов [34, 42]. Поскольку к возбудителям холеры относят *V. cholerae* только двух – O1 и O139 – серогрупп [14, 22, 34, 42], а с вибрионами остальных известных к настоящему времени серогрупп связывают только спорадические случаи диарейных и экстраинтести-

нальных инфекций [34, 42], ключевым диагностическим моментом является определение сероваропринадлежности холерного вибриона, осуществляемое в современных условиях преимущественно с применением иммунологических реакций.

Для определения принадлежности холерных вибрионов к O1 серогруппе наиболее часто применяется реакция агглютинации (РА) на стекле (слайд-агглютинация) или в пробирках (объемная или развернутая РА), а также разные модификации ее постановки микрометодом с использованием как выделенной культуры, так и материала от больного [3, 17, 28, 42]. В сравнении с развернутой РА микрометод менее трудоемок, экономичен и экспрессен [28]. При этом в 92–95 % случаев результаты постановки РА в микрообъемах и в пробирках совпадают [28]. Представляет интерес методика постановки РА микрометодом в полистироловых панелях с применением красителя – щелочного метиленового синего Леффлера, к достоинству которой можно отнести демонстративность и простоту объективного учета [17].

РА была одним из первых методов, предложенных для идентификации холерного вибриона O139, впервые описанного в начале 90-х годов прошлого столетия [19, 22, 34, 42]. В многочисленных исследованиях показана эффективность слайд-агглютинации и объемной РА с серовароспецифической поликлональной сывороткой [12, 16, 27, 52] или МКА [5, 39, 46].

Несмотря на то, что РА представляет собой наиболее простой и широко применяемый метод определения сероваропринадлежности *V. cholerae*, регламентированный методическими указаниями (МУК) по лабораторной диагностике холеры [14], он имеет отдельные недостатки, к которым относятся невысокая чувствительность, субъективность оценки результатов, возможность ложноположительных реакций в случае спонтанной агглютинации или вследствие остаточной перекрестной реактивности при использовании поликлональных адсорбированных сывороток [3]. Кроме того, из объектов внешней среды и от людей нередко выделяются штаммы холерных вибрионов со сниженной агглютинабельностью [3, 42], что не исключает вероятности получения ложноотрицательного результата в РА. Это, в частности, подтверждается результатами экспери-

ментов О.И.Сальниковой с соавт. [21], получившими инагглютинабельные мутанты природных штаммов *V. cholerae* O139, нереакционноспособные в РА, но сохранившие активность в других использованных в работе серологических реакциях.

Другим агглютинационным тестом, используемым для обнаружения холерного вибриона, является реакция коаггутинации (РКоА). Простота постановки, отсутствие необходимости в специальном оборудовании и дорогостоящих материалах, быстрота получения ответа позволяют рекомендовать РКоА в качестве высокочувствительного экспресс-метода определения соматического антигена *V. cholerae* O1 [49]. Антительный коаггулинирующий диагностикум на основе коммерческой холерной O1 сыворотки (Саратов) оказался эффективным для определения содержания О-антигена в надосадочной жидкости холерных вибрионов и контроля чистоты получения препарата энтеротоксина [7]. Хотя РКоА характеризуется большей наглядностью, чем РА, она не лишена других присущих последней недостатков, особенно если для приготовления диагностикума применяют поликлональные иммуноглобулины. Так, коаггулинирующий диагностикум на основе антител, выделенных из поликлональной сыворотки против холерного вибриона O139 серогруппы, был с успехом использован для серологической идентификации возбудителя, но не для его индикации [11]. Моноклональные коаггулинирующие тесты, вследствие большей специфичности использованного иммунореагента, оказались эффективными для быстрого выявления возбудителя в образцах клинического материала и пробах воды, хотя и их чувствительность и специфичность не всегда достигали 100 % [36, 47].

К экспрессным методам иммунодиагностики холеры относится реакция иммобилизации вибрионов (РИВ), которая дает возможность бактериоскопически обнаружить возбудитель в течение нескольких минут при его концентрации не менее $1 \cdot 10^5$ м. кл./мл при исследовании нативного материала или культуры вибрионов [14]. При наличии в образце возбудителей холеры добавление к исследуемой капле О-агглютинирующей холерной сыворотки [14, 19, 42] или МКА [14, 42, 46] вызывает обездвиживание отдельных микробных клеток и образование неподвижных микроагглютинатов немедленно или в течение 1–2 мин [14]. Хотя данный метод, будучи, как и РА, официально рекомендованным МУК «Лабораторная диагностика холеры» [14], отличается быстротой получения результата и позволяет дать первый сигнальный ответ уже через 15–20 мин от начала исследования материала, при его проведении возможны неспецифические взаимодействия, а отрицательный результат в РИВ не исключает диагноза холеры [14].

Эритроцитарные антигенные и антительные препараты давно широко и успешно применяются для диагностики различных бактериальных инфекций, в том числе холеры. Постановка реакции не-

прямой гемагглютинации (РНГА) с использованием диагностикума эритроцитарного холерного иммуноглобулинового предусмотрена действующими методическими указаниями по лабораторной диагностике холеры [14]. Экспериментальный холерный О-иммуноглобулиновый эритроцитарный диагностикум позволяет выявлять в РНГА вибрионы O1 серогруппы серотипов Огава и Инаба в концентрации $1,5 \cdot 10^5$ и $7,5 \cdot 10^5$ м.кл. соответственно, а также гомологичные антитела к ним в реакции нейтрализации антигена (РНАг) [24].

Ряд эритроцитарных диагностикумов предложен и для обнаружения холерных вибрионов O139. На основе лизата, полученного из ацетонвысушенных клеток *V. cholerae* MO45, сконструирован специфичный холерный диагностикум для идентификации чистых культур *V. cholerae* O139 как в РНГА, так и в реакции нейтрализации антител (РНАт) с порогом чувствительности $2,5 \cdot 10^7 - 1,5 \cdot 10^6$ м.к./мл [15]. Следует, однако, отметить, что хотя гемагглютинационные тесты достаточно эффективны, их применение имеет определенные ограничения, поскольку входящие в состав диагностикумов реагенты нестабильны, а по показателю чувствительности они уступают современным иммунодиагностическим методам [13].

Одно из ведущих мест в экспресс-диагностике холеры занимает метод флуоресцирующих антител (МФА). Имеются сообщения об использовании техники флуоресцирующих антител для детекции возбудителя холеры в образцах стула и в пробах воды [30, 42]. Иммунофлуоресцентный метод на основе поликлональных антител к белкам внешней мембраны *V. cholerae* O1 был эффективен при выявлении соответствующего микроорганизма при концентрации 240 КОЕ/мл в образце [35].

Для детекции *V. cholerae* O139 в прямом МФА сконструирован диагностический препарат на основе поликлональных адсорбированных кроличьих иммуноглобулинов к О-антигену холерного вибриона гомологичной серогруппы [2]. Продемонстрирована также высокая чувствительность и специфичность моноклональных иммунофлуоресцентных препаратов как при идентификации чистых культур *V. cholerae* O139, так и индикации возбудителя в различном инфицированном материале [4, 36, 46]. Не отрицая безусловной диагностической ценности МФА, необходимо отметить, что при его применении возможны ложноположительные результаты, особенно в случае использования поликлональных флуоресцирующих иммуноглобулинов за счет их кросс-реактивности, обуславливающей неспецифическое свечение посторонней микрофлоры [14], и ложноотрицательные результаты – при наличии в материале атипичных форм *V. cholerae* или концентрации микроорганизмов ниже порога чувствительности анализа.

При обнаружении холерного вибриона хорошо зарекомендовал себя иммуноферментный анализ (ИФА) или ELISA (от англ. enzyme-linked immunosorbent assay) как высокочувствительный, воспроиз-

водимый и наглядный современный иммунодиагностический метод. Детекция *V. cholerae* в различных вариантах ИФА основывается на применении поли- и моноклональных антител к различным антигенам микроорганизма, например, кроличьих иммуноглобулинов к гликопротеину возбудителя холеры [10], белкам внешней мембраны *V. cholerae* O1 Огава, O1 Инаба и *V. cholerae* O139 [43], ЛПС *V. cholerae* O139 [25]. Быстрым и чувствительным способом обнаружения возбудителя в материале от больных представляется дот-ELISA на основе МКА к ЛПС *V. cholerae* O139, однако в единичных случаях были зафиксированы ложноположительные результаты [31]. Использование ИФА является перспективным также и при диагностике глубоко измененных по антигенной структуре штаммов холерных вибрионов [26], а также некультивируемых форм *V. cholerae* [23].

Принцип непрямого сэндвич-ELISA был использован при разработке амперометрического иммуносенсора для быстрой детекции *V. cholerae* O1 на основе высокоспецифичных поликлональных антител [50]. Чувствительность метода составила $1 \cdot 10^5$ м.кл./мл, а продолжительность анализа 55 мин. Сообщается также о конструировании иммуносенсора на основе МКА к *V. cholerae* O1 с чувствительностью $1 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^9$ м.кл./мл [40].

Весьма перспективным методом экспресс-диагностики холеры является применение иммунохроматографических дипстиков [41, 45, 54]. Чувствительность и специфичность данного метода, однако, не всегда удовлетворительны – в зависимости от использованного теста, исследуемого материала и навыков персонала, осуществляющего постановку анализа, они колеблются от 58 и 67 до 95 и 97 % соответственно [41, 54], редко достигая 100 % [45].

Наряду с принадлежностью *V. cholerae* к O1 или O139 серогруппе, маркером эпидемического потенциала холерного вибриона является его токсигенность [19, 34]. В связи с этим, большое внимание уделяется конструированию иммунодиагностикомов для определения холерного токсина (ХТ). В соответствии с принятой схемой лабораторной диагностики холеры заключение о холерогенности *V. cholerae* основывается на результатах внутрикишечного заражения крольчат-сосунков или оценке гемолитической активности и чувствительности к специфическим фагам, а также результатах полимеразной цепной реакции (ПЦР) [14]. Поскольку продолжительность бактериологических анализов составляет не менее 18–20 ч с момента поступления материала на исследование, а применение генодиагностических методов имеет ряд ограничений, продолжают разрабатываться альтернативные способы обнаружения ХТ, обеспечивающие получение результата в более короткий срок. С этой целью создан целый ряд экспериментальных иммунодиагностикомов.

Так, Ю.А.Белой и соавт. [7] предложен антительный коаггулинирующий диагностиком, обнаруживающий очищенный холерный энтеротоксин в растворах

в количестве 1–10 нг/мл. Высокой чувствительностью и специфичностью обладал тест латекс-агглютинации, разработанный R.J.Almeida *et al.* [29].

Оригинальный иммунофлуоресцентный метод с использованием ганглиозид-содержащей DASS-системы (или системы шарообразных субстратов для определения антигенов) и люминесцирующей холерной антитоксической сыворотки оказался весьма эффективным при определении холерогена [8]. С помощью специфических МКА к В-субъединице ХТ методом непрямо́й иммунофлуоресценции удалось обнаружить гомологичный антиген непосредственно на поверхности вибрионов на ранних этапах культивирования [6].

При определении холерогена за рубежом широко применяются методы иммуноферментного анализа [42]. Отечественными учеными на основе МКА к В-субъединице ХТ разработан прямой и сэндвич-вариант ДИА для идентификации токсигенных штаммов *V. cholerae*, обеспечивающие обнаружение ХТ в культуральной жидкости и микробных клетках. Более эффективным оказался сэндвич-вариант ДИА, в котором регистрировалось $2,4 \cdot 10^6 - 4,9 \cdot 10^6$ м.кл./мл, что соответствовало 16 нг/мл ХТ. Длительность анализа составляла не более 1–1,5 ч для сэндвич-варианта и 40–50 мин – для прямого ДИА [9].

S.L.Mousavi *et al.* [44] сообщают об успешной попытке применения сочетанного метода ПЦР-ИФА для выявления токсигенных штаммов *V. cholerae* O1. Предел чувствительности метода составлял 0,5 пг ДНК и 5 бактериальных клеток.

Учеными из Тайваня разработан оригинальный иммуносенсор, основанный на комбинированном использовании GM₁-липосом и антител к ХТ в проточной системе с регистрацией сигнала специфической флуоресценции, позволяющий выявлять $6,6 \cdot 10^{-17}$ г/мл холерного токсина в образцах объемом 200 мкл [37].

Для одновременной детекции токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1, O139, не O1 и не O139 в клинических образцах и образцах воды индийскими учеными предложен дипстик-ELISA на основе поли- и моноклональных антител к двум рекомбинантным белкам – В-субъединице холерного токсина и белку внешней мембраны OmpW [53].

Наряду с индикацией и идентификацией возбудителя, лабораторная диагностика холеры предусматривает проведение серологических исследований по определению в сыворотках больных, переболевших, вибрионосителей и вакцинированных людей специфических антител [14, 20, 42, 48, 55]. Хотя серологической диагностике холеры отводится вспомогательная роль, она остается незаменимой при проведении ретроспективных исследований и в качестве ориентира для проведения дополнительных бактериологических анализов с целью выявления вибрионосителей [14, 19, 42].

Для обнаружения в сыворотке крови антител, обладающих свойствами агглютининов, методически указанными по лабораторной диагностике холеры

рекомендуется постановка развернутой реакции агглютинации, РНГА с диагностикумом эритроцитарным холерным антигенным, РНАг с диагностикумом эритроцитарным холерным иммуноглобулиновым [14]. При этом целесообразно тестировать парные сыворотки, взятые с 7–10-дневным интервалом, поскольку диагностическое значение имеет нарастание специфических титров в 4 и более раз. Результат исследования первой сыворотки является ориентировочным и считается положительным, начиная с титра 1:40 [3, 14, 19]. Быстрое определение противохолерных антител в сыворотке крови можно проводить по методу Н.И.Гивенталь и З.В.Ермольевой с применением фазово-контрастного микроскопа [18].

При проведении серологических исследований применяется также реакция определения вибриоцидных антител, в присутствии которых происходит гибель холерных вибрионов [14, 18, 19]. По данным В.Н.Савельева и соавт. [20], в группе лиц с бактериологически подтвержденным диагнозом холеры или вибрионоительства вибриоцидные антитела выявляются в 100 % случаев, тогда как у лиц, не имеющих отношения к очагу холеры, вибриоцидины не обнаруживались. Для выявления антител, обладающих вибриоцидной активностью, применяют также методики, основанные на ферментации углеводов, в частности, сахарозы [14]. Копроантитела можно обнаружить с использованием непрямого люминесцентно-серологического метода [3].

Антитоксические антитела, которые длительно циркулируют в крови после перенесенной инфекции [14, 19, 42], выявляются в реакции непрямой гемагглютинации с диагностикумом эритроцитарным холерным энтеротоксическим [14], а также по их нейтрализующей активности в отношении энтеротоксина на кроликах [19].

В целом, можно отметить, что существующие способы определения антител, обладающих агглютинирующими и вибриоцидными свойствами, не отличаются экспрессностью, особенно если принимать во внимание необходимость исследования парных сывороток. Кроме того, они предполагают проведение манипуляций с живым инфекционным агентом и обладают всеми недостатками, присущими соответствующим иммунологическим реакциям. Для выявления антитоксических антител также не применяются современные иммунодиагностические методы. Это обуславливает необходимость дальнейшего совершенствования серодиагностики холеры.

Среди оригинальных экспериментальных методик, о которых сообщается в литературе последних лет, следует упомянуть реакцию блокирования теста LAL (*Limulus amoebocyte lysate*), предназначенную для определения сывороточных антител к ЛПС *V. cholerae* O139. Титры в указанной реакции сравнимы с титрами вибриоцидных антител, что делает ее перспективной для серологических исследований [32]. Группа исследователей из Бангладеш в качестве «долгосрочного» маркера иммунного ответа к холере предложила

определять в стандартном дот-ELISA В-клетки памяти, специфичные к холерному токсину [38].

Кроме вибриоцидных антител, в качестве иммунологических маркеров, ассоциированных с холерной инфекцией, зарубежными исследователями предлагается рассматривать сывороточные IgA к В-субъединице холерного токсина, ЛПС и антигену токсин-корегулируемых пилей адгезии TcrA *V. cholerae* O1 [51]. При клиническом изучении иммунного ответа у взрослых и детей в Бангладеш были установлены определенные закономерности в продукции антител к вышеперечисленным антигенам в разных возрастных группах при инфекции и вакцинации [33].

Из вышеизложенного становится очевидным, что, несмотря на более чем столетнюю историю развития методов лабораторной диагностики холеры, проблема ее совершенствования по-прежнему остается в поле внимания исследователей. Хотя в настоящее время предложено большое количество самых разнообразных способов иммуно- и серодиагностики холеры, большая их часть – экспериментальные разработки. В России выпускаются лишь несколько имеющих государственную регистрацию препаратов старого поколения, в частности диагностические холерные адсорбированные сухие сыворотки О, Инаба, Огава, РО и О139, предназначенные для идентификации чистых культур, и иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие холерные адсорбированные, позволяющие выявлять и идентифицировать *V. cholerae* O1 в мазках из различных материалов и чистых культур. Современные высокочувствительные и экспрессные тест-системы, в том числе для ретроспективной диагностики, не внедрены в практику отечественного здравоохранения.

В последние годы все более широкое применение в микробиологии и эпидемиологии находят генодиагностические методы. Однако, несмотря на высокую чувствительность и специфичность, они обладают рядом недостатков, к наиболее значительным из которых следует отнести необходимость использования дорогостоящего оборудования, реактивов и особой организации помещений для проведения анализа, что ограничивает возможность их использования в полевых условиях и в слабо оснащенных лабораториях. Кроме того, в пробах из внешней среды и образцах стула нехолерных больных иногда содержатся примеси, ингибирующие ПЦР [1, 42].

В наибольшей степени требованиям экспрессности, относительно невысокой стоимости, простоты технического исполнения и учета результатов отвечают именно иммунологические методы обнаружения холерного вибриона. Следует особо подчеркнуть, что эффективность последних главным образом зависит от качества используемых специфических иммунореагентов, в связи с чем очевидна необходимость оптимизации технологии их получения. Способствовать решению этой задачи может практическое использование достижений современной фундаментальной иммунологии и молекулярной

иммунобиологии, подразумевающее целенаправленное влияние на иммунный ответ биопродуцента за счет применения расширенной панели антигенов для иммунизации, в частности, изолированных с помощью современных и классических биохимических методов, позволяющих максимально сохранить иммунореактивность специфических эпитопов, выбора оптимальных условий иммунизации, использования биомоделей с определенными свойствами иммунной системы, закрепленными генетически. Несомненна перспективность использования гибридной биотехнологии, позволяющей получать высокоаффинные антитела уникальной специфичности к отдельным антигенным детерминантам диагностически значимых антигенов *V. cholerae*. Применение указанных подходов позволит получить поли- и моноклональные антитела, пригодные для конструирования более совершенных тест-систем для диагностики холеры, включая иммуносенсоры и биочипы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абгарян А.Г., Еременко Е.И., Ефременко В.И., Афанасьев Е.Н., Жарникова И.В. Совершенствование метода индикации возбудителя сибирской язвы. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2003; 6 (Приложение):47–51.
2. Абрамова Е.Г. Разработка биотехнологической схемы получения флуоресцирующих иммуноглобулинов для идентификации холерных вибрионов O139 серогруппы [автореф. дис. ... канд. биол. наук]. Саратов, 2005.
3. Адамов А.К., Наумишина М.С. Холерные вибрионы. Саратов: Изд-во СГУ; 1981. 328 с.
4. Алексеева Л.П., Мазрухо Б.Л., Маркина О.В., Чемисова О.С., Сальникова О.И., Ишина Е.В. Получение диагностически флуоресцирующих моноклональных иммуноглобулинов к *V. cholerae* O139 серовара. Клин. лаб. диагностика. 2002; 12:С. 50–1.
5. Алексеева Л.П., Сальникова О.И., Мазрухо Б.Л., Маркина О.В., Чемисова О.С., Лобанов В.В. Моноклональные антитела к липополисахариду *Vibrio cholerae* O139. Биотехнология. 2002; 2:79–84.
6. Аленкина Т.В., Грачева И.В., Девдариани З.Л. Обнаружение холерного энтеротоксина на поверхности клеток холерного вибриона методом непрямой иммунофлуоресценции. В кн.: Акт. вопр. профилакт. чумы и др. инф. забол. Ставрополь; 1994. С. 117.
7. Белая Ю.А., Гайлонская И.Н., Быстрова С.М., Ферантонтов Г.К. Определение холерного энтеротоксина с помощью реакции коаггутинации. Вестн. Акад. мед. наук СССР. 1984; 10:69–73.
8. Владимцева И.В., Ефременко В.И., Пушкарь В.Г., Голосеев Ю.А., Трофимов Е.Н. Иммунофлюоресцентный метод обнаружения холерного энтеротоксина. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1986; 12:62–5.
9. Девдариани З.Л., Аленкина Т.В., Федорова В.А. Экспресс-диагностика токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* в доиммунологическом анализе с помощью моноклональных антител. Клин. лаб. диагн. 1999; 8:24–33.
10. Ефанова Е.А., Глянько Е.В., Рожков Е.В., Мазрухо Б.Л., Король В.В. Использование гликопротеина возбудителя холеры для получения иммунопероксидазного диагностического препарата. В кн.: Иммунол. и специф. профилакт. особо опасных инф. Саратов; 1993. С. 252.
11. Ишина Е.В. Перспективы использования холерного O139 КоА-диагностикума в системе эпиднадзора за холерой. В кн.: Диагн., лечение и профилакт. инф. забол. Биотехнология. Ветеринария. Екатеринбург; 1999. С. 74.
12. Ишина Е.В., Мазрухо Б.Л., Непомнящая Н.Б. Получение кроличьей агглютинирующей сыворотки с использованием препарата клеточных оболочек холерного вибриона O139 серовара. В кн.: Акт. вопр. профилакт. чумы и др. инф. забол. Ставрополь, 1994. С. 132–3.
13. Каральник Б.В. Эритроцитарные диагностикумы. М.: Медицина; 1976. 164 с.
14. Лабораторная диагностика холеры: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2007. 87 с.
15. Мазрухо Б.Л., Ишина Е.В. Холерный эритроцитарный диагностикум на основе лизата холерных вибрионов O139 серогруппы. В кн.: Матер. науч.-практ. конф., посв. 100-летию образов. противочумн. службы России. Т. 2. Саратов; 1997. С. 193.
16. Мазрухо Б.Л., Ломов Ю.М., Воронезская Л.Г., Иванова Л.В., Адамов А.К., Казакова Е.С., Лукьянова О.И. Сыворотка для идентификации эпидемически опасных холерных вибрионов O139 серовара «Бенгал». В кн.: Акт. пробл. профилакт. особо опасных и природно-очаговых инф. бол. Иркутск, 1994. С. 100.
17. Мусатов Ю.С., Юзвик Л.Н., Парфенов В.Н. Модификация реакции агглютинации при идентификации холерных вибрионов O1 группы. В кн.: Матер. науч.-практ. конф., посв. 100-летию образов. противочумн. службы России. Саратов; 1997. Т. 2. С. 199.
18. Наумов А.В., Ледванов М.Ю., Дроздов И.Г. Иммунология холеры. Саратов: Слово; 1995. 74 с.
19. Нищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: Медицина, Шико; 2009. 472 с.
20. Савельев В.Н., Ефременко В.И., Гнутов И.Н., Киселева Т.Ф., Богданов И.К., Постовой П.П. и др. Оценка теста вибриоцидных антител в постановке диагноза холеры или вибрионосительства. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1992; 11–12:55–7.
21. Сальникова О.И., Лобанов В.В., Маркина О.В., Алексеева Л.П., Мазрухо Б.Л., Аронова Н.В. и др. Изучение измененных по признаку агглютинабельности субкультур *V. cholerae* O139 с помощью различных серологических методов. Холера и патогенные для человека вибрионы. Ростов н/Д; 2002. 15:77–8.
22. Смирнова Н.И. Возбудитель холеры новой O139-серогруппы: молекулярно-генетические особенности и происхождение. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2002; 3:23–33.
23. Соколенко А.В., Алексеева Л.П., Ломов Ю.М., Чемисова О.С. Изучение взаимодействия некультивируемых форм холерных вибрионов с моноклональными антителами к липополисахариду O1 и O139 серогруппы. Биотехнология. 2004; 3:87–92.
24. Тугамбаев Г.И., Ли Е.Е., Сулейменов Б.М., Атчабаров Б.Б. Конструирование эритроцитарного холерного O-иммуноглобулинового диагностикума. В кн.: Иммунол. и специф. профилакт. особо опасных инф. Саратов; 1993. С. 253.
25. Федорова В.А., Громова О.В., Девдариани З.Л. Иммуноферментная тест-система для детекции *Vibrio cholerae* O139 серовара. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1998; 5:77–80.
26. Черепяхина И.Я., Балахнова В.В., Бурлакова О.С., Алексеева Л.П. Использование иммуноферментного анализа и реакции коаггутинации с поликлональными и моноклональными иммуноглобулинами для диагностики атипичных по агглютинабельности штаммов холерных вибрионов. В кн.: Акт. вопр. профилакт. чумы и др. инф. забол. Ставрополь; 1994. С. 148–9.
27. Чеховская Т.В., Щелканова Е.Ю., Смирнова Н.И. Бескапсульные мутанты *Vibrio cholerae* O139 серогруппы: получение, идентификация и использование для приготвления диагностической O139 антисыворотки. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2000; 1:34–7.
28. Шмеркевич Д.Л., Донская Т.Н., Маторина Н.А., Трушева О.С., Миронова Н.П., Вейнблат В.И. и др. Постановка реакции агглютинации микрометодом для идентификации холерных вибрионов. В кн.: Иммунохим. и лаб. диагн. особо опасных инф. Саратов; 1985. С. 83–6.
29. Almeida R.J., Hickman-Brenner F.W., Sowers E.G., Puhrt N.D., Farmer J.J., III, Wachsmuth I.K. Comparison of a latex agglutination assay and an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting cholera toxin. J. Clin. Microbiol. 1990; 28:128–130.
30. Aulet O., Silva C., Fraga S.G., Pichel M., Cangemi R., Gaudioso C. et al. Detection of viable and viable nonculturable *Vibrio cholerae* O1 through cultures and immunofluorescence in the Tucumán rivers, Argentina. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2007; 40(4):385–90.
31. Chaicumpa W., Srimanote P., Sakolvaree Y., Kalampaheti T., Chongsa-Nguan M., Tapchaisri P. et al. Rapid diagnosis of cholera caused by *Vibrio cholerae* O139. J. Clin. Microbiol. 1998; 36:3595–600.
32. Chang H.S., Sack D.A. Detection of anti-lipopolysaccharide antibodies to *Vibrio cholerae* O1 and O139 using a novel microtiter limulus amoebocyte lysate (LAL) assay. Clin. Chem. Acta. 2001; 312:49–54.
33. Chowdhury F., Khan A.I., Harris J.B., LaRocque R.C., Chowdhury M.I., Ryan E.T. et al. A comparison of clinical and immunologic features in children and older patients hospitalized with severe cholera in Bangladesh. Pediatr. Infect. Dis. J. 2008; 27(11):986–92.
34. Faruque S.M., Albert M.J., Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiol. Molecul. Biol. Rev. 1998; 62:1301–14.
35. Goel A.K., Tamrakar A.K., Kamboj D.V., Singh L. Direct immunofluorescence assay for rapid environmental detection of *Vibrio cholerae* O1. Folia Microbiol. (Praha). 2005; 50(5):448–52.
36. Hasan J.A., Huq A., Nair G.B., Garg S., Mukhopadhyay A.K., Loomis L. et al. Development and testing of monoclonal an-

- tibody-based rapid immunodiagnostic test kits for direct detection of *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33:2935–9.
37. Ho J.A., Wu L.C., Huang M.R., Lin Y.J., Baeumner A.J., Durst R.A. Application of ganglioside-sensitized liposomes in a flow injection immunoanalytical system for the determination of cholera toxin. *Anal. Chem.* 2007; 79(1):246–50.
38. Jayasekera C.R., Harris J.B., Bhuiyan S., Chowdhury F., Khan A.I., Faruque A.S. et al. Cholera toxin-specific memory B cell responses are induced in patients with dehydrating diarrhea caused by *Vibrio cholerae* O1. *J. Infect. Dis.* 2008; 198(7):1055–61.
39. Jonson G., Osek J., Svennerholm A.-M., Holmgren J. Immune mechanisms and protective antigens of *Vibrio cholerae* O139 as a basis for vaccine development. *Infect. Immun.* 1996; 64:3778–85.
40. 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.
41. Kallury P., Naheed A., Rahman S., Ansaruzzaman M., Faruque A.S., Bird M. et al. Evaluation if three rapid diagnostic test for cholera: does the skill level of the technician matter? *Trop. Med. Int. Health.* 2006; 11(1):49–55.
42. Kaper J.B., Morris J.G., Levine M.M. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8:48–86.
43. Martinez-Govea A., Ambrosio J., Gutierrez-Cogco L., Flisser A. Identification and strain differentiation of *Vibrio cholerae* by using polyclonal antibodies against outer membrane proteins. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001; 8:768–71.
44. Mousavi S.L., Nazarian S., Amani J., Rahgerdi A.K. Rapid screening of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from south Iran by PCR-ELISA. *Iran Biomed. J.* 2008; 12(1):15–21.
45. Nato F., Boutonnier A., Rajerison M., Grosjean P., Dartevelle S., Guenole A. et al. One-step immunochromatographic dipstick tests for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in stool samples. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10(3):476–8.
46. Qadri F., Azim T., Chowdhury A., Hossain J., Sack R.B., Albert M.J. Production, characterization and application of monoclonal antibodies to *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. *Clin. Diagn. Immunol.* 1994; 1:51–4.
47. Qadri F., Hasan J.A., Hossain J., Chowdhury A., Begum Y.A., Azim T. et al. Evaluation of the monoclonal antibody-based kit Bengal SMART for rapid detection of *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal in stool samples. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33:732–34.
48. Qadri F., Wennerås C., Albert M.J., Hossain J., Mannoor K., Begum Y. et al. Comparison of immune responses in patients infected with *Vibrio cholerae* O139 and O1. *Infect. Immun.* 1997; 65:3571–6.
49. Rahman M., Sack D.A., Wadood A., Yasmin M., Latif A. Rapid identification of *Vibrio cholerae* serotype O1 from primary isolation plates by a coagglutination test. *J. Med. Microbiol.* 1989; 28:39–41.
50. Rao V.K., Sharma M.K., Goel A.K., Singh L., Sekhar K. Amperometric immunosensor for the detection of *Vibrio cholerae* O1 using disposable screen-printed electrodes. *Anal. Sci.* 2006; 22(9):1207–11.
51. Rhie G.E., Jung H.M., Kim B.S., Mekalanos J.J. Construction of a *Vibrio cholerae* prototype vaccine strain O395-N1-E1 which accumulates cell-associated cholera toxin B subunit. *Vaccine.* 2008; 26(43):5443–8.
52. Shimada T., Arakawa E., Itoh K., Nakazato T., Okitsu T., Yamai S. et al. Two strains of *Vibrio cholerae* non-O1 possessing somatic (O) antigen factors in common with *V. cholerae* serogroup O139 synonym «Bengal». *Curr. Microbiol.* 1994; 29:331–3.
53. 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.
54. Wang X.Y., Ansaruzzaman M., Vaz R., Mondlane C., Lucas M.E., von Seidlein L. et al. Field evaluation of a rapid immunochromatographic dipstick test for the diagnosis of cholera in a high-risk population. *BMC Infect. Dis.* 2006; 6:17.
55. Yang J.S., Kim H.J., Yun C.H., Kang S.S., Im J., Kim H.S., Han S.H. A semi-automated vibriocidal assay for improved measurement of cholera vaccine-induced immune responses. *J. Microbiol. Methods.* 2007; 71(2):141–6.

N.E.Tereshkina, E.A.Mikheeva, Z.L.Devdariani, A.K.Adamov,
G.V.Grigoryeva

Immunodiagnosics of Cholera: Current State of the Problem

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Presented is the survey of the national and foreign literature concerning the questions of improvement of cholera immunodiagnosics. Considered are the problems and prospects of development of different preparations designed for cholera vibrios detection and serologic diagnostics of the disease.

Key words: cholera, *Vibrio cholerae* O1, *Vibrio cholerae* O139, immunodiagnosics, serologic diagnostics, immunodiagnostic preparations

Об авторах:

Терешкина Н.Е., Михеева Е.А., Девдариани З.Л., Адамов А.К., Григорьева Г.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Tereshkina N.E., Mikheeva E.A., Devdariani Z.L., Adamov A.K., Grigoryeva G.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 25.06.09.

УДК 616.981.452(471)

Н.В.Попов¹, В.Е.Безсмертный², В.П.Топорков¹, С.М.Иванова², А.И.Удовиков¹, А.А.Кузнецов¹,
Т.В.Князева¹, Л.Д.Шилова¹, В.В.Кутырев¹

**ПРОГНОЗ ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЧУМЫ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ НА 2010 г.**

¹ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов;

²ФГУЗ «Противочумный центр Роспотребнадзора», Москва

Обоснован краткосрочный прогноз эпизоотической активности 11 природных очагов чумы Российской Федерации на 2010 г. Проведен анализ состояния численности основных носителей и переносчиков чумы в природных очагах различного типа. Определены современные тенденции динамики эпизоотической активности природных очагов чумы различной биоценотической структуры.

Ключевые слова: природные очаги чумы Российской Федерации, эпизоотическая активность, показатели численности носителей и переносчиков чумы, краткосрочный прогноз.

В 2009 г. эпизоотии чумы выявлены на территории Алтайского горного (42 культуры), Тувинского горного (23 культуры), Восточно-Кавказского высокогорного (5 культур), Прикаспийского песчаного (7 культур) природных очагов. На территории Центрально-Кавказского высокогорного природного очага развитие локальных эпизоотий чумы подтверждено результатами иммунодиагностических исследований. Общая площадь эпизоотий в 2009 г. составила 1257,5 кв. км (в 2008 г. – 1096 кв. км). В 2009 г. от грызунов и их эктопаразитов изолировано 77 культур чумного микроба (в 2008 г. – 157). При исследовании полевого материала иммунологическими методами получено 85 положительных на чуму результатов (в 2008 г. – 58). Полученные результаты подтвердили, в целом, прогноз эпизоотической активности природных очагов чумы на территории Российской Федерации на 2009 г. [2]. Согласно прогнозу в 2009 г. имело место сохранение межэпизоотического периода в Прикаспийском Северо-Западном степном, Волго-Уральском степном, Забайкальском степном, Волго-Уральском песчаном, Дагестанском равнинно-предгорном, Терско-Сунженском низкогорном природных очагах чумы. Произошло снижение эпизоотической активности Восточно-Кавказского высокогорного, Тувинского горного природных очагов чумы. Высокая эпизоотическая активность зарегистрирована в Алтайском горном природном очаге чумы. В качестве отклонения от содержания краткосрочного эпизоотологического прогноза [2] отмечим выявление в 2009 г., после 2-летнего перерыва, локальной эпизоотии чумы в центральной части Прикаспийского песчаного природного очага чумы. Выявление эпизоотии в условиях низкого уровня численности носителей и переносчиков указывает, косвенно, на недостаточную изученность механизма энзоотии, обуславливающего локальные проявления чумы в периоды низкой эпизоотической активности ее природных очагов. Существенно, что воз-

можность повышения эпизоотической активности Прикаспийского песчаного очага в 2008–2009 гг. (минимум солнечной активности текущего 11-летнего солнечного цикла № 24) предусматривалась ранее соответствующим долгосрочным прогнозом [1].

Вследствие негативного влияния климатических факторов произошло дальнейшее снижение численности длиннохвостого суслика в Тувинском горном природном очаге. В Восточно-Кавказском высокогорном природном очаге произошел резкий спад численности блох обыкновенной полевки. Напротив, на территориях Дагестанского равнинно-предгорного, Прикаспийского песчаного, Волго-Уральского песчаного очагов отмечена тенденция восстановления численности носителей и переносчиков чумы. В Алтайском горном природном очаге отмечено сохранение высокой фоновой численности монгольской пищухи. Все это в целом послужило основанием для краткосрочного прогноза на развитие в 2010 г. локальных эпизоотий чумы на территории горных, высокогорных и равнинных природных очагов.

Общая характеристика эпизоотического состояния 11 природных очагов чумы на территории Российской Федерации в 2009 г. и прогноз их активности на 2010 г. представлены ниже.

Природные очаги чумы сусликового типа

Центрально-Кавказский высокогорный природный очаг чумы (01). В 2009 г. в Центрально-Кавказском высокогорном природном очаге чумы возбудитель не выделен. Последние находки зараженных чумой животных зарегистрированы здесь в 2007 г. При исследовании 1638 экз. грызунов иммунодиагностическими методами (в системе РПГА-РНАГ) получено 57 положительных результатов. Переболевшие чумой горные суслики с низкими титрами антител к чумному микробу зарегистрированы в 9 секторах. В границах эпизоотического участка 2007 г. (у. Перк) отловлены переболевшие чумой зверьки с высоким содержанием антител (с превыше-

нием титра в РНАг над РПГА). Площадь эпизоотического участка составляет 2,5 кв. км.

В связи с глобальным изменением климата и антропогенной трансформацией ландшафтов общая площадь, заселенная горным сусликом, сократилась до 60 тыс. га (против 85 тыс. га в 1976 г.). Средняя численность зверьков в 2009 г. была практически на уровне прошлого года (20,2 против 19,3) и не превышала средней многолетней величины (20–25 экз. на 1 га). Увеличения площади поселений горного суслика не отмечено.

Показатели численности основного переносчика – блохи *Citellophilus tesquorum* изменялись незначительно как в сторону увеличения, так и снижения. На участках многократного в прошлом истребления блох (Малко-Баксанский ЛЭР) отмечена тенденция восстановления их численности. В населенных пунктах блох не обнаружено.

Общий показатель численности мышевидных грызунов составил 5,2 % попадания в орудия лова (2008 г. – 4,6 %). Показатель численности обыкновенной полевки составил в среднем 5,7 % попадания в орудия лова. Численность лесной и домовый мышей крайне низка. В населенных пунктах Верхне-Кубанского района средняя численность мышевидных составила осенью 8,5 % попадания в орудия лова, при колебаниях 2,0–9,0 %; в Малко-Баксанском и Баксано-Черекском районах численность мышевидных колебалась в пределах 5,0–11,0 % при среднем показателе 9,0 % попадания в орудия лова.

В 2010 г. прогнозируется сохранение численности горного суслика на уровне среднеемноголетних значений (20 экз. на 1 га). К весне в горной степи (в границах Кубано-Малкинского ЛЭР) и в альпийских лугах (в границах Малко-Баксанского ЛЭР) ожидается снижение численности блох вида *Cit. tesquorum*. Рост численности блох возможен в альпийских лугах и горной степи в границах Верхне-Кубанского ЛЭР. На остальных территориях очага численность основного переносчика чумы останется на уровне 2009 г. На освобожденных от горного суслика территориях вероятно повышение численности и расширение ареала обыкновенной и водяной полевок. Ожидается сохранение низкой эпизоотической активности очага, возможны единичные находки зараженных чумой грызунов и блох.

Терско-Сунженский низкогорный природный очаг чумы (02). С 1992 г. регулярное эпизоотологическое обследование очаговой территории не проводится. В 2000 г. выявлена эпизоотия чумы среди малых сусликов в Малгобекском районе Республики Ингушетия (выделено 3 штамма чумного микроба). В последующем, вплоть до 2009 г. включительно, территорию очага не обследовали. В 2010 г. обнаружение зараженных чумой животных маловероятно.

Дагестанский равнинно-предгорный очаг чумы (03). Последняя эпизоотия выявлена в 2003 г. на территории Бабаюртовского района Республики Дагестан. В 2006–2007 гг. отмечены находки пере-

болевших чумой грызунов. В 2008–2009 гг. возбудитель чумы в очаге не выделен.

В равнинной зоне очага средняя плотность малого суслика составила 1,8 экз. на 1 га. (в 2008 г. – 1,3). В предгорной зоне численность мало различалась по годам (13,6 и 13,9 соответственно), оставаясь значительно выше среднеемноголетних показателей (норма – 6,8 экз. на 1 га). На всей территории очага отмечен рост численности блох малого суслика. В равнинной части запас блох увеличился до 23, в предгорной зоне – до 394–653 экз. на 1 га, намного превысив среднеемноголетнюю норму.

Средняя плотность гребенщиковой песчанки весной не превышала 1,6 экз. на 1 га, что в 4 раза ниже нормы и в 2 раза – показателя прошлого года (2008 г. – 3,3 экз. на 1 га, норма – 6,4). Увеличение плотности песчанок к осени до 3,6 экз. на 1 га не превысило среднеемноголетнюю норму (7,6 экз.). Численность блох гребенщиковой песчанки сохранилась на низком уровне.

Весной численность мышевидных грызунов составила в среднем в равнинной зоне 0,6 %, в предгорной – 1,9 % попадания в орудия лова, оставаясь ниже многолетней нормы (2,1 и 3,4 % соответственно). Осенние показатели, несмотря на их увеличение до 4,6 % в равнинной и 6,9 % в предгорной зонах, также не достигли многолетних значений (8,3 и 10,3 % соответственно). В закрытых биотопах отмечен низкий уровень численности мышевидных грызунов. Блохи на домовый мыши как на равнине, так и в предгорной зоне встречаются крайне редко и индексы их обилия не превышают сотых долей единицы.

В 2010 г. прогнозируется сохранение численности малого суслика на уровне 2009 г. Численность блох малого суслика превысит многолетнюю норму. Прогнозируется увеличение численности гребенщиковой песчанки весной при сохранении низкого уровня численности ее блох. Численность мышевидных грызунов не превысит среднеемноголетнюю норму. В равнинной части на участках комплексного поселения малого суслика, гребенщиковой песчанки и мышевидных грызунов возможны единичные находки зараженных чумой грызунов и блох.

Прикаспийский Северо-Западный степной природный очаг (14). С 1991 г. очаг находится в состоянии межэпизоотического периода. В 2009 г. возбудитель чумы в очаге не выделен. На территории очага сохраняется низкая фоновая численность носителей и переносчиков чумы. Общая фоновая численность малого суслика в центральных и западных районах очага не превышает 5,0 экз. на 1 га; в восточных сохраняется рост численности этого грызуна. При этом на севере Черных земель встречаются участки, где численность этого зверька достигает 20 экз. на 1 га.

Относительно высокие индексы обилия блох (ИО) в шерсти малого суслика отмечаются в западной части очага (1,1–5,4), а также в его восточных и юго-восточных районах (2,3–2,5). На остальной территории они составляют 0,1–0,7. Обилие блох в гнездах

суслика в центральной части Ергеней невысокое – 38,3. Миграционная активность (ИО во входах нор) в разных частях очага изменялась от 0,03 до 0,6.

Численность мышевидных грызунов в открытых биотопах повсеместно возрастала от весны к осени. Наиболее высокие показатели (% попадания в орудия лова) отмечались в Северных Ергенях (7,9 весной и 11,7 осенью) и в Южных (9,5 и 25,7 соответственно). На остальной территории они изменялись в пределах от 3,8–6,3 % весной до 8,6–11,3 % осенью. В населенных пунктах численность мышевидных изменялась от 2,8 % весной до 8,8 % осенью.

В 2010 г. в центральной и западной частях Ергенинской возвышенности, на Черных землях и низменно-солонцеватых степях ожидается продолжение восстановления численности малого суслика, но в целом по очагу его плотность останется на уровне 5 экз. на 1 га. Показатели численности блох существенно не изменятся. Сохранится низкий уровень численности песчанок. Показатели весенней численности мышевидных грызунов возможно незначительно возрастут. Ожидается сохранение межэпизоотического периода.

Волго-Уральский степной природный очаг чумы (15). На территории Российской Федерации последние эпизоотии чумы в очаге выявлены в 1975 г. в Харабалинском районе Астраханской области (ур. Тугай-Худук) в смешанных поселениях малого суслика и песчанок. В 2009 г. возбудитель чумы в очаге не выделен. Популяция малого суслика находится в глубокой депрессии. Запас блох малого суслика повсеместно низкий.

Показатель численности мышевидных грызунов в открытых биотопах в среднем составил 16,3 %, в населенных пунктах – 4,0 % попадания в орудия лова. Блох в жилье человека не обнаружено.

В 2010 г. в очаге сохранится низкий уровень численности малого суслика и его блох. Ожидается сохранение межэпизоотического периода.

Тувинский горный природный очаг чумы (37). В 2009 г. эпизоотическая активность очага значительно снизилась. Эпизоотии чумы были зарегистрированы в Монгун-Тайгинском районе Республики Тыва на площади 43 кв. км (2008 г. – 457 кв. км). Выделено 23 культуры чумного микроба (2008 г. – 62). Все культуры чумы выделены от эктопаразитов, в том числе: от блох *Cit. tesquorum* – 18, от блох *Oropsylla alaskensis* – 1, от блох *Paradoxopsyllus scorodumovi* – 1, от блох *Frontopsylla elatoides* – 2, от вшей с суслика – 1. Эпизоотические проявления зарегистрированы на участках: Верховье р. Узун-Хем (1 культура), Верховье р. Оюк-Хем (19 культур) и Чал-Ыяш (3 культуры). При проведении иммунодиагностических исследований получен один положительный результат от длиннохвостого суслика (РПГА отр.; РНАг 1:320).

В весенний период средняя численность длиннохвостого суслика в целом по очагу составляла 2,3 экз. на 1 га. Благодаря хорошей выживаемости сеголеток в летний период показатели плотности возросли

на отдельных участках до 22 экз. на 1 га. в Монгун-Тайгинском мезоочаге численность зверьков достигала 7,3; в Саглинском – 2,9 экз. на 1 га. Средний индекс обилия блох на сусликах достигал 4,4 (в 2008 г. – 4,2), во входах нор – 0,53 (в 2008 г. – 0,63).

Численность тарбагана на большей части Монгун-Тайгинского и Саглинского мезоочагов низкая или очень низкая – ее показатели ниже 1 жилого бутана на 1 га. Популяции монгольской пищухи находятся в стадии глубокой депрессии. Ее численность в Монгун-Тайгинском мезоочаге сократилась по сравнению с прошлым годом с 6,9 до 0,28 жилых колоний на 1 га. В Кара-Бельдырском участке очаговости численность монгольской пищухи также резко снизилась. Поселения пищух средней плотности сохранились только в южной части Каргинского участка очаговости на площадках с пересеченным рельефом в зоне сухих степей, а на большей части очаговой территории они отсутствуют.

Весной 2009 г. на большей части очаговой территории отмечено также заметное снижение численности даурской пищухи. В летний период показатель ее численности равнялся 0,37 жилых колоний на 1 га. Попадаемость плоскочерепной полевки в орудия лова составила 3,0–12,0 %. На чабанских стоянках численность мышевидных грызунов низкая.

В 2010 г. прогнозируется увеличение численности длиннохвостого суслика, монгольской пищухи, плоскочерепной полевки. Численность тарбагана и даурской пищухи остается низкой. Высокая численность блох сохранится на Каргинском, Барлыкском, Эльды-Хемском, Борошайском участках очаговости, а также в Моген-Буренской и Верхнебарлыкской популяциях длиннохвостого суслика; низкая – на Саглинском участке очаговости. Эпизоотическая активность очага ожидается низкой.

Забайкальский степной природный очаг чумы (38). С 1971 г. очаг находится в состоянии межэпизоотического периода. В 2009 г. эпизоотологическое обследование проведено на площади 8305,0 кв. км (45,8 % площади очага). Возбудитель чумы при бактериологическом и серологическом поисках не выявлен.

На территории очага сохраняется низкий уровень численности носителей и переносчиков чумы. Поселения монгольского сурка отмечены лишь вдоль государственной границы и на охраняемой территории. Показатель плотности зверьков не превышает 0,1–1,5 жилых бутанов на 1 га. Плотность даурского суслика составляет 0,1–1,0 экз. на 1 га. Лишь в антропогенных биотопах плотность зверьков достигает 1,2–4,0 экз. на 1 га. Общий запас блох даурского суслика остается на низком уровне (значительно ниже среднееголетних значений). Продолжается спад численности даурской пищухи. Вместе с тем отмечен рост численности даурского и джунгарского хомячков, а также стадной полевки. Средние показатели численности мышевидных грызунов обычно не превышали 2,8 % попадания в орудия лова и лишь на

отдельных участках достигали 22,0 %.

В 2010 г. на территории очага сохранится низкий уровень численности носителей и переносчиков. Прогнозируется дальнейшее сохранение межэпизоотического периода.

Природные очаги чумы песчаночьего типа

Волго-Уральский песчаный природный очаг чумы (16). В 2009 г. возбудитель чумы не выделен. Последняя эпизоотия выявлена в 2005 г. в Красноярском районе Астраханской области.

На территории очага отмечен незначительный рост численности основных носителей возбудителя чумы. Плотность песчанок возросла в среднем до 10,9 экз. на 1 га, на территории газоконденсатного месторождения – до 13,0 экз. на 1 га. Запас блох песчанок остается на низком уровне: весной – 26, осенью – 158 экз. на 1 га. Индексы обилия блох как в шерсти, так и в норах повсеместно низкие. Численность мышевидных грызунов в песках и в закрытых стациях не превышала 5–6 % попадания в орудия лова. Блох в жилье человека и надворных постройках не обнаружено.

В 2010 г. плотность песчанок в весенний период останется на уровне 5–8 экз. на 1 га. Сохранится низкий уровень численности блох. Численность мышевидных грызунов в открытых стациях не превысит 10 %, в населенных пунктах – 5 % попадания в орудия лова. Тем не менее, нельзя исключить возможности обнаружения единичных зараженных чумой животных.

Прикаспийский песчаный природный очаг чумы (43). В 2009 г. установлено наличие локальных эпизоотий чумы. Эпизоотии чумы выявлены в Лаганском районе Республики Калмыкия на площади 500 кв. км. Всего выделено 7 штаммов чумного микроба, в том числе: от полуденных песчанок – 3, от гребенщикových песчанок – 2, от блох *Nosopsyllus laeviceps*, снесенных с полуденной песчанки – 1, от блох *Cit. tesquorum*, собранных из нор малого суслика – 1.

В северной части очага на территории Волго-Кумского междуречья сохраняется низкая численность малого суслика и песчанок. Популяция малого суслика находится в состоянии глубокой депрессии, и фоновая плотность зверьков не превышает 5 экз. на 1 га. В Ильменно-придельтовом районе и на Черных землях отмечен рост численности этого грызуна. Индексы обилия и запас блох малого суслика значительно снизились. Показатели численности песчанок сохранились на низком уровне. Весенний запас блох песчанок на Черных землях и в Приморском районе не превышал 16–22 экз. на 1 га. К осени запас блох резко снизился.

Численность мышевидных грызунов в открытых стациях различных ландшафтно-эпизоотологических районов севернее р. Кума колебалась в пределах 3,9–16,0 % попадания в орудия лова. Лишь в Ильменно-придельтовом районе отмечались участки с высокой плотностью мышей – до 62 % попадания. Численность общественной полевки снизилась до

0,5 %. В закрытых стациях численность домовой мыши составила 2,6–6,7 % попадания в орудия лова, при заселенности объектов 10–15 %. Эктопаразитов грызунов в населенных пунктах не обнаружено.

В южной части очага на территории Терско-Кумского междуречья наметилась тенденция роста численности песчанок и малого суслика. Средняя плотность песчанок достигла здесь 1,2 экз. на 1 га. В песчаных массивах Кумо-Манычского междуречья Ставропольского края уровень численности песчанок возрос до 6,4 экз. на 1 га. Запас блох песчанок на территории Терско-Кумского междуречья снизился и составил порядка 1,0 экз. на 1 га. В Кумо-Манычском междуречье запас блох увеличился в среднем до 10,0 экз. на 1 га. Плотность малого суслика в Ногайской степи составила 0,2 экз. на 1 га. Средний показатель численности мышевидных грызунов в Терско-Кумском междуречье возрос до 5,8 % попадания в орудия лова. В Кумо-Манычском междуречье показатели составили 7,2–12,4 %, что значительно выше среднемноголетних значений. В закрытых биотопах в Кумо-Манычском междуречье численность мышевидных достигала среднего и высокого уровней; в Терско-Кумском междуречье оставалась низкой. В населенных пунктах на территории Кумо-Манычского междуречья отмечено наличие блох *Pulex irritans*.

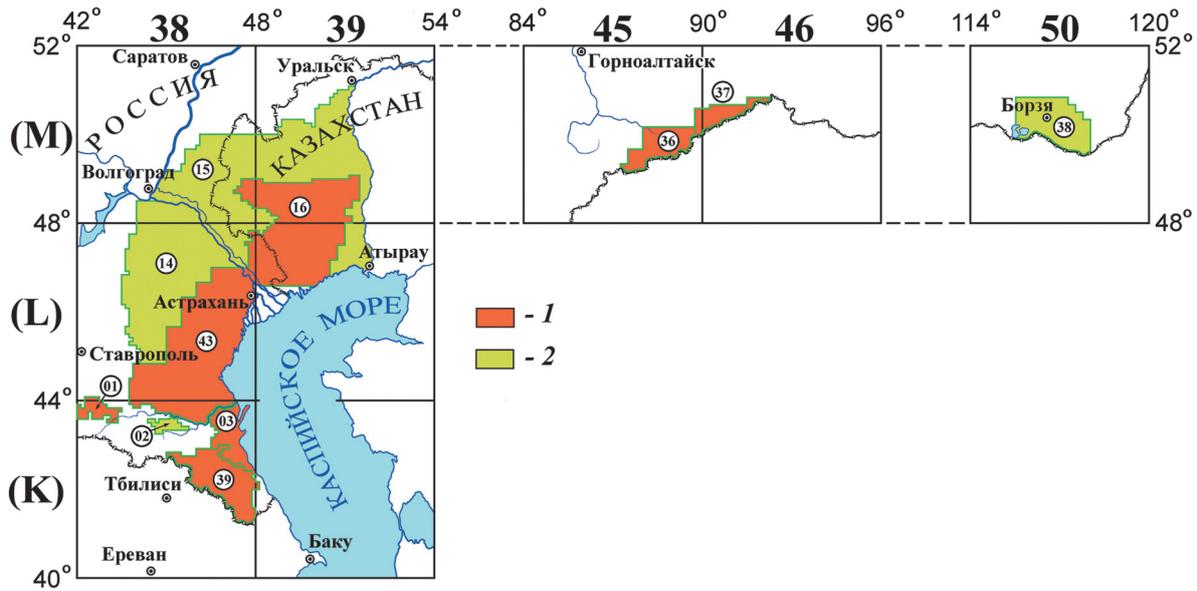
В 2010 г. в очаге сохранится низкий уровень численности носителей и переносчиков чумного микроба. На территории Терско-Кумского междуречья продолжится рост численности песчанок и малого суслика. Возможно выявление локальных эпизоотий чумы в различных районах очага.

Природный очаг чумы полевочьего типа

Восточно-Кавказский высокогорный природный очаг чумы (39). В 2009 г. на территории Кулинского района Республики Дагестан, в границах эпизоотического участка 2008 г., зарегистрирована эпизоотия чумы на Кокмадагском участке очага. Общая площадь эпизоотии составила 100 кв. км. В июне и августе выделено 5 штаммов чумного микроба (в 2008 г. – 23), в том числе: от обыкновенной полевки – 1, от блох *Ctenophthalmus intermedius* – 4.

Средняя плотность обыкновенной полевки в горной зоне весной составила 3,7 экз. на 1 га. К осени плотность зверьков достигла 12,4 экз. на 1 га. В предгорной зоне численность полевки снизилась до 9,0 экз. на 1 га. Осенью показатель численности прочих мышевидных грызунов в горной зоне в открытых биотопах составил в среднем 4,3 % попадания в орудия лова, в закрытых биотопах их численность не превысила 0,3–1,1 %.

Весной 2009 г. в горной зоне отмечено резкое снижение запаса блох полевки – до 5,2 экз. на 1 га против 26,0 в 2008 г. Осенние показатели численности блох не превышали 43,0 экз. на 1 га при среднемноголетней норме 231,0 экз. В предгорной части очага численность блох полевки, напротив, увеличилась до 128,0 экз. на 1 га, хотя и не достигла среднемноголетней нормы – 161,0 экз. на 1 га. В населен-



Природные очаги чумы Российской Федерации, на территории которых в 2010 г. прогнозируется развитие локальных эпизоотий чумы (1) и сохранение межэпизоотического периода (2)

ных пунктах блох не обнаружено.

В 2010 г. прогнозируется дальнейший рост численности обыкновенной полевки в предгорной и горной зонах. Уровень численности блох полевки не превысит среднееголетнюю норму. На территории Кокмадагского участка очага ожидается продолжение эпизоотий чумы.

Природный очаг чумы пищухового типа

Алтайский горный природный очаг чумы (36).

В 2009 г. эпизоотии чумы выявлены на территории Кош-Агачского района Республики Алтай на площади 612 кв. км. Эпизоотии чумы выявлены в 14 секторах. Всего выделено 42 культуры чумного микроба: от монгольских пищух – 7 (в т.ч. 1 от трупа), от блох с монгольских пищух – 23, от блох из входов нор монгольских пищух – 9, от блох с плоскочерепной полевки – 2, от иксодовых клещей – 1. Зараженность основного носителя по всем пробам на эпизоотических участках составила порядка 1–5 %, зараженность блох – порядка 0,1–2,0 %. При иммунодиагностическом исследовании грызунов получено 27 положительных результатов (в апреле – 19, в сентябре – 8). Антитела к Ф1 чумного микроба выявлены в пробах от монгольской пищухи – 20, плоскочерепной полевки – 6, даурской пищухи – 1.

Локальные эпизоотии протекали на фоне высокой численности основного носителя. Показатели численности монгольской пищухи составляли в среднем 5,8–8,9 жилых нор на 1 га, даурской пищухи – 0,8–1,9 жилых нор на 1 га. Показатель плотности алтайского сурка не превышал в среднем 0,4 жилого бутана на 1 га. Средняя плотность длиннохвостого суслика весной и осенью составляла 2,7–3,4 экз. на 1 га. Показатель численности плоскочерепной полевки к осени возрос до 33,7 % попадания в орудия лова.

Общий индекс обилия блох на монгольской пищухе за год составил 6,0; что ниже показателя прошлого года (7,5), но выше среднееголетнего значения (5,2). ИО блох во входах ее нор – 0,11.

В 2010 г. прогнозируется сохранение высокой численности монгольской пищухи и плоскочерепной полевки. Численность даурской пищухи, длиннохвостого суслика, алтайского сурка и основных переносчиков сохранится на уровне 2009 года. На фоне высокой численности монгольской пищухи и ее блох прогнозируется развитие эпизоотий чумы в различных частях очага.

Краткосрочный прогноз. Итоговый прогноз на развитие эпизоотий чумы или сохранение межэпизоотического периода в природных очагах чумы Российской Федерации в 2010 г. представлен на рисунке.

В 2010 г. развитие локальных эпизоотий чумы ожидается на территории горных и высокогорных природных очагов – Алтайского горного и Восточно-Кавказского высокогорного. Сохранится низкая эпизоотическая активность Тувинского горного природного очага чумы. В Центрально-Кавказском высокогорном очаге возможны единичные находки зараженных чумой животных. В равнинных и низкогорных природных очагах чумы – Прикаспийском Северо-Западном степном, Волго-Уральском степном, Забайкальском степном, Терско-Сунженском низкогорном ожидается сохранение межэпизоотических периодов. На территории Прикаспийского песчаного природного очага ожидается развитие локальных эпизоотий чумы; в Дагестанском равнинно-предгорном и Волго-Уральском песчаном природных очагах вероятны единичные находки зараженных чумой животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Попов Н.В., Безсмертный В.Е., Новиков Н.Л., Удовиков А.И., Кузнецов А.А., Попов В.П., Шилова Л.Д., Кутырев В.В. Прогноз эпизоотической активности природных очагов чумы Российской Федерации на 2008 г. Пробл. особо опасных инф. 2008; 1(95):13–7.
2. Попов Н.В., Безсмертный В.Е., Топорков В.П., Иванова С.М., Попов В.П., Удовиков А.И., Шилова Л.Д., Кутырев В.В. Прогноз эпизоотической активности природных очагов чумы Российской Федерации на 2009 г. Пробл. особо опасных инф. 2009; 1(99):11–7.

N.V.Popov, V.E.Bezsmertny, V.P.Toporkov, S.M.Ivanova, A.I.Udovikov,
A.A.Kuznetsov, T.V.Knyazeva, L.D.Shilova, V.V.Kutyrev

**Prognosis of Epizootic Activity of Natural Plague Foci
in the Russian Federation for the Year of 2010**

*Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov;
Plague Control Center of Rospotrebnadzor, Moscow*

Short-term prognosis of epizootic activity of 11 natural plague foci in Russia for 2010 is substantiated. The analysis of the main plague carries and vectors abundance in natural foci of different types was carried out.

Determined were the modern tendencies of the dynamics of epizootic activity of natural plague foci with different biocenotic structure.

Key words: natural plague foci of the Russian Federation, epizootic activity, indices of abundance of plague main carries and vectors, short-term prognosis.

Об авторах:

Попов Н.В., Топорков В.П., Удовиков А.И., Кузнецов А.А., Князева Т.В., Шилова Л.Д., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Безсмертный В.Е., Иванова С.М. Противочумный центр. 119121, Москва, Погодинская ул., 10, с. 4. Тел.: (495) 402-90-01. E-mail: protivochym@nlm.ru

Authors:

Popov N.V., Toporkov V.P., Udovikov A.I., Kuznetsov A.A., Knyazeva T.V., Shilova L.D., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Bezsmertny V.E., Ivanova S.M. Plague Control Center of Rospotrebnadzor. 119121, Moscow, Pogodinskaya St., 10, B. 4. E-mail: protivochym@nlm.ru

Поступила 28.01.10.

З.Адьяасурэн¹, Д.Цэрэнноров¹, Д.Отгонбаатар¹, С.В.Балахонов², Т.И.Иннокентьева²,
Ш.Агиймаа¹, С.А.Косилко²

КЛИНИКО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЧУМЫ В МОНГОЛИИ

¹Национальный центр по изучению природноочаговых инфекций Министерства здоровья Монголии;
²ФГУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»

Анализ клинико-эпидемиологических проявлений чумы в Монголии за 1986–2009 гг. свидетельствует о снижении заболеваний первично-легочной чумой, преобладании бубонной формы, увеличении доли женщин и детей в заболеваемости в последнем десятилетии. Учитывая высокий эпидпотенциал очагов «сурчиного» типа, в которых продолжается браконьерский промысел сурков, значительную вероятность осложнений бубонной чумы легочной или септической формами, необходимо совершенствовать эпиднадзор за чумой в Монголии.

Ключевые слова: Монголия, носители, переносчики, бубонная, легочная, септическая чума, эпидпотенциал.

Эпидемические проявления чумы в аридных областях Монголии известны со времен средневековья [8]. Энзоотичные по чуме территории к настоящему времени выявлены в 132 сомонах 18 аймаков и охватывают более 28 % площади страны, что составляет 443 тыс. кв. км [3]. Причем наиболее высокоактивные природные очаги чумы расположены в юго-западной части страны (рис. 1).

В разные годы преобладали мнения о выделении от 6 до 12 природных очагов чумы различного типа и степени автономности [5, 7, 12]. Согласно первой классификации Ж.Дэмбэрэла [5], выделены очаги двух типов: «сурчиные горно-степные» и «песчаночно-пищуховые». Основным носителем в «сурчиных» очагах является монгольский сурок (*Marmota sibirica*) или тарбаган – промысловый зверек, а переносчиком – его специфическая блоха *Oropsylla silantiewi*. В очагах этого типа циркулирует

возбудитель чумы основного подвида – *Yersinia pestis subsp. pestis*, обладающий высокой вирулентностью. Поэтому очаги сурочьего типа имеют высокий эпидемический потенциал и выраженную сезонность эпизоотического процесса: июнь – август – сентябрь, что определяется высотным поясом расположения очага и, соответственно, периодом активности основного носителя чумы.

В эпизоотический процесс в «сурчиных» очагах вовлекаются второстепенные и случайные носители (суслики, пищухи, полевки) и их эктопаразиты – блохи, иксодовые клещи (*Ixodes crenulatus*, *Dermacenter nuttalli*), вши (*Neohaemata pinus palearcticus tarbagani*) [8].

«Песчаночно-пищуховые» очаги приурочены к горно-степным, опустыненным и пустынным ландшафтам. Биоценологическая структура их недостаточно изучена. Следует отметить, что в отдельных

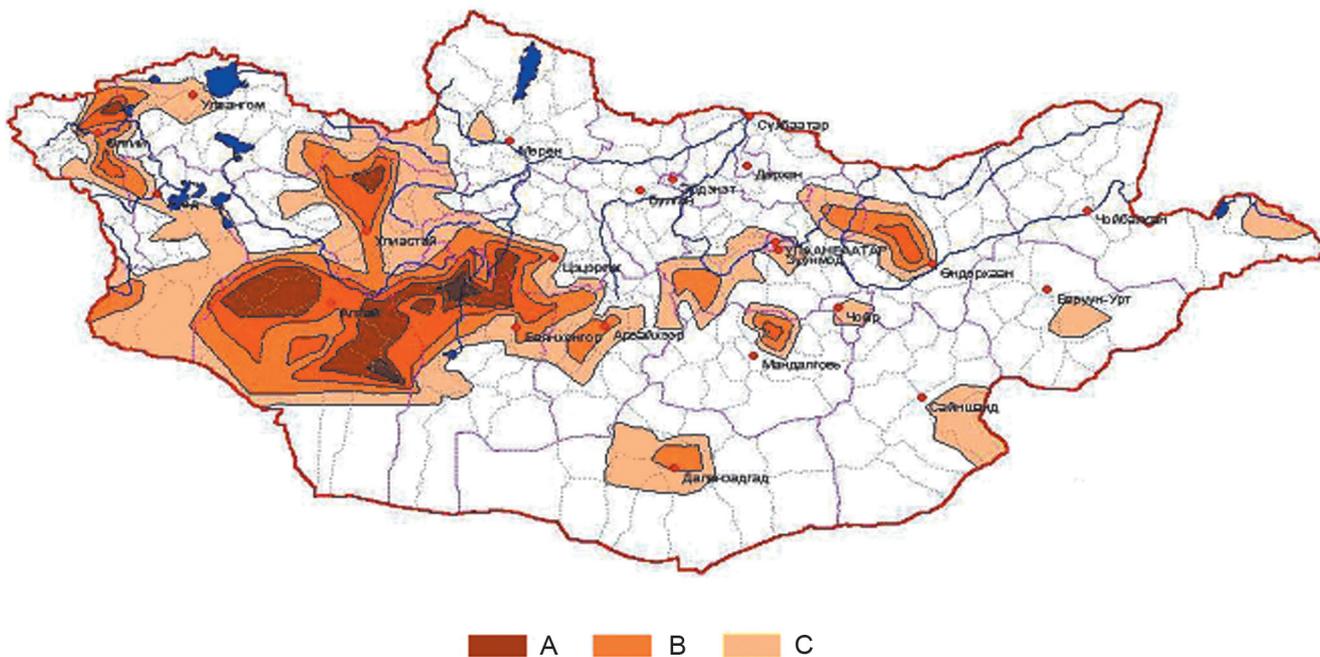


Рис. 1. Эпизоотическая активность природных очагов чумы в Монголии:
A – высокая, B – умеренная, C – низкая

очагах может численно преобладать один из видов носителей – или монгольская пищуха (*Ochotona princei*), или полевка Брандта (*Lasiopodomys brandtii*). В очагах этого типа в эпизоотический процесс также могут вовлекаться алтайский сурок (*M. vaibacina*), длиннохвостый суслик (*Citellus undulatus*), песчанки нескольких видов (*Meriones unguiculatus*, *M. meridianus*, *Rhombomys opimus*). По-видимому, большинство очагов этого типа полигостальны и поливекторны. В них циркулирует возбудитель чумы алтайского, улэгейского и основного подвидов с характерными для отдельных очагов инфраподвидовыми гено- и фенотипическими отличиями [1, 2, 4, 8, 9, 10, 11, 13].

Эпидемический потенциал очагов «песчаночно-пищухового» типа нельзя оценить однозначно. На участках очаговости, где циркулирует возбудитель чумы основного подвида в популяциях монгольского, алтайского сурков, длиннохвостого суслика, он довольно высокий. Менее опасны очаги с циркуляцией *Y. pestis subsp. altaica* и *Y. pestis subsp. ulegeica*.

По последней классификации Ж.Дэмбэрэла [6], природные очаги Монголии характеризуются иерархической структурой, основанной на географических, экологических, эпидемиологических и эпизоотологических данных. Он выделяет 3 типа очагов: лесостепной горный, степной и гобийский, которые включают 12 региональных, 50 мезоочагов и 164 локальных очага с определенными носителями и переносчиками.

В настоящее время в Монголии установлена естественная зараженность чумным микробом млекопитающих и птиц 19 видов, блох 28 видов и подвидов, вшей 2 видов, клещей 4 видов. При этом более 50 % всех изолятов возбудителя чумы получено от монгольского сурка, 27 % штаммов – от эктопа-

разитов, из них 91,5 % от блох (преимущественно от *O. silantiewi* – 64 %).

Ежегодно (с 1998 г.) специалисты Национального центра изучения природно-очаговых инфекций и его 14 филиалов на основании результатов эпизоотологического обследования определяют «территории риска» и вероятность заражения людей – очень высокая, умеренная, низкая (рис. 2). Как видно из представленных данных, наиболее эпидемиологически значимыми регионами являются аймаки, расположенные в пределах Монгольского и Гобийского Алтая, Хангая и Хэнтея.

Официальная регистрация заболеваемости людей чумой в Монголии ведется с 1931 г. Анализ динамики заболеваний, проведенный за 70 лет, свидетельствует о локальном характере вспышек с преимущественно единичными (до 10) случаями заболеваний, хотя отмечаются колебания числа больных по годам и уменьшение индекса очаговости [14, 15].

На рис. 3 приведена заболеваемость чумой с 1940 по 2009 год. За этот период зарегистрировано 528 случаев заболевания людей чумой с летальностью 69,3 %.

Основным источником инфекции является монгольский сурок – промысловый грызун, мясо которого употребляется в пищу, шкурка является ценным мехом, а жир, как считает местное население, является целебным, а также применяется в парфюмерной промышленности. Вторым по частоте источником инфекции является больной легочной формой чумы. Как показывают данные эпидемиологического анамнеза, заражение происходит в основном контактным путем при разделке тушек тарбагана, трансмиссивным – через укусы блох и воздушно-капельным (от

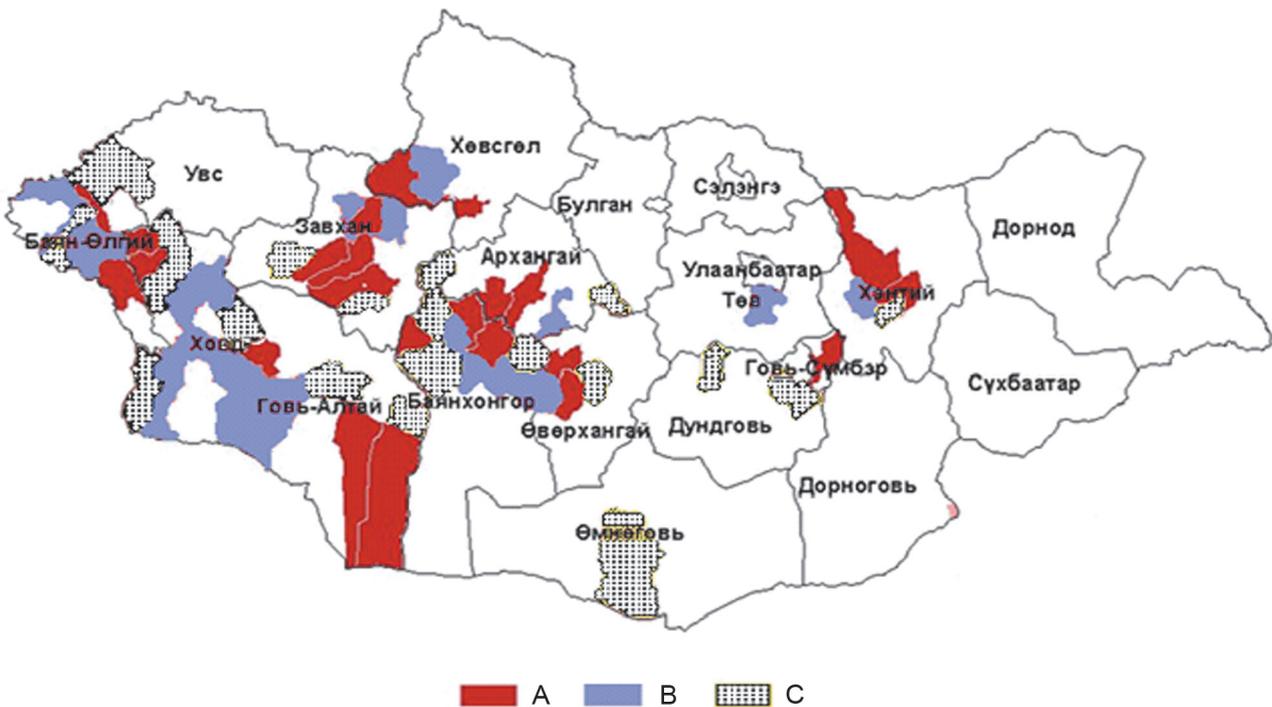


Рис. 2. Степень риска заражения человека чумой в природных очагах Монголии:

A – высокая, B – умеренная, C – низкая

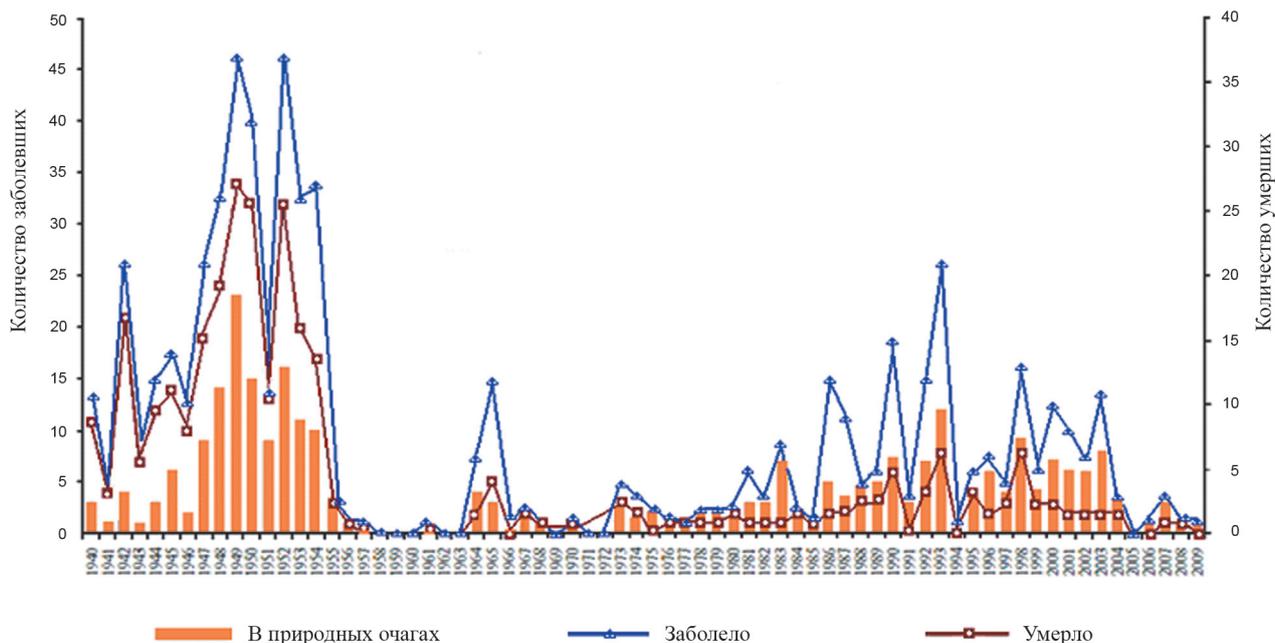


Рис. 3. Заболевания людей чумой в Монголии (1940–2009 гг.)

больного человека).

В данном сообщении также представлен сравнительный анализ заболеваемости чумой в Монголии за два десятилетия: 1986–1995 и 1996–2005 гг. В 1986–1995 гг. зарегистрировано 86 больных чумой. В 66,3 % случаев источником инфекции был тарбаган (его трупы, зверьки, отловленные капканом, принесенные собаками), причем в 10,3 % случаев заражение произошло через укусы блох. В 29 случаях (33,7 %) источником инфекции являлись больные чумой люди. В ряде случаев отмечена вспышечная заболеваемость с числом больных от 2 до 9 человек. Кроме того, отмечен факт заражения 14 человек от одного источника инфекции. Клинические формы первичных случаев чумы (57) следующие: бубонная – 47 (82,5 %), первичная пневмония (первично-легочная – 4 (6 %), первично-септическая 6 (10,5 %)). У 25,8 % больных бубонная чума осложнилась вторичной пневмонией. Как отмечено выше, у 29 человек (33,7 %) была первичная пневмония при инфицировании от больных людей. Летальность составила 36,04 % (31 человек), что значительно превышает среднемировые показатели за эти годы. По локализации бубоны преобладали в подмышечной области (77,1 %), преимущественно в левой (50 %), что связано с традиционным способом разделки тушек сурков и вероятным укусом оставшихся в шкурке блох. Единичные бубоны наблюдали в области шеи, под ключицей, а также в подчелюстной области.

Заболевания регистрировались с апреля по октябрь с преобладанием в августе (40,0 %), сентябре (28 %). Процент больных мужского пола составил 85,9.

В 1996–2005 гг. зарегистрировано 65 больных чумой. Также, в основном, источником инфекции был монгольский сурок (отстрелянные, трупы, при-

несенные собаками, отловленные капканами и даже руками). В 15 случаях (23,0 %) отмечалось инфицирование через укусы блох. В 9 случаях (13,8 %) источником инфекции явились больные чумой люди. Следует отметить специфические в эпидемиологическом отношении единичные случаи заражения – при употреблении сырого мяса и печени тарбагана, при кормлении охотничьих орлов-беркутов мясом сурка и складировании шкурок тарбаганов.

В этом десятилетии возросло число случаев бубонной формы до 92,8 %, первичная легочная и первично-септическая формы составили по 3,6 % (по 2 случая). Отмечено 5 случаев расположения бубонов в паховой области, что дает основание предполагать увеличение числа случаев инфицирования через укусы блох. Необходимо также отметить возросшее число больных детей, в возрасте от 4 до 16 лет заболели 20 человек (30,7 %), из них 9 инфицированы через укусы блох.

В 1996–2005 гг. зарегистрированы две вспышки, во время которых заболели 9 человек первичной легочной чумой, заразившись от больного. Летальность составила 41,53 % (умерли 27 человек), что превысило уровень предыдущего десятилетия на 5,49 %.

Представляет интерес случай заражения трех человек от одного источника – тарбагана, но с различной клинической картиной заболевания: первичную легочную чуму, закончившуюся летальным исходом, наблюдали у беременной женщины, бубонную – у 40-летней женщины и первично-септическую – у 10-летней девочки. Последние два случая закончились выздоровлением больных. Летальные исходы заболевания у беременных наблюдали и ранее (1963, 1979, 1986 гг.), что должно настораживать врачей-инфекционистов в плане прогноза при лечении таких пациентов.

Важной особенностью заболеваемости чумой в

период 1996–2005 гг. является регистрация больных в центрах аймаков, где велика вероятность возникновения вспышек из-за высокой плотности населения. Также при этом увеличивается риск быстрого распространения инфекции за пределы первичного очага. Обусловлено это увеличением числа личных легковых автомобилей, способных к передвижению в отдаленные районы энзоотичной по чуме территории. Так, эпидочаги в этом десятилетии отмечены в аймачных центрах – Арвайхээре Убурхангайского аймака (5), Улиастае Завханского аймака (3). Число сомонов, где зарегистрированы заболевания людей чумой, увеличилось на 8 и достигло 34.

При анализе сезонности установлено, что заболевания регистрировали с июня по октябрь с пиком в августе (41,2 %), сентябре (43,0 %), что в сумме составляет 84,2 %. Процент больных мужского пола снизился и составил 66,0.

С 2006 по 2009 год зарегистрировано 6 случаев заболевания чумой, из них 2 с летальным исходом.

Таким образом, сравнительный анализ заболеваемости чумой в Монголии в 1986–1995 и 1996–2005 гг. свидетельствует о том, что снизилось число больных чумой в последнем десятилетии (с 86 до 65). Основным источником инфекции является, как и ранее, монгольский сурок. Отмечено снижение первично-легочной формы чумы с 6,9 до 3,2 %, преобладание бубонной (82,7 и 92,8 % соответственно), в том числе с регистрацией бубонов в паховой области. Заражение через укусы блох также имеет тенденцию к росту (10,3 и 23 %). Уменьшается число вспышек чумы, по-видимому, за счет снижения случаев заражения первичной легочной чумой непосредственно в природном очаге. В последнем десятилетии увеличилась доля женщин (до 34 %) в заболеваемости чумой, высока доля детей при заражении через укусы блох. Пик заболеваемости приходился на август–сентябрь.

Следовательно, учитывая большую площадь энзоотичной по чуме территории Монголии, высокий эпидпотенциал «сурчиных» очагов, обусловленный циркуляцией высоковирулентного возбудителя чумы и промыслом сурков, высокую вероятность осложненной бубонной чумы вторичной легочной или вторичной септической, рост числа личного автотранспорта у жителей, что способствует транспортированию больного на большие расстояния, необходимо совершенствовать эпиднадзор за чумой в Монголии и продолжать научные исследования по изучению механизмов природной очаговости чумы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балахонов С.В. Геномные маркеры возбудителей чумы, псевдотуберкулеза, холеры, бруцеллеза (эпидемиологическое и диагностическое значение) [автореф. дис. ... д-ра мед. наук]. Саратов; 2000. 33 с.
2. Балахонов С.В., Цэнджав С., Эрдэнебат А. Новые плазмидовары штаммов возбудителя чумы, изолированных в Монголии. Мол. генетика. 1991; 11:27–9.
3. Батсайхан В., Батболд Ж., Нямдорж Н. К вопросу дифференциального деления территории Монголии на «террито-

рии риска» и вероятность заражения людей. Научный журнал, ЦИПОИ, 2001; 9:70–7.

4. Довчин Н., Цэвэлмаа С. К изучению эктопаразитов грызунов Монгольского Алтая. Эпидемиол. и профилактик. особо опасных инф. в МНР и СССР. Улан-Батор; 1978. С. 161–9.

5. Дэмбэрэл Ж. Некоторые особенности чумных очагов Монголии. Докл. Иркут. противочум. ин-та Сибири и ДВ. Чита, 1974; 10:62–3.

6. Дэмбэрэл Ж. Взаимоотношения между сурками и природными очагами чумы в Монголии. В кн.: Сурки голарктики как фактор биоразнообразия: III междунар. конф. по суркам. М.; 1997. С. 32–4.

7. Жамба Г., Галбадрах Д., Саран М. и др. К стратегии и тактике изучения природного очага чумы в МНР. В кн.: Эпидемиол. и профилактик. особо опасных инф. в МНР и СССР. Улан-Батор; 1978. С. 8–11.

8. Жовтый И.Ф., Емельянова Н.Д. Переносчики чумной инфекции в Монгольской Народной Республике. Изв. Иркут. гос. науч.-исслед. противочум. ин-та Сибири и ДВ. Иркутск, 1959; 22:72–107.

9. Иннокентьева Т.И. Особенности экологии *Yersinia pestis altaica* [автореф. дис. ... д-ра мед. наук]. Саратов; 1997. 57 с.

10. Каримова Т.Ю., Геронов В.М. Природные очаги чумы Палеарктики. М.: Наука; 2007. 199 с.

11. Лозачев А.И., Очиров Ю.Д., Жамьянсүрен П. Совместная циркуляция штаммов чумного микроба различных подвидов на территории МНР. В кн.: Эпидемиол. и профилактик. особо опасных инф. в МНР и СССР. Улан-Батор; 1978. С. 67–9.

12. Некупелов Н.В. Эпизоотология чумы в Монгольской Народной Республике. Изв. Иркут. гос. науч.-исслед. противочум. ин-та Сибири и ДВ. Иркутск, 1959; 22:108–243.

13. Тимофеева Л.А., Апарин Г.П., Лозачев А.И. и др. Итоги изучения штаммов чумного микроба, выделенных в Монголии. В кн.: Эпидемиол. и профилактик. особо опасных инф. в МНР и СССР. Улан-Батор; 1978. С. 63–4.

14. Angar D., Otgonbaatar D. Tendency of plague morbidity in Mongolia. In: Natural Infect. Dis. Sci. Conf. Ulanbaatar; 2002. P. 27–31.

15. Adiyasuren Z., Otgonbaatar D., Tumur B., Lhagvasuren Y. Human plague in Mongolia (1931–2000). Natural Infect. Dis. Sci. Conf. Ulanbaatar, 2002. P. 19–26.

Z.Ad'yasuren, D.Tserennorov, D.Otgonbaatar, S.V.Balakhonov,
T.I.Innokentyeva, Sh.Agiymaa, S.A.Kosilko

Clinical-Epidemiological Features of Plague in Mongolia

National Research Center for Natural-Focal Diseases of the Ministry of Health of Mongolia; Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East

The analysis of clinical-epidemiological features of plague in Mongolia in 1986–2009 demonstrated the decrease of the number of primary pulmonary plague cases, prevalence of bubonic plague, increase of the morbidity in women and children in the last decade. Considering the high epidemiologic potential of foci of the marmot's type, where the marmots are captured illegally by poachers, considerable probability of the bubonic plague being complicated with pneumonia or sepsis, it is necessary to improve plague epidemiologic surveillance in Mongolia.

Key words: Mongolia, carriers, vectors, bubonic, pneumonic, septic plague, epidemic potential.

Об авторах:

Адъяасурэн З., Цэрэнноров Д., Отгонбаатар Д., Агиймаа Ш. Национальный центр по изучению природноочаговых инфекций Министерства здоровья Монголии. 211137, Монголия, Улан-Батор. E-mail: dnorov_99@yahoo.com

Балахонов С.В., Иннокентьева Т.И., Косилко С.А. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и ДВ. 664047, Иркутск, ул. Триллссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Authors:

Ad'yasuren Z., Tserennorov D., Otgonbaatar D., Agiymaa Sh. National Research Center for Natural-Focal Diseases of the Ministry of Health of Mongolia. Mongolia, 211137 Ulaanbaatar, Songinokhairkhan district. E-mail: dnorov_99@yahoo.com

Balakhonov S.V., Innokentyeva T.I., Kosilko S.A. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 664047, Irkutsk, Trilissera St., 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Поступила 18.12.09.

Е.В.Куклев, А.С.Раздорский, В.А.Сафронов, А.К.Адамов, А.А.Лопатин, В.П.Топорков

РАЗРАБОТКА СТРУКТУРЫ БАЗЫ ДАННЫХ ПО РИСКАМ В ОБЛАСТИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ НА УРОВНЕ СУБЪЕКТА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Для формирования базы данных по рискам в области биологической безопасности в субъекте Российской Федерации предложен критериальный подход, включающий эпидемиологические и социально-демографические показатели, показатели внешних и внутренних угроз биологической безопасности, характеристику потенциально-опасных биологических и химических объектов. База данных ориентирована на работу в составе географических информационных систем.

Ключевые слова: база данных, биологическая безопасность, санитарно-эпидемиологическое благополучие населения, субъект Российской Федерации, эпидемиологический риск.

В последние десятилетия наблюдается устойчивая тенденция роста различных угроз в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения, из которых главными являются: появление новых особо опасных инфекционных болезней (1 болезнь в год), возвращение старых (известных) нозологических форм [3, 9], непредвиденные аварийные сбои на современных биотехнологических производствах, аварии, обусловленные не санкционированным использованием патогенных биологических агентов, биотеррористические угрозы [5].

Поскольку исследования, посвященные разработке программного обеспечения (базы данных, компьютерные программы), для оценки степени биологических опасностей в субъектах Российской Федерации (РФ) имеют особую значимость [4, 5, 7, 8, 12], в 2009 г. в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 гг.)» был разработан эскизный проект структуры базы данных по рискам в области биологической безопасности на уровне субъекта РФ как компонент автоматизированной информационно-аналитической системы обеспечения биологической безопасности в субъекте Российской Федерации на основе географических информационных систем (ГИС) (рис. 1).

Цель работы – разработка структуры унифицированной базы данных по рискам в области биологической безопасности в субъекте Российской Федерации, ориентированной на использование и работу в среде ArcGIS.

Распространенный подход к формированию баз данных предполагает сбор и внесение значений по всем показателям в отдельные таблицы, связанные между собой [1, 2, 6, 10, 11]. Однако при сборе большого количества показателей возникают трудности, связанные с временными и финансовыми затратами. При чем в ряде случаев данные затраты представляются не оправданными по причине потери актуальности данных к моменту проведения анализа. Кроме того, такой подход приводит к многочисленному дублированию данных. Так, например, показатель численности населения может использоваться для

определения плотности населения, экстенсивных показателей заболеваемости, количества населения, подвергающегося риску заражения той или иной инфекционной болезнью и др. В таких условиях целесообразным является формирование «справочников», содержащих первичные данные, и автоматизация вычисления максимального числа показателей. Использование справочников упрощает структуру базы данных, исключает дублирование и позволяет повысить оперативность и надежность системы в целом.

Следует особо отметить принципиальную важность пространственной составляющей эпидемиологических данных наряду с временной. В современных условиях наиболее оптимальным подходом к пространственному анализу данных является использование баз географических данных (БГД) и географических информационных систем.

В 2008–2009 гг. был проведен анализ системы информационного обмена между учреждениями Федеральной Службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия населения по вопросам мониторинга и контроля угроз биологической безопасности, а также системный анализ действующих форм отчетности по регистрации больных инфекционными болезнями. На основании результатов проведенного анализа, с привлечением экспертов эпидемиологов, впервые был разработан перечень критериев оценки риска возникновения и развития

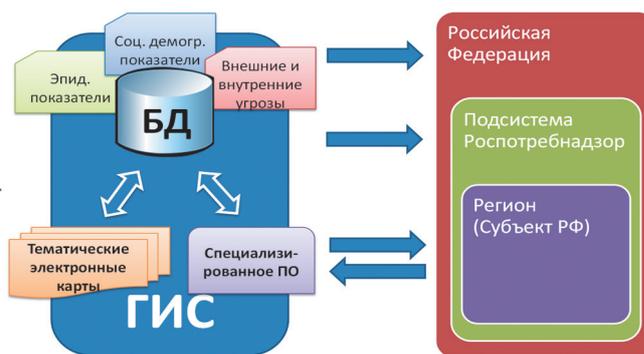


Рис. 1. Схема базы данных в составе ГИС

чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации. Данные, собранные с использованием этого перечня критериев в различных субъектах РФ, выбранных нами в качестве модельных территорий, – Астраханская, Московская, Новосибирская, Саратовская области, Приморский, Ставропольский края, Санкт-Петербург стали основой разработанного проекта базы данных.

Разработанная структура базы данных состоит из двух частей – пространственной и атрибутивной. Обе части логически связаны друг с другом по уникальному идентификатору, атрибутивные данные не дублируются.

В пространственной части хранится геометрия таких объектов, как административно-территориальное деление, пробы воды и полевого материала, различные органы, учреждения и потенциально опасные объекты, скотомогильники, территория эпидемий, эпизоотий и природных очагов заболевания, необходимых для дальнейшего пространственного анализа.

Сформированный перечень критериев прошел экспертную оценку сертифицированными инженерами программистами. В результате чего структура базы данных была значительно упрощена за счет автоматизации вычисления ряда показателей и адаптирована для использования в географических информационных системах с учетом пространственной составляющей эпидемиологических данных.

Данные в БГД хранятся в связанных реляционных таблицах. Некоторые таблицы являются совокупностями объектов, другие – отвечают за отношения между этими объектами, а также за правила проверки корректности и домены атрибутов. ArcGIS управляет целостностью таблиц, и с помощью объектов доступа к географическим данным предоставляет пользователям объектно-ориентированную модель данных. Ключевыми особенностями базы географических данных являются следующие.

Унифицированное хранилище данных. Данные могут храниться на сервере, что позволяет всем пользователям обращаться к ним (естественно, приоритеты доступа может задать администратор), а также локально на вашем компьютере. При этом локальная БГД сохранит всю структуру данных и наследует правила и свойства всех объектов, заданные в БГД на сервере.

Организация процесса редактирования и ввода новой информации. При моделировании БГД пользователь может ввести правила, которые в дальнейшем позволят избежать многих ошибок и неточностей, а специальные инструменты проверки корректности ввода данных позволят выявить ошибки, допущенные ранее.

Работа с интеллектуальными объектами. Пользователь работает не просто с обычными точками, линиями и полигонами, информация о которых хранится в таблицах. В БГД пользователь может

оперировать такими понятиями, как объекты реального мира, устанавливать и настраивать свойства и взаимоотношения объектов. Например, вместо точек можно работать с трансформаторами, а вместо линий – с трубами. При этом каждая труба будет «знать», через какой переходник она соединяется с трубой другого типа.

Объекты имеют более богатый контекст. Пользователь может через топологические отношения определить не только качества объектов, но и их взаимосвязь между собой. Определенные пользователем отношения объектов, как обычные, так и пространственные, позволяют, например, узнать, что произойдет с пространственными объектами, если переместить связанный с ними пространственный объект, и как изменится содержание объекта (атрибутивная информация), если изменить характеристики связанного с ним другого объекта.

Пространственные объекты могут отображаться на картах динамически. Отображение объекта может изменяться по результатам анализа или взаимодействия с другими объектами. Отслеживая состояние соседних объектов, с каждым типом или даже каждым из объектов можно связывать свой собственный инструментарий, который позволит более точно смоделировать характер природного явления, или отображать сложные схемы городских коммуникаций, используя при этом свои методы для их отображения.

Наборы пространственных данных непрерывны. БГД позволяет хранить очень большие объемы данных. Например, листы топографических карт можно хранить не полистно, как в случае модели данных покрытий, где рационально каждый лист топокарты записывать в отдельное покрытие, а в виде общего тематического слоя, сшитого из многих листов. При этом множество операторов могут обращаться к таким тематическим слоям карты и редактировать их одновременно. Конфликты, возникающие при изменении одних и тех же данных, можно разрешить, не вставая со своего рабочего места.

Многие функции, описанные выше, можно реализовать и с помощью стандартных ГИС-приложений. Но в большинстве случаев пользователю придется писать большой объем кода. Используя БГД, вы получаете базу, где уже заложен принцип построения интеллектуальных пространственных объектов, которые могут имитировать поведение реальных объектов.

Атрибутивная часть базы данных содержит описание каждого пространственного объекта или события.

Логическая структура базы данных включает в себя более 100 показателей объединенных в 7 групп: социально-демографические показатели, эпидемиологические показатели, показатели внутренних угроз, показатели внешних угроз, потенциально-опасные химические объекты, критерии биологической безопасности субъекта РФ, внутренние и внешние качественные критерии оценки биологической опасности (рис. 2).

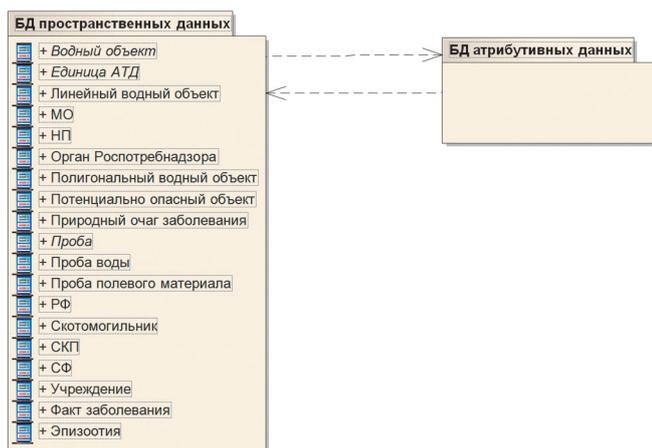


Рис 2. Общая логическая модель базы данных

Таким образом, впервые создан эскизный проект базы данных по рискам в области биологической безопасности на уровне субъекта Российской Федерации, основанный на использовании критериального подхода к построению структуры базы данных, что обеспечивает единообразие подходов к сбору данных в субъектах РФ с учетом максимального использования пространственных данных на платформе ArcGIS.

Работа выполнена по государственному контракту № 108-Д от 11.06.2009 г. в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айриянц А.А., Борисенко А.С., Добрецов Н.Н. и др. Опыт создания баз данных и метаданных Алтайского экорегиона. Геоинформатика. 2003; 4:13–9
2. Добрецов Н.Н., Зольников И.Д., Королюк А.Ю. и др. Разработка системы комплексного описания полигонов для интерпретации данных космической съемки. Сибирский экологический журнал. Новосибирск, 2005; XII(6):1031–8.
3. Львов Д.К. Новые и возвращающиеся инфекции – дрем-

- лющий вулкан. Пробл. особо опасных инф. 2008; 2(96):5–8.
4. Михайлов Л.А., Соломин В.П. Чрезвычайные ситуации природного, техногенного и социального характера и защита от них. СПб.: Питер; 2009. 235 с.
 5. Онищенко, А.А. Шапошников, В.Г. Субботин, Г.П. и др. Обеспечение биологической, химической и радиационной безопасности при террористических актах. М.; 2005. 431 с.
 6. Сочава В.Б. Теоретическая и прикладная география. Новосибирск: Наука; 2005. 288 с.
 7. Черкасский Б.Л. Руководство по общей эпидемиологии. М.: Медицина; 2001. С. 200–3.
 8. Черкасский Б.Л. Риск в эпидемиологии. М.: Практическая медицина; 2007. 480 с.
 9. Черкасский Б.Л. Новые инфекции: мифы и реальность. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 3:111–6.
 10. http://www.dataplus.ru/Arcrev/Number_19/3_base.html
 11. Living With Risk: A Global Review of Disaster Reduction Initiatives, 2004 version, Inter-Agency Secretariat of the International Strategy for Disaster Reduction.
 12. Community Emergency Preparedness: A Manual for Managers and Policy-Makers. Geneva: WHO; 1999.

E.V.Kouklev, A.S.Razdorskiy, V.A.Safronov, A.K.Adamov,
A.A.Lopatin, V.P.Toporkov

Development of the Structure of the Database on the Risks in the Sphere of Biological Safety at the Level of Constituent Unit of the Russian Federation

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

The criteria approach has been proposed for the development of the database on the risks in the sphere of biological safety in the constituent unit of the Russian Federation. This approach includes application of the following indices: epidemiological, social and demographic ones, those regarding external and internal menaces to the biological safety, characteristics of biological and chemical objects of potential danger. The database is oriented for work as a part of geographical information systems.

Key words: database, biological safety, sanitary epidemiological well-being, constituent unit of the Russian Federation, epidemiological risk.

Об авторах:

Куклев Е.В., Раздорский А.С., Сафронов В.А., Адамов А.К., Лопатин А.А., Топорков В.П. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Kouklev E.V., Razdorskiy A.S., Safronov V.A., Adamov A.K., Lopatin A.A., Toporkov V.P. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 05.11.09.

Т.А.Малюкова¹, А.Ф.Бобров², В.Ю.Щебланов², Л.А.Тихомирова¹, А.В.Бойко¹, А.В.Топорков¹

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ОЦЕНКИ НАДЕЖНОСТИ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ПЕРСОНАЛА, РАБОТАЮЩЕГО С МИКРООРГАНИЗМАМИ I–II ГРУПП ПАТОГЕННОСТИ

¹ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов; ²ФГУП «Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И.Бурназяна», Москва

Рассмотрена актуальность проведения исследований по оценке надежности профессиональной деятельности персонала, допускаемого к работам с микроорганизмами I–II групп патогенности. Определены методологические подходы и критерии оценки на базе требований действующих нормативных документов по безопасности работы и комплексного подхода к подготовке персонала.

Ключевые слова: микроорганизмы I–II групп патогенности, патогенные биологические агенты, биологическая безопасность, оценка риска нарушения надежности профессиональной деятельности.

Предприятия и лаборатории микробиологического профиля, выполняющие работы с инфекционными материалами, иначе патогенными биологическими агентами (ПБА), в том числе микроорганизмами I–II групп патогенности, относят к опасным производственным объектам [1].

Согласно действующим Санитарным правилам [2] к работе с объектами и материалами, содержащими или подозрительными на содержание микроорганизмов I–II групп патогенности, относят: диагностические исследования, включая ПЦР-диагностику; все виды экспериментальных работ с использованием микроорганизмов, токсинов и ядов биологического происхождения; работы по производству медицинских иммунобиологических препаратов с использованием микроорганизмов и продуктов их микробиологического синтеза; зоолого-энтомологические исследования; сбор полевого материала на территориях природных очагов инфекций и его транспортирование; содержание диких позвоночных животных и членистоногих; работы в инфекционных очагах заболеваний, эвакуация больных особо опасными инфекциями; работы в больницах (госпиталях), изоляторах и обсерваторах; вскрытие трупов людей и павших животных; исследования по контролю качества продукции на наличие санитарно-показательных микроорганизмов. В выполнении задействованы специалисты противочумных учреждений (Противочумный центр, 5 НИИ, 12 станций, 11 отделений), других научно-исследовательских институтов министерства здравоохранения, министерства обороны, образовательных учреждений медико-биологического профиля, лечебно-профилактических учреждений инфекционного и других профилей, центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, организаций дезинфекции, гражданской обороны, по чрезвычайным ситуациям и др. Приведенный широкий перечень работ и исполнителей определяет масштабность проблемы обеспечения их биобезопасности для персонала, населения и окружающей среды.

Обеспечение безопасной эксплуатации является

основным условием получения лицензии и функционирования данных учреждений [18, 19, 22, 24, 30, 31, 33, 34]. При этом ведущая роль в обеспечении надежности работ отводится персоналу – «человеческому» фактору [4, 8, 11, 15, 28].

Манипуляции с ПБА требуют четкого соблюдения правил техники безопасности, точного выполнения технологии работ, адекватности и скорости принятия решений при возникновении аварийной или чрезвычайной ситуации. При осуществлении всех видов деятельности с ПБА всегда присутствует риск заражения персонала, а также непреднамеренного или преднамеренного выхода инфекционных агентов за пределы учреждения с последующим инфицированием населения и окружающей среды. Причиной, приводящими к реализации рисков, могут послужить:

1. Нарушения штатной деятельности (инциденты, аварии с ПБА) в результате сбоя в работе инженерно-технических защитных устройств, либо непреднамеренных и/или неквалифицированных действий сотрудников.

Изучение причин аварий на предприятиях с потенциально опасными технологиями показывает, что от 20 до 80 % (в зависимости от вида производств) обусловлены ошибками персонала [Абрамова, 1993, цит. по 11], т.е. являются антропогенными. Вместе с тем в 70 % случаев именно квалифицированные и своевременные действия сотрудников предупреждали катастрофу. В разных странах в разные периоды в силу различий в законодательстве и экономическом уровне эти цифры могут существенно колебаться, но во всех странах исключить полностью риск антропогенных аварий нельзя. Причины возникновения антропогенного риска заложены в объективных условиях труда и его организации, а также в степени соответствия условий и содержания труда психологическим особенностям и функциональным возможностям каждого работника и всего персонала в целом. Необходима разработка и совершенствование теории и практики оценки антропогенного риска инцидентов на потенциально опасных объектах.

На данный момент в России отсутствует официальная статистика аварий, аварийных ситуаций, технических неисправностей на инженерно-технических системах, произошедших в учреждениях (организациях), использующих в своей деятельности ПБА. В единичных исследованиях анализ данных, полученных из открытой печати и отчетов учрежденческих комиссий по биобезопасности, показал, что количество аварий с внутрилабораторным заражением персонала микроорганизмами I–II групп патогенности не превышало четырех десятков за период с 1898 по 2006 год [3, 12, 16, 41, 42, 45]. Вместе с тем ликвидация последствий каждой аварийной ситуации или аварии в соответствии с положениями действующих нормативных документов [2, 7] требует существенных материальных затрат. В качестве примера, приведем результаты произведенного нами расчета стоимости ликвидации аварии с разбрызгиванием ПБА [2] при условии работы двух сотрудников с вирулентными штаммами возбудителей чумы или сибирской язвы в бактериологическом боксе площадью 10 м². Общий ущерб для организации в результате ликвидации аварий с вирулентным штаммом возбудителя чумы при изоляции работников, проведении диагностики и курса экстренной профилактики составит 65383 руб.; в случае проведения обследования и лечебных мероприятий – 147829 руб. При ликвидации аварии с вирулентным штаммом возбудителя сибирской язвы общий ущерб для организации составит соответственно – 64925 и 155563 руб.

2. Преднамеренные несанкционированные действия работников с последующей утечкой ПБА, возможно с террористическими целями.

Существует много литературных свидетельств об использовании ПБА I–II групп в качестве агентов для биотеррористических актов [6, 29, 38]. Некоторые из них, например, события 2001 г. в США, связанные с рассылкой по почте конвертов, содержащих споры возбудителя сибирской язвы, продемонстрировали реальность подобной угрозы, а поиски источника получения возбудителя опасной инфекционной болезни подтверждают реальность утечки ПБА из организаций, использующих их в своей деятельности. Подобные действия могут вызывать не только психологический стресс у персонала учреждения, населения, социальные и экологические потери, но и значительные экономические потери, связанные с ликвидацией последствий. Например, моделирование и анализ оценки сценария возникновения эпидемии на примере натуральной оспы в результате теракта в наукограде пос. Кольцово показали ряд моментов, которые отрицательно скажутся на экономике региона, в том числе колоссальные затраты на ликвидацию последствий теракта – более 10 млрд рублей [42].

В настоящее время широко признается, что наибольшую опасность для использования ПБА в преступных целях представляют люди, имеющие разрешенный доступ к ним [37]. В ходе моделирования было показано, что сценарии самого высшего

и высокого риска представляют попытки сотрудников организации, и в меньшей степени посетителей и внешних работников с ограниченным допуском, скрытно украсть ПБА или секретную информацию о них. Следовательно, надежность персонала имеет главное значение для эффективной программы по биобезопасности в любом учреждении и в любой стране.

Учитывая возможные неблагоприятные последствия для общества неквалифицированных, непреднамеренных или преднамеренных несанкционированных действий персонала, имеющего допуск к работе с ПБА, актуальным и приоритетным направлением становится разработка общих критериев, позволяющих регламентировать влияние человеческого фактора на техногенную сферу.

Таковыми критериями могут быть показатели профессиональной надежности работника и риска ее снижения.

Профессиональная надежность – это динамическая социально-биологическая характеристика работающего человека, количественно отражающая реализуемую им в профессиональной деятельности способность выполнять предписанные должностные функции в штатных и нештатных условиях протекания технологического процесса своевременно и с заданным качеством при условии сохранения своего профессионального здоровья в социально заданных границах [11].

Анализ действующих нормативных и методических документов, регламентирующих обеспечение биобезопасности работ с ПБА в режиме штатной деятельности стационарных лабораторий и в мобильных лабораториях специализированных противоэпидемических бригад при ликвидации чрезвычайных ситуаций [2, 21, 23, 30, 31, 34], показал наличие определенных требований к лицам, допускаемым к работе, в том числе уровень образования, переподготовка на специализированных курсах; ряда требований к профессиональному здоровью. Отдельные положения косвенно определяют необходимость наличия у работников конкретных профессионально важных качеств (ПВК). Вместе с тем в национальных нормативах отсутствуют требования, методология и методы количественной оценки надежности «человеческого фактора» при работе с ПБА. Полученные сведения позволяют сформулировать комплексный подход к подготовке специалистов, который должен базироваться на отборе кандидатов при приеме на работу, профессиональной подготовке, мониторинге профессионального здоровья и медицинских профилактических мероприятий, а также оценке надежности деятельности каждого сотрудника и коллектива в целом [8, 15]. Причем оценка надежности профессиональной деятельности определена как интегральный показатель, для которого в качестве профессиональных характеристик предполагается использование базисных компонент «профессиональная подготовленность» (ПП или БК₁), «профессиональная успеш-

ность» (ПУ или БК₂), «профессиональное здоровье» (ПЗ или БК₃).

Профессиональная подготовленность работника – подготовленность работника, характеризующаяся совокупностью показателей, определяющих наличие профессиональных знаний и навыков, необходимых для безопасного, качественного и эффективного выполнения должностных обязанностей.

В структуру профессиональной подготовленности входит теоретическая подготовка, приобретение практических навыков выполнения манипуляций с ПБА в соответствии с должностными обязанностями, культура безопасности. Показателем является отнесение работника к определенному классу профессиональной подготовленности (табл. 1).

Профессиональная успешность работника – свойство работника, определяющее его способность обеспечивать выполнение возложенных на него функций на рабочем месте, в течение рабочего времени в определенных условиях.

В структуру профессиональной успешности входит совокупность ПВК, обеспечивающих эффективную профессиональную деятельность. Показателем является отнесение работника к определенному классу профессиональной успешности (табл. 1).

Профессиональная подготовленность и профессиональная успешность работающих с ПБА оцениваются с использованием тестов и анкеты экспертной оценки профессиональной адаптации, разработанной сотрудниками Федерального медицинского биофизического центра им. А.И.Бурназяна с учетом профессиографического описания деятельности и ПВК врачей-бактериологов, научных сотрудников, лаборантов, дезинфекторов, руководителей подразделений, имеющих допуск к работе с ПБА, выделенных сотрудниками отдела образовательных программ и подготовки специалистов РосНИПЧИ «Микроб».

Профессиональное здоровье работника – здоровье работника, оцениваемое соответствием его медицинских и психофизиологических показателей требованиям профессиональной деятельности [11].

В структуру профессионального здоровья входят рабочее актуальное состояние, психическая адаптация, профессионально значимые заболевания

и длительность временной утраты трудоспособности. Показателем является отнесение работника к определенному классу профессионального здоровья (табл. 1).

Актуальность оценки надежности профессиональной деятельности персонала в настоящее время возросла в связи с:

- увеличением сложности и большей интенсивностью диагностической и экспериментальной деятельности с использованием ПБА;
- увеличением объема научных и прикладных исследований в области биотехнологии, получением и широким использованием в различных сферах генно-инженерно-модифицированных микроорганизмов;
- внедрением в учреждениях медико-биологического профиля современного защитного оборудования и средств индивидуальной защиты [2, 3, 5, 14];
- риском возникновения антропогенных аварий при осуществлении работ с ПБА, увеличением за последние годы случаев внутрилабораторных заражений, в т.ч. с летальным исходом [3, 12, 16, 41, 42, 45];
- нарушением преемственности поколений в коллективах за последние 15 лет вследствие снижения престижности работы в учреждениях медико-биологического профиля, в т.ч. по причине низкой оплаты труда и отмены ранее существующих льгот;
- регистрацией случаев нарушения правил и порядка обеспечения физической защиты, хранения, обращения, утилизации опасных объектов и материалов [10, 31].

В условиях, требующих повышенной готовности противодействия угрозе биотерроризма, задача оценки надежности деятельности персонала потенциально опасных объектов приобретает еще и несомненную профилактическую направленность.

Рассмотрение проблемы надежности персонала, допускаемого к работам с ПБА, определяет необходимость оценки риска (вероятности) ее снижения. В настоящее время во многих странах разрабатывается идеология противодействия катастрофам и государственная стратегия управления ими, основным инструментарием которой является оценка рисков. В России концепция оценки рисков, как приоритетное направление в обеспечении безопасности учреждений, осуществляющих деятельность с использованием ПБА, была отражена в законодательных документах [18, 19], проблемных статьях [26–28, 40] и федеральных целевых программах [43, 44].

В целях предупреждения опасных нарушений и аварий, снижения неблагоприятных последствий в случае возможных аварий на объектах, использующих в своей деятельности ПБА, предусмотрена система инженерно-технических средств защиты [2, 8, 14]. Выбор уровней, их числа и барьеров в этой системе осуществляется на основе детерминистических и вероятностных подходов с учетом существующих неопределенностей в оценке состава исходных событий, аварийных последовательностей, частот событий и последствий аварий [9]. Проводится боль-

Таблица 1

Градации базовых компонент профессиональной надежности и их оценка

Градации базовой компоненты БК _i *	Ранг (баллы)
Высокий	1
Выше среднего	2
Средний	3
Ниже среднего	4
Низкий	5

* где i – 1, 2, 3 и соответственно БК₁ – профессиональная подготовленность, БК₂ – профессиональная успешность, БК₃ – профессиональное здоровье.

шая работа по совершенствованию нормативно-правовой базы по обеспечению безопасности учреждений [2, 13, 17–25, 30–36, 39, 44]. Однако все это касается надежности инженерно-технических систем, организационных и контрольных мероприятий. Методологические вопросы антропогенных рисков при работах с ПБА в настоящее время находятся в стадии разработки.

Риск – это вероятность причинения вреда жизни или здоровью граждан, имуществу физических или юридических лиц, государственному или муниципальному имуществу, окружающей среде, жизни или здоровью животных и растений с учетом тяжести этого вреда [22]. Данное понятие является междисциплинарным, но трактуется по-разному в силу исторически сложившихся взглядов на эту проблему в конкретных (технической, гуманитарной, правовой, экономической, естественно-научной и др.) областях человеческих знаний. Подобное отношение распространяется и на связанные с ним производные понятия. По нашему мнению, *риск нарушения профессиональной надежности работающего с ПБА* – это количественная характеристика угрозы безопасности предприятию со стороны работника в процессе профессиональной деятельности, обусловленная несоответствием его социально-биологических характеристик требованиям профессиональной деятельности, антропогенной уязвимости оборудования и технологических процессов.

В приведенном определении отражены основные характеристики риска: наличие источника риска – несоответствие, даже кратковременное (на период смены), социально-биологических характеристик работника требованиям деятельности, наличие путей воздействия источника риска на какой-либо объект – профессиональная деятельность с испол-

зованием ПБА, уязвимость объекта деятельности – уровень защищенности оборудования и технологических процессов, не обеспечивающий абсолютную их безопасность.

Оценку риска нарушения профессиональной надежности работающих с ПБА предлагается проводить с использованием классификационных признаков, приведенных в табл. 2.

Величина риска нарушения каждой из базовых компонент профессиональной надежности определяется через индекс риска (ИР):

$$\begin{aligned} \text{ИР_ПП} &= \text{ПП} \cdot P_1, \text{ баллы} \\ \text{ИР_ПУ} &= \text{ПУ} \cdot P_2, \text{ баллы} \\ \text{ИР_ПЗ} &= \text{ПЗ} \cdot P_3, \text{ баллы,} \end{aligned}$$

где P_1, P_2, P_3 – вероятность реализации риска при их нарушении.

Индексы риска строятся исходя из существующих представлений, согласно которым они представляют собой произведение величины ущерба на вероятность возникновения неблагоприятного события, с обязательной адаптацией к условиям работ с ПБА. В общем случае ущерб для профессиональной надежности работника определяется потерей (нарушением) профессиональной подготовленности, профессиональной успешности и профессионального здоровья. Эти характеристики являются первыми сомножителями в индексах риска. Вторые сомножители – характеристики того, насколько близка к реализации возможность появления нерегламентированных действий работника при нарушениях ПП, ПУ и ПЗ. Введенные таким образом индексы риска повышаются при увеличении потерь (что достигается выбором ранговых оценок базовых компонент профессиональной надежности согласно табл. 1) и

Таблица 2

Общая классификация рисков нарушения профессиональной надежности работающих с ПБА

Классификационный признак	Виды рисков
Вид риска	Риск нарушения профессиональной подготовленности Риск нарушения профессиональной успешности Риск нарушения профессионального здоровья Риск нарушения профессиональной надежности
Уровни риска	Игнорируемый Незначительный Умеренный Существенный Критический
Классы базовых компонент профессиональной надежности (БК ₁ , БК ₂ , БК ₃)	Высокий Выше среднего Средний Ниже среднего Низкий
Вероятность реализации риска	Игнорируемая Слабо вероятная Мало вероятная Вероятная Почти возможная
Уровень социальной допустимости риска	Приемлемый Социально допустимый Недопустимый

Таблица 3

Градации вероятности реализации рисков, их описание и оценка

Вероятность реализации	Оценка вероятности реализации риска (P _i *)	
	Ранг P (баллы)	Качественное описание
Игнорируемая	1	Событие** не может произойти
Слабо вероятная	2	Событие может произойти в исключительных случаях
Мало вероятная	3	Наличие неявных косвенных свидетельств о возможности возникновения события
Вероятная	4	Наличие явных косвенных свидетельств о возможности возникновения события
Почти возможная	5	Событие скорее всего произойдет

* где i – 1, 2, 3.

** Под *событием* понимается возникновение какого-либо нарушения по вине работника.

вероятности реализации риска. Вероятность реализации рисков оценивается экспертным путем, исходя из табл. 3.

Оценка выставляется экспертом с учетом степени влияния на безопасность эксплуатации учреждения выполняемых конкретным сотрудником видов работы, прямых или косвенных данных о допущенных им ранее нарушениях. В качестве экспертов выступают: при оценке профессиональной подготовленности – специалисты подразделений, занимающиеся подготовкой специалистов, члены учрежденческой комиссии по биобезопасности или непосредственные руководители работника; профессиональной успешности – непосредственные руководители работника; профессионального здоровья – сотрудники медицинского подразделения учреждения (здравпункт, медсанчасть и др.).

Оценку риска нарушения базовых компонент профессиональной надежности работника предполагается проводить с использованием матрицы рисков (табл. 4), позволяющей по сочетанию характеристик «базовая компонента профессиональной надежности – вероятность реализации риска» оценить уровень риска нарушения базовой компоненты. В ячейках матрицы риска стоят уровни риска (УР): 1 – игнорируемый, 2 – незначительный, 3 – умеренный, 4 – существенный, 5 – критический.

Например, если профессиональная подготовленность работника оценивается как вышесредней (ПП = 2 балла), вероятность возникновения нарушений в профессиональной деятельности как игнорируемая (P₁ = 1 балл), то по матрице риска это соответствует игнорируемому риску нарушения профессиональной подготовленности (УР=1). Если при той же профессиональной подготовленности у эксперта есть свидетельства о случаях не реализации работником полученных знаний и навыков в практической деятельности (P₁=4 балла), то это повышает риск нарушения до существенного (УР=4).

Поскольку любой риск должен оцениваться с позиций его социальной допустимости, то для работающего с ПБА уровни риска 1 (игнорируемый), 2 (незначительный) можно считать приемлемыми (УР ≤ 2). Это соответствует изменению базовой компоненты от среднего до высокого уровней и вероятности реализации риска от игнорируемой до маловероятной. При уровне риска 3 (умеренный риск) уровень социальной допустимости риска является *социально допустимым* (УР = 3). При этом базовая компонента может изменяться от высокого до нижесреднего уровня, а вероятность реализации риска от игнорируемой до вероятной. Уровни риска 4 (существенный) и 5 (критический) являются *социально недопустимыми* (4 ≤ УР ≤ 5). Это соответствует уровню изменения базовой компоненты от низкого до нижесреднего и вероятности реализации риска от вероятной до почти возможной.

Для оценки риска нарушения профессиональной надежности работника вычисляется средневзвешенный индекс риска (СВР):

СВР=0,25·ИР_ПП+0,3·ИР_ПУ+0,45·ИР_ПЗ, баллы

СВР=0,25·ИР_ПП+0,3·ИР_ПУ+0,45·ИР_ПЗ, баллы

Таблица 4

Матрица рисков

Вероятность реализации риска (P _i *)	Уровни базовой компоненты профессиональной надежности (БК _i *)				
	Высокий (1 балл)	Выше среднего (2 балла)	Средний (3 балла)	Ниже среднего (4 балла)	Низкий (5 баллов)
Игнорируемая (1 балл)	1	1	2	3	4
Слабо вероятная (2 балла)	1	2	3	4	4
Мало вероятная (3 балла)	2	3	3	4	4
Вероятная (4 балла)	3	4	4	4	5
Почти возможная (5 баллов)	4	4	4	5	5

* где i – 1, 2, 3.

Классификация уровней риска нарушения профессиональной надежности

Уровень риска	Ранг (баллы)	СВР (баллы)	Степень влияния на безопасность эксплуатации предприятия
Игнорируемый	1	$1 \leq \text{СВР} \leq 6,3$	Действия работника будут проходить согласно должностным инструкциям
Незначительный	2	$6,3 < \text{СВР} \leq 11,3$	Действия работника могут привести к незначительным нарушениям, не влияющим на безопасность эксплуатации предприятия
Умеренный	3	$11,3 < \text{СВР} \leq 16$	Действия работника могут привести к отдельным нарушениям, не влияющим на безопасность эксплуатации предприятия
Существенный	4	$16 < \text{СВР} \leq 20,5$	Действия работника могут привести к нарушениям, влияющим на безопасность эксплуатации предприятия
Критический	5	$\text{СВР} > 20,5$	Действия работника могут привести к инцидентам, влияющим на безопасность предприятия

В СВР наибольший вес (0,45) имеет индекс риска нарушения профессионального здоровья (ИР_ПЗ) как наиболее лабильный из всех базовых компонент профессиональной надежности. Далее по значимости располагаются индекс риска нарушения профессиональной успешности (вес 0,3) и индекс риска нарушения профессиональной подготовленности (вес 0,25). Значения весовых коэффициентов определяли с использованием метода анализа иерархий. Чем меньше вес индекса риска, тем меньше вклад компоненты в нарушение профессиональной надежности. ПП и ПУ конкретного работника достаточно стабильные характеристики, а ПЗ (особенно такая его составляющая как актуальное состояние) – лабильная характеристика, и именно ею во многом определяется допустит человек ошибку в работе или нет.

«Точечные» границы разделения уровней риска приведены в табл. 5.

Согласно приведенным данным, риск нарушения профессиональной надежности является игнорируемым при $1 \leq \text{СВР} \leq 6,3$, незначительным – при $6,3 < \text{СВР} \leq 11,3$, умеренным – при $11,3 < \text{СВР} \leq 16$, существенным – при $16 < \text{СВР} \leq 20,5$, критическим – при $\text{СВР} > 20,5$ баллов.

Игнорируемый и незначительный уровень риска являются социально приемлемыми, умеренный – социально допустимым, существенный и критический – социально недопустимыми.

Таким образом, в данной работе продемонстрирована возможность введения количественной меры оценки надежности профессиональной деятельности специалиста, работающего с ПБА, и риска ее снижения. Результатом является определение для каждого работника уровня риска (вероятности) снижения надежности профессиональной деятельности, выявления определенной БК как вероятной причины процесса и разработка алгоритма действия для предотвращения реализации риска.

В заключении необходимо отметить, что степень потребности общества в прогнозировании профессиональной надежности работающих во многом определяется складывающейся конъюнктурой: состоянием социально-экономического и политического развития, характеристикой людского ресурса и наличи-

ем контингента для выбора, потребностью общества в тех или иных специалистах и профессиях, ролью «личного» фактора в профессиональной деятельности и т.д. Поэтому, как показывает история, интерес к проблеме оценки профессиональной пригодности, ее прогнозированию, а также к масштабам исследований и практического применения психодиагностики способностей переживает периодические подъемы и спады. Однако это не должно относиться к оценке надежности персонала и организации, использующей в своей деятельности (экспериментальной, диагностической, лечебной, производственной) возбудители инфекционных заболеваний, представляющие опасность для окружающих [25]. Разработка и внедрение оценки риска нарушения профессиональной надежности работника/коллектива, осуществляющего деятельность с ПБА, в частности I–II групп, актуальна и приоритетна для совершенствования системного обеспечения профессиональной подготовки (подбор и обучение кадров, медицинские мероприятия, профессиональная адаптация) с целью увеличения безопасности функционирования организации, сведения к минимуму вероятности появления ошибок, приводящих к авариям, сохранения профессионального здоровья, а также санитарно-эпидемиологического благополучия населения и окружающей среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безопасность в чрезвычайных ситуациях. Термины и определения основных понятий. ГОСТ Р 22.0.02-94. М.: Госстандарт России; 1995.
2. Безопасность работ с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). Санитарные правила. СП 1.3.1285-03.
3. Безсмертный В.Е., Иванова С.М., Филатов Н.Н. и др. Определение подходов к обеспечению биологической безопасности населения крупного города на примере Москвы. Пробл. особо опасных инф. 2006; 92:35–8.
4. Бодров В.А. Психология профессиональной пригодности. М.: ПЕР СЭ; 2001. 511 с.
5. Буянов В.В., Супрун И.П. Средства индивидуальной защиты для работ в микробиологических и вирусологических лабораториях. Черноголовка; 2001. 324 с.
6. Воробьев А.А., Боев Б.В., Бондаренко В.М., Гинцбург А.П. Проблемы биотерроризма в современных условиях. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2002; 3:3–12.
7. Временные территориальные объемы оказания медицинской помощи взрослому населению Саратовской области по специальности «инфекционные болезни»: справочно-практическое пособие. Саратов: Изд-во ГОУ ВПО «Саратовская государственная академия права»; 2005. 116 с.
8. Дроздов С.Г., Гарин Н.С., Джинджоян Л.С. и др. Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологиче-

- ских лабораториях. М.: Медицина; 1987. 256 с.
9. *Ежов И.Н., Яшецкий Ю.И., Ляпин М.Н., Дроздов И.Г.* Разработка системы моделирования и оценки опасных работ на объектах медико-биологического профиля. Пробл. особо опасных инф. 2008; 2(96):15–20.
10. Лихорадка Эбола (инцидент с транспортировкой генетического материала). Канада. 19.05.2009. <http://www.news.ru.com/world/14may2009/laborantprint.htm>.
11. *Инатов П.П., Мартенс В.К., Сорокин А.В.* и др. Профессиональная надежность персонала АЭС: Концепция и технология количественной оценки, практика управления. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2003. 232 с.
12. Ковалева Е.П., Семина Н.А. Лабораторно-ассоциированные инфекции. Эпидемиол. и вакцинопрофилактика. 2006; 1(26):45–47.
13. Концепция биологической безопасности государственных участников СНГ: решение Совета по сотрудничеству в области здравоохранения государств-участников СНГ от 15.03.2007 г.
14. *Лелешкин Г.Н.* Обеспечение биобезопасности микробиологических объектов. Мол. медицина. 2006; 3:19–24.
15. *Малюкова Т.А., Ляпин М.Н., Кутырев В.В.* Совершенствование подготовки персонала в целях обеспечения биобезопасности работ с патогенными биологическими агентами. Пробл. особо опасных инф. 2007; 1:33–38.
16. *Мохель Р.* Лаборатория смерти. Террорист туда не проникнет. Выпустить на волю суперчуму может «человеческий фактор». Московский комсомолец. 2005; 1 марта. С. 5.
17. О лицензировании отдельных видов деятельности. ФЗ № 128 от 10 августа 2001 г.
18. О промышленной безопасности опасных производственных объектов. ФЗ № 116 от 21.07.97.
19. О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения. ФЗ № 52 от 30.03.99 г.
20. О совершенствовании государственного санитарно-эпидемиологического надзора по противодействию угрозе биотерроризма. Постановление от 05.09.05 г. № 21.
21. О совершенствовании организации работы специализированных противоэпидемических бригад, сформированных на базе ФГУЗ «Научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора. Приказ Роспотребнадзора от 20.07.2007 № 225.
22. О техническом регулировании. ФЗ № 184 от 27.12.02.
23. Об организации и проведении мероприятий по профилактике чумы. Приказ МЗ РФ от 19.01.04 № 7.
24. Об утверждении Требований по предупреждению чрезвычайных ситуаций на потенциально опасных объектах и объектах жизнеобеспечения. Приказ МЧС РФ от 28.02.03 № 105.
25. Об утверждении перечня социально значимых заболеваний и перечня заболеваний, представляющих опасность для окружающих / Пост. Правительства РФ № 715 от 1 декабря 2004 г.
26. *Онищенко Г.Г.* Концепция риска и ее место в системе социально-гигиенического мониторинга (проблемы и пути решения). Вестник РАМН. 2005; 11:27–33.
27. *Онищенко Г.Г.* О мерах по обеспечению биологической безопасности на территории Российской Федерации. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2008; 5:54–7.
28. *Онищенко Г.Г., Дроздов И.Г., Малюкова Т.А.* и др. Нормирование как элемент системы обеспечения безопасности работ с биологическими агентами I–II групп патогенности. Пробл. особо опасных инф. 2005; 2(90):5–11.
29. *Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Немесов С.В., Мартынюк Р.А.* Биотерроризм: национальная и глобальная угроза. Вестник РАН. 2003; 73(3):195–204.
30. Основы государственной политики в области обеспечения безопасности населения Российской Федерации и защищенности критически важных и потенциально опасных объектов от угрозы техногенного, природного характера и террористических актов, утв. 28.09.2006.
31. Основы государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2010 года и дальнейшую перспективу. Пр-2194 от 04.12.03.
32. Положение о государственной регистрации генно-инженерно-модифицированных организмов. Постановление Правительства РФ от 16.02.01 № 120.
33. Положение о лицензировании деятельности, связанной с возбудителями инфекционных заболеваний. Пост. Правительства РФ от № 31 от 22.01.2007
34. Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека I–IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами. Санитарно-эпидемиологические правила. СП 1.2.1318-03. М.: Минздрав России; 2003. 39 с.
35. Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности. Санитарные правила. СП 1.2.036-95. М.: Госкомсанэпиднадзор России; 1996. 80 с.
36. Правила сбора, хранения и утилизации отходов ЛПУ. Санитарные правила и нормы. СанПин 2.1.7.728-99. М.: Минздрав России; 1999. 9 с.
37. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораториях. Третье изд. ВОЗ; 2004. 190 с.
38. Противодействие биотерроризму и биологическая безопасность: Учеб. пособие для студентов медицинских вузов. Иркутск: РИО ГУ НЦ РХВ ВСНЦ СО РАМН; 2006. 138 с.
39. Разработка технических (общих и специальных) регламентов по биобезопасности. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 06.11.04 № 1421-р.
40. *Рахманин Ю.А., Демин В.Ф., Иванов С.И.* Общий подход к оценке, сравнению и нормированию риска для здоровья человека в зависимости от различных факторов среды обитания. Вестник РАМН. 2006; 4:5–9.
41. *Семина Н.А., Ковалева Е.П.* Заболевания медицинских работников особо опасными инфекциями, ассоциированные с лабораторными заражениями. Эпидемиол. и вакцинопрофилактика. 2005; 1(20):23–6.
42. *Ставский Е.А.* Совершенствование системы обеспечения безопасности работ с вирусами I–II групп патогенности. [автореф. дис. ... д-ра мед. наук]. Кольцово; 2008. 58 с.
43. Федеральная целевая программа «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 гг.)».
44. Федеральная целевая программа «Снижение рисков и смягчение последствий чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера в Российской Федерации на период до 2010 года».
45. *Храмов В.Н.* Некоторые особенности клинико-лабораторного обследования на чуму [дис. ... канд. мед. наук]. Саратов; 1994. 125 с.

T.A. Maluykova, A.F. Bobrov, V.Yu. Scheblanov, L.A. Tikhomirova, A.V. Boiko, A.V. Toporkov

Methodological Background of the Assessment of Reliability of the Professional Activity of the Personnel Working with PBA of Pathogenicity Groups I–II

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov; A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow

Considered was the actuality of investigations to assess the reliability of occupational activity of personnel authorized to work with PBA of I–II groups. The methodological approaches and assessment criteria were developed on the base of existing regulatory documents on the work safety and complex approach to personnel training.

Key words: microorganisms of pathogenicity groups I–II, pathogenic biological agents, biological safety, assessment of the risk of disturbance of professional activity reliability.

Об авторах:

Малюкова Т.А., Тихомирова Л.А., Бойко А.В., Топорков А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru
Бобров А.Ф., Шебланов В.Ю. Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И.Бурназяна. Москва, ул. Маршала Новикова, 23.

Authors:

Maluykova T.A., Tikhomirova L.A., Boiko A.V., Toporkov A.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru
Bobrov A.F., Scheblanov V.Yu. A.I. Burnazyan Federal Medical Biophysical Center. Moscow, Marshala Novikova St., 23.

Поступила 24.07.09.

Н.В.Попов¹, Е.В.Куклев¹, В.П.Топорков¹, А.К.Адамов¹, С.А.Щербакова¹, О.В.Малецкая²,
А.И.Ковтунов⁶, К.Б.Яшкуллов⁵, В.В.Кабин³, А.В.Подсвиров⁴, А.И.Кологоров¹, А.А.Кузнецов¹,
А.Н.Матросов¹, Т.В.Князева¹, М.П.Григорьев², В.Б.-Х.Санджиев⁴, В.П.Осипов³, Н.В.Пискунова⁶,
Г.В.Сангаджиева⁴

СОЧЕТАННЫЕ ПРИРОДНЫЕ ОЧАГИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ, РИККЕТСИОЗНЫХ И ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ В РЕГИОНЕ СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО ПРИКАСПИЯ

¹ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов;

²ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»; ³ФГУЗ «Астраханская противочумная станция»; ⁴ФГУЗ «Элистинская противочумная станция»; ⁵Управление Роспотребнадзора по Республике Калмыкия, Элиста; ⁶Управление Роспотребнадзора по Астраханской области, Астрахань

Обосновано наличие сочетанных природных очагов чумы, туляремии, Крымской геморрагической лихорадки, лихорадки Западного Нила, Астраханской пятнистой лихорадки в регионе Северо-Западного Прикаспия. Отмечена роль антропогенных и климатических факторов в формировании сочетанных природных очагов инфекционных болезней бактериальной, риккетсиозной и вирусной этиологии, выполнена оценка современной потенциальной эпидемической опасности рассматриваемых территорий.

Ключевые слова: эпидемиологический надзор, эпизоотологический мониторинг, сочетанные природные очаги, регион Северо-Западного Прикаспия, бактериальные, риккетсиозные и вирусные инфекционные болезни, потенциальная эпидемическая опасность территории, заболеваемость.

В последнее десятилетие (1999–2008 гг.), несмотря на отсутствие заболеваний чумой (с 1979 г.), в регионе Северо-Западного Прикаспия имеет место спорадическая заболеваемость туляремией, Крымской геморрагической лихорадкой (КГЛ), Астраханской пятнистой лихорадкой (АПЛ), лихорадкой Западного Нила (ЛЗН). В отдельные годы отмечена групповая (2005–2008 гг. по КГЛ) и вспышечная (1999 г. – по ЛЗН) заболеваемость [4, 5, 6, 8].

На территории региона Северо-Западного Прикаспия в границах Астраханской, Волгоградской, Ростовской областей, Ставропольского края, Республики Калмыкия и Республики Дагестан располагаются Прикаспийский Северо-Западный степной (14) и Прикаспийский песчаный (43) природные очаги чумы [7]. Для Прикаспийского Северо-Западного степного природного очага чумы (14), площадь которого составляет 65500 кв.км, характерна периодическая эпизоотическая активность (индекс эпизоотичности – 0,31). В период с 1913 по 1938 год эпизоотии регистрировались здесь практически ежегодно. В 1932–1934 гг. эпизоотии чумы также отмечались в популяциях домовых мышей в пойме Волги в осенне-зимний период. После 35-летнего перерыва в 1972–1973 гг. в центральной части Ергенинской возвышенности вновь зарегистрированы эпизоотии чумы среди малых сусликов. В 1988–1991 гг. на границе с Прикаспийским песчаным очагом на территории Яшкульского и Юстинского районов Калмыкии регистрировали единичные находки зараженных чумой грызунов и их блох. С 1991 г. Прикаспийский Северо-Западный степной природный очаг чумы находится в состоянии межэпизоотического периода. За период наблюдений 1913–2009 гг. в целом по очагу эпизоотическая площадь составила 1554 тыс. га (23,7 % территории).

Повторные проявления чумы отмечены только на Ергенинской возвышенности (3 сектора, составляющие 0,4 % от общей площади очага). В недалеком прошлом очаг характеризовался высокой эпидемической активностью. Заболевания чумой среди людей регистрировали здесь с 1878 по 1935 гг. Всего за этот период отмечен 1441 больной с первичными заражениями (охота, сельхозработы в степи) в 193 пунктах и 174 заносных случая (десятки километров) в 19 пунктах. Большое число больных наблюдалось на территории Волгоградской, Ростовской областей и Ставропольского края на удалении до 100 км от современных границ очага [12]. В настоящее время вследствие глубокой многолетней депрессии численности малого суслика и отсутствия эпизоотий чумы на территории Прикаспийского Северо-Западного степного природного очага (с 1991 г.) исчезли факторы (высокая численность сусликов и их блох, развитие эпизоотий чумы), обуславливающие в прошлом столетии его высокий эпидемический потенциал. Последнее служит аргументом в пользу того, что в сложившейся ситуации эпидемические события прошлых лет (20–30-е годы XX века) не определяют уровень современной эпидемической опасности отдельных участков этого очага. Учитывая, что ранее выделение территорий с высоким и очень высоким уровнем эпидемической опасности выполнено на основании эпидемиологических данных прошлого столетия, в настоящее время значение их эпидемического статуса снижено до среднего уровня [10].

Прикаспийский песчаный очаг (43) в качестве самостоятельного выделен в юго-восточной части энзоотического по чуме региона Северо-Западного Прикаспия в 1987 г. Очаг является самым крупным в Российской Федерации и расположен на террито-

рии, примыкающей к северо-западному побережью Каспийского моря от Волги до Терека, площадью 71950 кв. км. Административно территория очага охватывает часть Калмыкии, Астраханской области, Ставропольского края, Дагестана и Чечни.

Очаг со средней эпизоотической активностью (ИЭ – 0,53). Наиболее крупные волны проявлений чумы на грызунах отмечались в 1923–1925, 1928–1929, 1935–1936, 1946–1954, 1979–2000 гг. С 1979 г. по настоящее время эпизоотии регистрируются, с кратковременным перерывом в 2007–2008 гг., в разных частях очага. Эпизоотическая площадь достигает 1962 тыс. га, что составляет 27,3 % его общей площади. Общая площадь зоны со стойким сохранением возбудителя чумы в разные эпизоотические циклы оценивается в 260 тыс. га (3,4 %). Эпидемические проявления в современных границах Прикаспийского песчаного очага регистрировались в 1923–1924, 1935–1936, 1947–1948 и 1979 гг. Число заболевших чумой составило 82 человека в 13 населенных пунктах. Большинство вспышек наблюдалось в центральных и восточных районах Прикаспийского песчаного очага, и их происхождение было связано с развитием эпизоотий чумы среди песчанок и мышевидных грызунов.

В последние десятилетия в различных частях энзоотичной по чуме территории Северо-Западного Прикаспия отмечена активизация природных очагов туляремии, Крымской геморрагической лихорадки, лихорадки Западного Нила, Астраханской пятнистой лихорадки. В текущем десятилетии этот процесс протекал на фоне потепления климата, которое способствовало во многом расширению видового спектра и численности иксодовых клещей, в первую очередь, *Hyalomma marginatum* – основного переносчика возбудителя ККГЛ [8, 10]. Повсеместный рост численности иксодовых клещей обусловлен также резким снижением объемов проводимых здесь акарицидных мероприятий. В условиях снижения антропогенной нагрузки на первичные природные комплексы, вследствие резкого сокращения поголовья мелкого и крупного рогатого скота, здесь отмечена тенденция восстановления первичного растительного покрова и, как следствие, увеличение численности мышевидных грызунов в открытых биотопах. Отмечаемая трансформация биоценологических комплексов способствовала формированию общей паразитарной системы бактериальных и вирусных инфекций, привела к формированию сочетанных природных очагов чумы, туляремии, КГЛ на всей территории региона Северо-Западного Прикаспия. На территориях, прилегающих к пойме Волги и Ахтубы, сформировались, дополнительно, сочетанные природные очаги ЛЗН и АПЛ. Имеются все условия для формирования природных очагов ЛЗН на территории Кумо-Манычской впадины.

В современный период наиболее выраженные негативные эпидемиологические последствия роста численности иксодовых клещей и мышевидных

грызунов отмечены в зонах орошаемого земледелия, где также имеет место интенсивное расселение тамарисковой песчанки [14]. В частности, в 80–90-х годах прошлого столетия на территории Республики Калмыкия, вследствие ирригации территорий Сарпинской низменности и Черных земель, произошло возникновение новых участков природной очаговости туляремии. Причем наиболее стойкий характер проявления инфекции отмечен в северных районах Ергенинской возвышенности (Малодербетовский, Сарпинский районы), в Сарпинской низменности (Октябрьский район), на Черных Землях и в долинах Восточного (Черноземельский, Яшкульский районы) и Западного Маныча (Городовиковский, Яшалтинский, Приютненский районы). Продолжающие функционировать на северо-западе и юго-западе Республики Калмыкия участки степного очага также изменили свою биоценологическую структуру, в первую очередь за счет расширения видового спектра иксодовых клещей [10]. Кроме того, вследствие ирригации территорий произошло внедрение многих видов грызунов и их эктопаразитов, характерных для степных зон, в полупустынные и пустынные районы. В то же время пустынные и полупустынные виды, являющиеся основными носителями чумы, – малые суслики и песчанки стали принимать активное участие в эпизоотиях туляремии. Все это в целом привело к расширению и активизации природных очагов туляремии на энзоотичных по чуме территориях Республики Калмыкия. При этом высокая численность мышевидных грызунов в зонах ирригации и орошения, в первую очередь синантропных видов, значительно увеличивает здесь риск заражения человека особо опасными инфекционными болезнями. Наличие сочетанных природных очагов чумы и туляремии отмечено также на территории Ставропольского края (Апанасенковский, Арзгирский, Буденовский, Кировский, Курский, Левокумский, Советский, Туркменский районы).

Как уже отмечалось выше, вследствие увеличения численности и площади распространения иксодового клеща *Hyalomma marginatum* – основного переносчика возбудителя ККГЛ [8], эпидемическая обстановка по КГЛ резко обострилась на энзоотичных по чуме территориях Астраханской области, Ставропольского края и Республики Калмыкия. В частности, в 1999–2008 гг. на всей территории Астраханской области зарегистрированы заболевания КГЛ (118 случаев), с наиболее высоким уровнем заболеваемости населения в Енотаевском, Харабалинском и Приволжском районах. На территории Калмыкии (Городовиковский, Яшалтинский, Приютненский, Целинный, г. Элиста, Ики-Бурульский, Кутченеровский, Сарпинский, Яшкульский, Черноземельский, Лаганский, Малодербетовский районы) в 2000–2008 гг. зарегистрирован 241 случай заболевания КГЛ. К территориям с наиболее высокой потенциальной эпидемической опасностью по КГЛ отнесены террито-

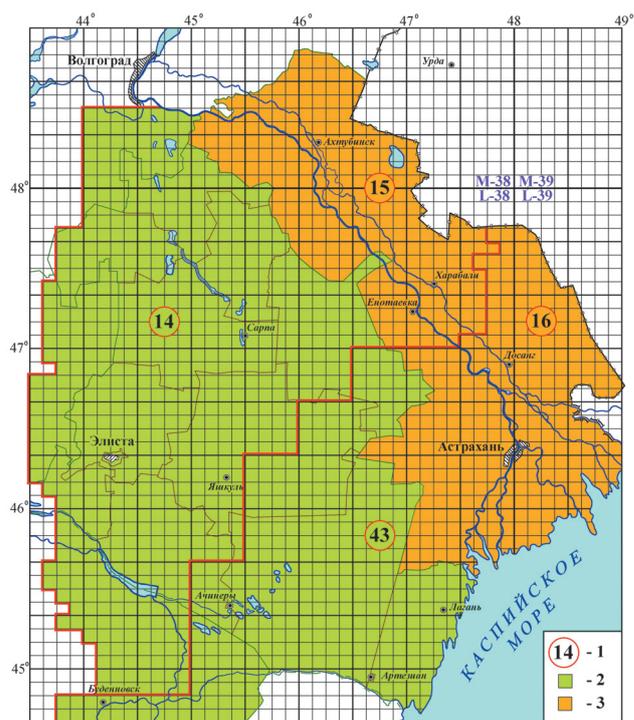
рии Ергенинской возвышенности, Восточного и Западного Маныча. На территории Ставропольского края (Апанасенковский, Арзgirский, Буденовский, Курский, Левокумский, Нефтекумский, Советский, Степновский, Туркменский районы) – 270 случаев заболевания КГЛ. Причем наиболее напряженная эпидемическая обстановка по КГЛ сложилась в Нефтекумском районе (88 случаев).

Антигены вируса ККГЛ выявлены при исследовании фоновых видов иксодовых клещей на всей рассматриваемой энзоотичной по чуме территории. Существенно, что в период 1999–2008 гг. в Прикаспийском песчаном очаге (43) неоднократно регистрировали одновременную циркуляцию возбудителей чумы и ККГЛ в Лиманском районе (2002, 2003, 2006 гг.).

В период 1997–2006 гг. на территории Астраханской области также зарегистрирован 341 случай лихорадки Западного Нила. Наиболее высокий риск заражения ЛЗН отмечен для территорий Астрахани, Наримановского и Приволжского районов. Результаты исследования комаров, клещей и грызунов, добытых на территории Астраханской области в 2000–2003 гг., также подтверждают наличие здесь природных очагов ЛЗН. В период 1997–2006 гг. на территории Прикаспийского песчаного очага чумы (43) отмечена одновременная циркуляция возбудителей чумы и ЛЗН в Лиманском районе (2000–2002, 2004, 2005 гг.). Кроме того, в 1997–2006 гг. на территории Астраханской области выявлено 29 случаев других лихорадок – Тягиня, Инко, Синдбис, Батаи, Бханджа [1, 2]. На территории Ставропольского края антиген вируса ЛЗН неоднократно регистрировали в пробах полевого материала с территориями Нефтекумского, Советского, Степновского районов. Кроме того, антитела к вирусу лихорадки Западного Нила обнаружены в сыворотках крови доноров, проживающих в Апанасенковском и Туркменском районах.

В 2000–2008 гг. на территории Прикаспийского песчаного природного очага чумы (Лиманский, Харабалинский, Икрянинский районы) отмечена спорадическая заболеваемость Астраханской пятнистой лихорадкой (АПЛ). Переносчиком возбудителя АПЛ является клещ *Rhipicephalus pumilio*. Для этого вида иксодовых клещей естественная зараженность риккетсиями подтверждена результатами исследования их гемолимфы, равно как и изолирования штаммов из клещей, собранных с собак, кошек и ежей [1, 11].

Представленные выше материалы однозначно свидетельствуют о том, что в настоящее время на территории региона Северо-Западного Прикаспия существуют сочетанные природные очаги бактериальных (чума, туляремия), риккетсиозных (АПЛ) и вирусных (ККГЛ, ЛЗН) инфекционных болезней [1, 2, 3, 10, 13]. Причем в границах Астраханской об-



Распространение сочетанных природных очагов инфекционных болезней бактериальной, риккетсиозной и вирусной этиологии в Северо-Западном Прикаспии:

1 – шифр природного очага чумы: Прикаспийский Северо-Западный степной (14), Прикаспийский песчаный (43), Волго-Уральский степной (15), Волго-Уральский песчаный (16); 2 – сочетанные природные очаги чумы, туляремии, КГЛ; 3 – сочетанные природные очаги чумы, туляремии, КГЛ, ЛЗН, АПЛ

ласти расположены сочетанные природные очаги чумы, туляремии, КГЛ, ЛЗН, АПЛ; на территории Республики Калмыкии и Ставропольского края – чумы, туляремии и КГЛ (рисунок). Существенно, что для каждой из этих инфекций характерно наличие участков стойкой очаговости, на территории которых в последние десятилетия многократно имело место обнаружение зараженных животных и регистрация заболеваний людей. Однако на большей части рассматриваемой энзоотичной по чуме территории эпизоотические и эпидемические проявления этих инфекционных болезней разделены в пространстве и времени. В настоящее время общая площадь участков, на которых зарегистрированы находки животных, зараженных возбудителями чумы, туляремии, ККГЛ, ЛЗН И АПЛ, относительно невелика. Однако по мере активизации сочетанных природных очагов этих инфекций площадь таких территорий будет неизменно расти. В современный период наиболее оптимальные условия для одновременного проявления бактериальных, риккетсиозных и вирусных инфекционных болезней сложились на территории Астраханской области, в первую очередь в границах Прикаспийского песчаного природного очага чумы.

Работа выполнена по Государственному контракту № 110-Д от 11.06.2009 г. в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андросова С.В., Журавлев В.И., Мальков П.М. и др. Природные сочетанные очаги чумы, туляремии, риккетсиозов и арбовирусов на территории, обсервируемой Астраханской противочумной станцией. В кн.: Природно-очаговые особо опасные инфекции на юге России, их профилактика и лабораторная диагностика. Астрахань; 2001. С. 152–156.
2. Журавлев В.И. Эпидемиологические и экологические аспекты циркуляции арбовирусов на территории Астраханской области [автореф. дис. ... канд. мед. наук]. Саратов; 2002. 20 с.
3. Матросов А.Н. Совершенствование эколого-эпизоотологического мониторинга и неспецифической профилактики в природных очагах чумы на территории Российской Федерации. [автореф. дис. ... д-ра биол. наук]. Саратов; 2007. 47 с.
4. Ковтунов А.И., Юстратов В.Б., Никешина Н.Н. и др. Эпидемиология Крымской геморрагической лихорадки в Астраханской области. В кн.: Арбовирусы и арбовирусные инфекции. М.; 2007. С. 108–13.
5. Ковтунов А.И., Юстратов В.Б., Никешина Н.Н., Славина А.М., Джаркенов А.Ф., Азарян А.Р. и др. Эпидемиологическая характеристика лихорадки Западного Нила в Астраханской области. В кн.: Арбовирусы и арбовирусные инфекции. М.; 2007. С. 114–5.
6. Онищенко Г.Г. Распространение вирусных природно-очаговых инфекций в Российской Федерации и меры по их профилактике. Эпидемиол. и инф. бол. 2000; 4:4–8.
7. Онищенко Г.Г., Федоров Ю.М., Кутырев В.В., Попов Н.В., Куклев Е.В., Кузнецов А.А. и др. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 192 с.
8. Онищенко Г.Г., Ефременко В.И., Бейер А.П. Крымская геморрагическая лихорадка. М.: ГОУ. ВУНМИЦ; 2005. 269 с.
9. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Кривуля С.Д., Федоров Ю.М., Топорков В.П. Стратегия борьбы с инфекционными болезнями и санитарная охрана территорий в современных условиях. Пробл. особо опасных инф. 2006; 2(92):5–9.
10. Сангаджиева Г.В. Сочетанные природные очаги чумы, туляремии и Крымской геморрагической лихорадки на территории Республики Калмыкия [автореф. дис. ... канд. биол. наук]. Саратов; 2009. 22 с.
11. Тарасевич И.В. Астраханская пятнистая лихорадка. М.: Медицина; 2002. 171 с.
12. Топорков В.П., Подсвилов А.В., Яшкулов К.Б. Эколого-эпидемиологический мониторинг за предикторами экстремальных эпидемиологических ситуаций в природно-очаговом по чуме регионе Северо-Западного Прикаспия. Элиста; 1999. 125 с.
13. Щербакова С.А., Куклев Е.В., Куличенко А.Н., Самойлова Л.В., Слудский А.А., Попов Н.В. и др. В кн.: Совершенствование эпидемиологического надзора за арбовирусными инфекциями. М.: Санэпидемия; 2007. Т. 3. С. 238.
14. Яковлев С.А., Сангаджиева Г.В., Удовиков А.И., Санджиев В.Б.-Х., Осипов В.П., Диканская В.В. Роль ирригации и орошения в распространении Тамарисковой песчанки *Meriones tamariscinus Pallas, 1773 (Rodentia, Cricetidae)* на территории Калмыкии. Пробл. особо опасных инф. 2008; 3(95):31–5.

N.V.Popov, E.V.Kouklev, V.P.Toporkov, A.K.Adamov, S.A.Scherbakova, O.V.Maletskaaya, A.I.Kovtunov, K.B.Yashkulov, V.V.Kabin, A.V.Podsvirov, A.I.Kologorov, A.A.Kuznetsov, A.N.Matrosov, T.V.Knyazeva, M.P.Grigoryev, V.B.-Kh.Sandzhiev, V.P.Ossipov, N.V.Piskunova, G.V.Sangadzhieva

Combined Natural Foci of Bacterial, Rickettsial and Viral Infectious Diseases in the North-West Precaspian Region

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Astrakhan Plague Control Station, Elista Plague-Control Station, Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Kalmykia, Rospotrebnadzor Administration in the Astrakhan Region, Astrakhan

Presence of combined natural foci of plague, tularemia, Crimean-Congo hemorrhagic fever, West-Nile encephalitis, Astrakhan spotted fever in the North-West Precaspian region was substantiated. Influence of anthropogenic and climatic conditions in formation of combined natural foci of infectious diseases of bacterial, rickettsial and viral etiology was pointed out. Up-to-date potential epidemic danger of the territories under consideration was evaluated.

Key words: epidemiologic surveillance, epizootiological monitoring, combined natural foci, North-West Precaspian region, bacterial, rickettsial and viral infectious diseases, epidemiological hazard of the territory, morbidity.

Об авторах:

- Попов Н.В., Куклев Е.В., Топорков В.П., Адамов А.К., Щербакова С.А., Кологоров А.И., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Князева Т.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Саратов, 410005, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru
- Малецкая О.В., Григорьев М.П. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Ставрополь, 355035, ул. Советская 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru
- Кабин В.В., Осипов В.П. Астраханская противочумная станция. Астрахань, ул. Кубанская, 3. E-mail: antichum@astranet.ru
- Подсвилов А.В., Санджиев В.Б.-Х., Сангаджиева Г.В. Элистинская противочумная станция. 358000, Республика Калмыкия, Элиста, Главпочтамт, а/я 28. E-mail: pestis@elista.ru
- Ковтунов А.И., Пискунова Н.В. Управление Роспотребнадзора по Республике Калмыкия. 358000, Республика Калмыкия, Элиста, ул. Балакаева, 8. E-mail: rpnrk@yandex.ru
- Ковтунов А.И., Пискунова Н.В. Управление Роспотребнадзора по Астраханской области. 414057, Астрахань, ул. Николая Островского, 138. E-mail: tu_rpn@astranet.ru
- Authors:**
 Popov N.V., Kouklev E.V., Toporkov V.P., Adamov A.K., Scherbakova S.A., Kologorov A.I., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Knyazeva T.V. Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru
- Maletskaaya O.V., Grigoryev M.P. Stavropol Anti-Plague Research Institute. 355035, Stavropol, Sovetskaya St., 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru
- Kabin V.V., Ossipov V.P. Astrakhan Plague Control Station. Astrakhan, Kubanskaya St., 3. E-mail: antichum@astranet.ru
- Podsvirov A.V., Sandzhiev V.B.-Kh., Sangadzhieva G.V. Elista Plague-Control Station. Republic of Kalmykia, Elista. E-mail: pestis@elista.ru
- Yashkulov K.B. Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Kalmykia. Republic of Kalmykia, Elista, Balakaeva St., 8. E-mail: rpnrk@yandex.ru
- Kovtunov A.I., Piskunova N.V. Rospotrebnadzor Administration in the Astrakhan Region. 414057, Astrakhan, Nikolay Ostrovskiy St., 138. E-mail: tu_rpn@astranet.ru

Поступила 06.11.09.

В.А.Оборин, Е.В.Пименов, А.Г.Ивонин

ИЗУЧЕНИЕ АДГЕЗИИ БАКТЕРИЙ ВАКЦИННОГО ШТАММА *YERSINIA PESTIS* EV НИИЭГ К ЭРИТРОЦИТАМ ЖИВОТНЫХ ФОТОКОЛОРИМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

ГОУ ВПО «Вятский государственный университет», Киров

С помощью фотоколориметрического метода изучены адгезивные свойства клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в отношении эритроцитов лабораторных, домашних и сельскохозяйственных животных. Установлено, что уровень адгезии бактерии зависит как от видовой принадлежности эритроцитов, так и от условий инкубации микробных и эукариотических клеток. Полученные данные позволяют предположить, что взаимодействие эритроцитов с *Y. pestis* имеет определенное значение в развитии инфекционного процесса, обусловленного возбудителем чумы.

Ключевые слова: адгезия, бактерии, вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ, эритроциты.

Развитие любого инфекционного процесса начинается с прикрепления возбудителя к клеткам-мишеням макроорганизма, за которым следует его проникновение в органы и ткани с последующим проявлением патогенных свойств. Поэтому исследованию адгезивных свойств микроорганизмов, являющихся возбудителями инфекционных заболеваний, придается большое значение.

В настоящее время выявлены и изучены поверхностные структуры *Y. pestis*, ответственные за процесс прикрепления к клеткам хозяина [1, 10, 11]. Однако определение адгезивных свойств чумных бактерий проводилось с помощью реакции геммагглютинации (РГА) или по методике В.И.Брилис и соавт. [3]. Вместе с тем известно, что в РГА определяется только один вид адгезинов – геммагглютинины [2], а метод В.И.Брилис достаточно субъективен и трудоемок, что значительно снижает информативность получаемых результатов.

Для оценки адгезивной способности бактерий в отношении эритроцитов нами предложен фотоколориметрический метод [7]. Ранее с его помощью был изучен процесс прикрепления клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека [8]. В настоящей работе приведены результаты оценки адгезии данного микробного штамма к эритроцитам разных видов животных. Учитывая различную чувствительность животных к инфицированию *Y. pestis* и принимая во внимание трансмиссивный путь передачи возбудителя при чуме, выбранное направление исследований представлялось весьма актуальным.

Материалы и методы

В исследованиях использовали вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, полученный из ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны РФ». Микробную культуру, выращенную на плотной питательной среде на основе гидролизата рыбной муки с добавлением генцианвиолета, суспендировали в 0,9 % растворе хло-

рида натрия. Оптическую плотность (ОП) суспензии доводили до 1,0 усл. ед. при длине волны 540 нм. Для измерения ОП применяли фотоэлектроколориметр КФК-2 и кюветы длиной оптического пути 5 мм.

Пробы венозной крови людей получали из ФГЛУ «Кировская областная станция переливания крови», пробы крови от животных – из питомника ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны РФ», ФГУП учхоз Вятской ГСХА «Чистые пруды», ФГУ «Кировская областная станция по борьбе с болезнями животных». В качестве антикоагулянтов при взятии крови применяли 3,8 % раствор лимонно-кислого натрия (1:10) или гепарин (3 ЕД на 1 мл). В день взятия крови эритроциты трижды отмывали десятикратным объемом 0,9 % раствора хлорида натрия путем центрифугирования при 1000 об/мин в течение 5 мин и ресуспендировали в этом же растворе. Конечную концентрацию эритроцитов доводили до $1,0 \cdot 10^{12}/л$.

В пробирках смешивали по 1,0 мл суспензии эритроцитов и по 2,5 мл суспензии бактерий. В качестве контроля использовали пробы, содержащие: 2,5 мл суспензии микробных клеток и 1,0 мл 0,9 % раствора хлорида натрия; 1,0 мл суспензии эритроцитов и 2,5 мл 0,9 % раствора хлорида натрия. Пробы выдерживали в статических и динамических условиях (вращающаяся платформа) при $(20 \pm 1)^\circ C$ и $(37 \pm 1)^\circ C$ в течение 5, 10, 20, 30, 40 и 50 мин, после центрифугировали при 1000 об/мин в течение 3,0 мин для осаждения эритроцитов. Затем из проб отбирали надосадочную жидкость в объеме 2,0 мл и на КФК-2 определяли значение ее ОП.

Адгезивную способность бактерий оценивали по введенному нами показателю адгезии (ПА), который рассчитывали по формуле:

$$ПА = \frac{D_{к1} + D_{к2} - D_{cn}}{D_{к1}} \times 100 \%,$$

где ПА – показатель адгезии, $D_{к1}$ – ОП надосадочной жидкости в контрольной пробе 1, $D_{к2}$ – ОП

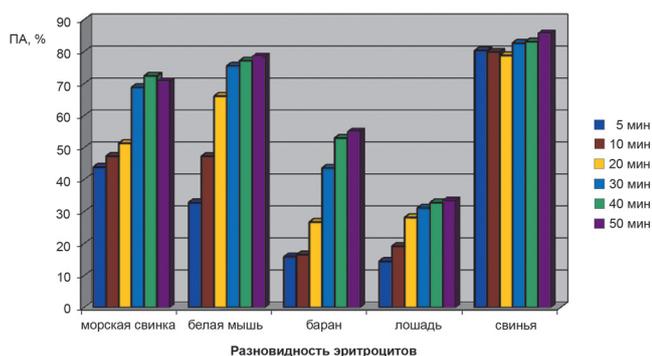


Рис. 1. Динамика изменения ПА *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам животных при различной продолжительности инкубации проб

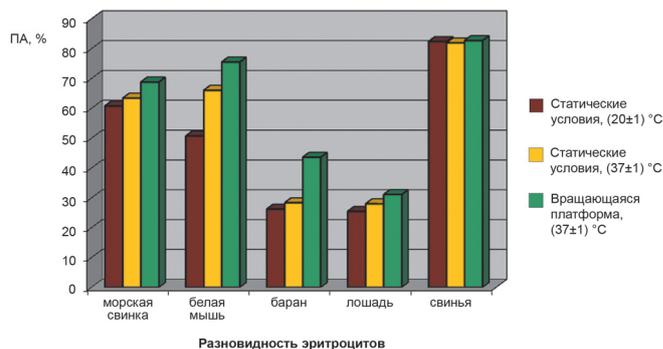


Рис. 2. Динамика изменения ПА *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам животных при различных условиях инкубации проб

надосадочной жидкости в контрольной пробе 2, D_{on} – ОП надосадочной жидкости в опытной пробе.

В каждой серии опытов выполняли по три независимых определения; статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы для обработки медицинской информации «Biostat 4.03».

Результаты и обсуждение

Известно, что при изучении адгезивных свойств бактерий важным является определение оптимальных условий их взаимодействия с клетками-мишенями [2, 3, 5]. Поэтому на первом этапе исследований изучено влияние продолжительности инкубации проб на уровень адгезии клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам различных видов животных. Для этого эритроциты морской свинки, белой мыши, барана, лошади и свиньи инкубировали на вращающейся платформе при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение различного времени, после чего определяли значения ПА (рис. 1).

Как видно из рис. 1, степень адгезии бактерий зависела как от видовой принадлежности эритроцитов, так и от продолжительности совместной инкубации микробных клеток с эритроцитами. В проведенном эксперименте высокие значения ПА отмечались в отношении эритроцитов домашней свиньи, белой мыши, морской свинки. В меньшей степени адгезия бактерий проявлялась к эритроцитам барана, и незначительно – к эритроцитам лошади. ПА *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам свиньи достигал максимального значения уже после 5 мин инкубации. Увеличение продолжительности инкубации микроорганизмов с эритроцитами других животных до 30 мин приводило к существенному повышению уровня адгезии. При дальнейшем увеличении срока инкубации роста ПА не регистрировали. Поэтому в последующих исследованиях учет результатов адгезии предложили проводить после 30-минутной инкубации проб.

Далее изучили влияние условий совместной инкубации бактерий с эритроцитами на ПА (рис. 2). При этом пробы выдерживали в статических и ди-

намических условиях при различных температурных режимах.

Адгезия клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам домашней свиньи не зависела от температуры и условий инкубации. В то же время, прикрепление бактерий к эритроцитам других видов животных (морской свинки, белой мыши, барана и лошади) наиболее интенсивно происходило при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ на вращающейся платформе. Следовательно, данные условия инкубации являются наиболее подходящими для оценки адгезии клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам животных.

Выбрав оптимальные режимы инкубации (выдерживание проб в динамических условиях при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 30 мин), определили значения ПА в отношении эритроцитов, более широкой видовой принадлежности. Результаты этих исследований приведены в таблице.

Анализируя данные таблицы, эритроциты различной видовой принадлежности можно разделить на 3 группы в зависимости от степени адгезии к ним клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ. К первой группе относятся эритроциты белых крыс, домашних свиней, белых мышей, морских свинок, а также людей, для которых ПА составляет свыше 60 %. Вторая группа эритроцитов (золотистые хомячки, собаки, козы, овцы и коровы) имеет ПА в пределах 40–60 %, третья (лошади, кошки) – ниже 30 %. При сопоставлении результатов определения ПА *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам людей и различных видов животных, с данными литературы по их восприимчивости и чувствительности к инфицированию *Y. pestis* выявляется следующая закономерность: чем выше ПА, тем восприимчивее и чувствительнее к заражению возбудителем чумы является вид. Так, у людей и животных, обладающих высокой восприимчивостью и чувствительностью к инфицированию *Y. pestis*, ПА превышает 60 %, а животные с высокой восприимчивостью, но низкой и средней чувствительностью ПА находится на уровне 40–60 %. В то же время, у животных, имеющих ПА ниже 30 % отмечается низкая восприимчивость или чувствительность к инфицированию возбудителем чумы. Исключение составляют собаки, которые за-

Уровень адгезии бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам людей и животных и данные литературы по восприимчивости и чувствительности к инфицированию возбудителем чумы

Группа	Вид млекопитающих	Количество обследованных	ПА, %	Восприимчивость / чувствительность к инфицированию [4, 6, 9, 12]
1	Белые крысы	8	83,97±5,01	Высокая / Высокая
	Домашние свиньи	6	76,94±4,01	Средняя / Средняя
	Люди	12	76,37±7,15	Высокая / Высокая
	Белые мыши	12	70,70±3,61	Высокая / Высокая
	Морские свинки	12	61,12±2,82	Высокая / Высокая
2	Собаки	6	57,08±3,88	Высокая / Низкая
	Золотистые хомячки	10	47,09±4,36 ¹	Высокая / Низкая
	Козы	8	51,28±7,36 ¹	Высокая / Средняя
	Коровы	8	45,31±3,12 ¹	Высокая / Средняя
	Овцы	5	43,38±3,74 ¹	Высокая / Средняя
3	Лошади	6	30,59±1,88 ^{1,2}	Низкая / Низкая
	Кошки	6	22,11±5,53 ^{1,2}	Высокая / Низкая

Примечание: ¹ – различия с группой 1; ^{1,2} – различия с группами 1 и 2 достоверны (p<0,05) по критерию Стьюдента.

нимают промежуточное положение между первой и второй группой, так как у них ПА ниже 60 %, но они, являясь восприимчивыми к заражению, обладают низкой чувствительностью.

Таким образом, проведенные исследования показали, что клетки *Y. pestis* EV НИИЭГ обладают способностью прикрепляться к эритроцитам людей и животных. При этом установлено, что уровень адгезии бактерий зависит от видовой принадлежности эритроцитов и от условий их взаимодействия. Выявлено, что эритроциты ряда животных проявляют свою способность фиксировать бактерии в определенных условиях, что может быть обусловлено как морфологическими, так и функциональными различиями рецепторного аппарата эритроцитов различных видов млекопитающих. Экспериментальным путем выбраны оптимальные условия, позволяющие выявлять потенциальную способность эритроцитов фиксировать на своей поверхности бактерии исследуемого штамма.

Сравнение полученных результатов с данными литературы по восприимчивости и чувствительности к заражению возбудителем чумы человека и разных видов животных позволяет сделать предположение о том, что эритроциты играют определенную роль в восприимчивости к инфицированию *Y. pestis* и реализации инфекционного процесса при чуме.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бахтеева И.В. Исследование функциональной активности рН 6 антигена *Yersinia pestis* с помощью наборов изогенных мутантов [автореф. дис. ... канд. мед. наук]. М.: 2008. 24 с.
2. Бондаренко В.М., Баркус М.М., Брилис В.И., Ленцнер А.А. Гемагглютинирующая и адгезивная способность штаммов клебсиелл и энтеробактерий Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1987; 7:3–6.
3. Брилис В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П., Ленцнер А.А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов Лаб. дело. 1986; 4:210–2.
4. Домарадский И.В. Чума. М.: Медицина; 1998. 176 с.
5. Езепчук Ю.В. Патогенность как функция биомолекул. М.: Медицина; 1985. 240 с.
6. Логвиненко О.В., Тимченко Л.Д., Шапошникова Л.И. Динамика цитоэнзимхимических и патоморфологических изме-

нений у золотистых хомячков при использовании больших доз возбудителя чумы. В кн.: Акт. вопр. эпидемиологии инф. болезней. М.: ЗАО «МП Гигиена», 2006; 8:704–8.

7. Оборин В.А., Бондаренко А.Л., Романов В.Е., Ивонин А.Г., Нехорошикина Е.Л. Фотометрический метод определения бактериофиксирующей активности эритроцитов в отношении возбудителей бактериальных инфекций. В кн.: Научно-практическая конференция и школа по инфекционной патологии (с международным участием). М.: 2007. С. 76.

8. Оборин В.А., Ивонин А.Г., Пименов Е.В., Романов В.Е., Абашева Ф.И., Вылегжанина О.В. Изучение адгезии клеток вакцинного штамма *EV Yersinia pestis* к эритроцитам человека фотокolorиметрическим методом. Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. 2009; 7(3):25–9.

9. Туманский В.М. Микробиология чумы (микробиологические основы диагностики чумы. М.: Медгиз; 1958. 268 с.

10. Ценева Г.Я., Солодовникова Н.Ю., Воскресенская Е.А. Молекулярные аспекты вирулентности иерсиний. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2002; 4(3): 248–66.

11. Straley S.C., Skrzypek E., Piano G.V., Bliska V.J. Yop of *Yersinia spp.* pathogenic for humans. Infect. Immun. 1993; 61(3):3105–10.

12. Watson R.P., Blanchard T.W., Mense M.G., Gasper P.W. Histopathology of experimental plague in cats. Vet. Pathol. 2001; 38(2):165–72.

V.A.Oborin, E.V.Pimenov, A.G.Ivonin

Analysis of Adhesion of *Yersinia pestis* Vaccine Strain EV to Erythrocytes of the Animals Using Photocolorimetric Method

Vyatka State University, Kirov

The adhesive properties of *Y. pestis* vaccine strain EV as regards the erythrocytes of laboratory, domestic and agricultural animals were studied using photocolorimetric method. The level of bacteria adhesion was shown to depend upon erythrocytes species as well as upon incubation conditions of bacterial and eukaryotic cells. The received data suggested interaction of erythrocytes and *Y. pestis* to be significant in the development of infectious process caused by plague agent.

Key words: adhesion, bacteria, *Y. pestis* vaccine strain EV, erythrocytes.

Об авторах:

Оборин В.А., Пименов Е.В., Ивонин А.Г. Вятский государственный университет. 610000, Киров, ул. Московская, 36. E-mail: vaoborin50@mail.ru

Authors:

Oborin V.A., Pimenov E.V., Ivonin A.G. Vyatka State University. 610000, Kirov, Moskovskaya St., 36. E-mail: vaoborin50@mail.ru

Поступила 02.10.09.

И.В.Плясунов, А.А.Сергеев, Л.Н.Шишкина, Ал.А.Сергеев, К.А.Титова,
А.П.Агафонов, Н.К.Евтин, Е.А.Ставский, И.Г.Дроздов

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ОСПЫ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА ОСПОВАКЦИНЫ В7,5S2-S В УСЛОВИЯХ ДВУКРАТНОЙ ОРАЛЬНОЙ ВАКЦИНАЦИИ

ФГУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово

У ранее привитых (в детском возрасте) против оспы добровольцев при проведении оральной иммунизации вакциной «Ревакс-ВТ» сначала малой дозой и через 7, 14, 30, 90 и 180 дней большой иногда наблюдалась слабая реактогенность после первой вакцинации малой дозой, тогда как ревакцинация большой дозой не давала каких-либо клинических проявлений. При этом наиболее эффективным был метод двукратной иммунизации этим препаратом с интервалом в 1–2 недели, что приводило к формированию у 90–100 % добровольцев защитного уровня вируснейтрализующих антител к вирусу осповакцины (ВОВ) через месяц после вакцинации, в то время как через 6 мес. этот показатель снизился до 70 %. Ни в одном случае при двукратной иммунизации добровольцев вакциной не зарегистрировано наличие рекомбинантного ВОВ в исследуемых от них пробах крови, слюны, мочи.

Ключевые слова: рекомбинантный вирус осповакцины, натуральная оспа, гепатит В, таблетированная вакцина, оральное применение, клинические испытания, двукратная вакцинация, клеточный иммунитет, гуморальный иммунитет, реактогенность, безопасность.

Все вакцины против натуральной оспы (НО), которые разрабатываются на сегодняшний день за рубежом, в основном нацелены на парентеральное применение (скарификационное, внутрикожное) [6, 14, 15 и др.], которое имеет ряд существенных недостатков: низкая производительность при массовой вакцинации людей, риск попутного инфицирования в процессе вакцинации другими вирусными агентами (ВИЧ, вирус Т-клеточного лейкоза, вирус гепатита С и др.), выделение вируса осповакцины (ВОВ) в окружающую среду (неконтролируемая передача его непривитым людям). В связи с этим на основе ранее полученного в ГНЦ ВБ «Вектор» рекомбинантного штамма b7,5S2-S ВОВ [2] в настоящее время нами разрабатывается эмбриональная живая вакцина против НО орального применения («Ревакс-ВТ»), которая будет лишена этих недостатков за счет создания ее таблетированной формы [8]. Увеличение безопасности такой вакцины для организма по сравнению с накожной оспенной вакциной связано с использованием в ее основе штамма b7,5S2-S ВОВ, полученного путем выключения одного из генов вирулентности (ген-тимидинкиназы) штамма ЛИВП ВОВ за счет встройки фрагмента ДНК вируса гепатита В (ГВ), кодирующего синтез белков HBs и preS2 [13].

В проведенных нами ранее исследованиях [9, 10] в рамках клинических испытаний препарата «Ревакс-ВТ» была отмечена значительная его реактогенность при однократном применении в больших дозах ($3,9 \cdot 10^7$ оспообразующих едениц – ООЕ) на добровольцах, ранее невакцинированных и вакцинированных против НО (в 50 и 40 % случаев соответственно). Тогда как волонтеры, ранее вакцинированные против оспы и привитые малой дозой вакцины «Ревакс-ВТ» ($7,6 \cdot 10^6$), имели лишь слабую местную и общую реакции [9]. Учитывая это обстоятельство и то, что в малой дозе данный препарат оказался сла-

боиммуногенным, нами была предпринята попытка двукратной вакцинации вакциной «Ревакс-ВТ» (малой дозой и через 7, 14, 30, 90 и 180 дней большой) добровольцев, ранее (в детстве) привитых против оспы, чему и посвящена данная работа.

Материалы и методы

Вакцина. Использовали две серии вакцины «Ревакс-ВТ» с иммунизирующими дозами $7,6 \cdot 10^6$ и $3,9 \cdot 10^7$ ООЕ, приготовленные в соответствии с ранее описанным методом [8].

Пробы. От каждого добровольца ежедневно в течение 14 сут производили отбор слюны и мочи и один раз в неделю в течение 4 недель отбирали пробы плазмы и сыворотки для вирусологических и серологических исследований.

Вирусологические исследования. Полученные от привитых добровольцев пробы (моча, слюна, плазма) анализировали на наличие в них рекомбинантного ВОВ. Для предупреждения бактериального и грибкового пророста в пробы слюны и мочи добавляли нистатин (20 ед./мл), стрептомицина сульфат (100 мкг/мл) и бензилпенициллина натриевую соль (100 ед./мл) и проводили центрифугирование при 2000 оборотах в течение 10 мин. Полученный таким образом супернатант титровали на культуре клеток 4647 по методу бляшек [4] с той лишь разницей, что инфицированные клетки инкубировали в течение 3 сут и в качестве красителя использовали 0,001 % раствор генциана фиолетового, приготовленного на фиксирующем растворе.

Серологические исследования. Сыворотки крови людей исследовали с целью определения уровня антител к вирусу ВОВ (штамм ЛИВП), HBs Ag и HBcAg и выявления в них HBs Ag. Титры антител к ВОВ оценивали в реакции нейтрализации (РН)

на культуре клеток 4647 по методу бляшек по общепринятой методике, используя при этом разведения исследуемых сывороток 1:5, 1:25, 1:125 [15]. При этом за титр сыворотки принимали максимальное ее разведение, которое вызывало снижение количества бляшкообразующих единиц (БОЕ) более чем в два раза по сравнению с контролем. За рабочее разведение вируса принимали такое его разведение, которое при подсчете БОЕ давало образование от 40 до 60 бляшек. Общепринято, что защитные титры антител к ВОВ, определяемые в РН, в сыворотке крови человека составляют $\geq 1:25$.

Выявление антител к НВsAg и НВсAg и наличия НВsAg в сыворотках крови людей проводили с помощью сертифицированных в МЗ России иммуноферментных тест-систем «Векто НВs Ag-антитела-стрип», «Векто НВс Ag-антитела-стрип» и «Рекоматгеп В-стрип» соответственно (производство ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирская область, п. Кольцово). Чувствительность последней тест-системы по ОСО ГИСК – 0,2 нг/мл. Общепринято, что защитные концентрации антител к НВsAg, определяемые методом иммуноферментного анализа, в сыворотках крови человека составляют ≥ 10 мМЕ/мл.

Исследования клеточного иммунитета. Оценку реакции эффекторов гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ-эффекторов) на специфические антигены (Аг) к ВОВ и ГВ проводили согласно описанной методике с помощью определения изменения интенсивности миграции лейкоцитов *in vitro* [7]. Предварительно была исследована активность ГЗТ-эффекторов у здоровых доноров и у вакцинированных ВОВ и НВsAg. На основании полученных данных была выбрана доза, ингибирующая миграцию лейкоцитов, для каждого антигена (АгВОВ и НВsAg) и рассчитаны соответствующие параметры нормы для индекса ингибирования миграции (ИИМ) лейкоцитов крови. Оценку активности специфических ГЗТ-эффекторов *in vitro* у каждого человека, вакцинированного вакциной, проводили по ИИМ, характеризующему активность ГЗТ-эффекторов, по формуле: $ИИМ = Б/А$, где А – количество клеток в контрольных лунках, Б – количество клеток в опытных лунках с ингибирующей дозой соответствующего Аг. Данный показатель для каждого вакцинированного сравнивали с соответствующими параметрами нормы и со своим исходным показателем. Таким образом, чем выше активность ГЗТ-эффекторов, тем ниже ИИМ для соответствующего Аг после вакцинации вакциной. В случае выраженного специфического клеточного иммунного ответа на НВsAg или АгВОВ ИИМ должен быть ниже параметров нормы и своего исходного показателя. Пробы цельной крови для постановки этой реакции использовали сразу после ее взятия.

Общее и лабораторное обследование добровольцев. Оценку общего состояния здоровья и лабораторных показателей проб от добровольцев до и после их иммунизации вакциной проводили общепринятыми методами в условиях клиники, сертифицированной

для проведения соответствующих клинических исследований (ежедневный мониторинг клинического состояния испытуемых с ежедневной двукратной термометрией, ежедневными осмотрами узкими специалистами и еженедельным биохимическим и клиническим анализом периферической крови и мочи).

Исследования проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основными законодательства РФ об охране здоровья граждан» (Указ Президента РФ от 24.12.1993 Т2288, Федеральные законы N 30-ФЗ от 02.03.98, N 214-ФЗ от 20.12.99). Опрос респондентов и взятие крови проводили после получения письменного информированного согласия. Порядок проведения исследований одобрен этическим комитетом ИРВ 00001360.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами [1].

Результаты и обсуждение

После получения из МЗ России разрешения на проведение клинических испытаний вакцины «Ревакс-ВТ» на первом этапе при двукратном применении проводили подбор добровольцев, ранее вакцинированных против оспы.

Критериями отбора претендентов в добровольцы являлись: наличие оспенных вакцинальных знаков при визуальном осмотре и анамнестические данные (возраст претендентов – старше 26 лет, отсутствие заболеваний вирусными гепатитами и вакцинации против ГВ).

На основании предварительного медицинского обследования претендентов в добровольцы комиссия в составе: руководитель исследования, врач-терапевт, врач-стоматолог, врач-кардиолог, ЛОР-врач, врач-невропатолог проводила отбор добровольцев, у которых не выявлено соматических и других заболеваний, являющихся противопоказанием к проведению вакцинации.

По результатам проведенных серологических исследований на наличие маркеров ГВ и антител к ВОВ были сформированы 4 группы добровольцев (А, Б, В, Г) для проведения клинического испытания вакцины. При этом отмечено, что титры противоспепных антител, выявленные в сыворотках крови ранее (в детстве) вакцинированных против оспы добровольцев на начало проведения исследований, были достаточно низкими ($\leq 1:5$), не достигающие защитной величины (1:25).

В группу А вошли 10 волонтеров в возрасте 34–40 лет. Эти добровольцы были иммунизированы малой дозой вакцины ($7,6 \cdot 10^6$ ООЕ) и через 1 неделю – большой ($3,9 \cdot 10^7$ ООЕ).

В группу Б вошли 10 волонтеров в возрасте 31–38 лет. Эти добровольцы были иммунизированы малой дозой вакцины ($7,6 \cdot 10^6$ ООЕ) и через 2 недели – большой ($3,9 \cdot 10^7$ ООЕ).

В группу В вошли 11 волонтеров в возрасте 28–34 года. Эти добровольцы были иммунизированы малой дозой вакцины ($7,6 \cdot 10^6$ ООЕ) и через 1 месяц – большой ($3,9 \cdot 10^7$ ООЕ).

В группу Г вошли 4 волонтера в возрасте 32 – 35 лет. Они были иммунизированы малой дозой вакцины ($7,6 \cdot 10^6$ ООЕ) и через 3–6 месяцев – большой ($3,9 \cdot 10^7$ ООЕ).

Обобщенные результаты проведенных исследований представлены в табл. 1. Исследования реактогенности вакцины у двукратно вакцинированных волонтеров показали наличие только слабых местных и общих реакций у волонтеров после введения препарата лишь в малой дозе. Ревакцинация же большой дозой вакцины во всех исследованных группах не вызывала какой-либо реактогенности. Отсутствие реактогенности при оральной ревакцинации противооспенными вакцинами отмечали ранее и другие авторы [3].

Выраженный гуморальный иммунный ответ к ВОВ был получен у волонтеров из групп А и Б через 1 месяц после двукратной иммунизации вакциной с интервалом между введениями 7 и 14 дней, и при этом уровень сероконверсии составил 100 и 90 % соответственно. В то время как двукратная иммунизация вакциной с интервалом 1 или 3–6 месяцев вызвала формирование иммунной прослойки к ВОВ лишь у 55 и 50 % привитых в группах В и Г соответственно. Факт формирования низкого уровня иммунной прослойки к ВОВ среди двукратно вакцинированных препаратом добровольцев этих двух групп может

быть, скорее всего, обусловлен использованием относительно невысокой дозы вакцины при повторном введении (всего лишь в пять раз большая, чем при первичной вакцинации). Вероятно, такая доза вакцины была практически полностью нейтрализована сформировавшимся базовым иммунным ответом, полученным (к моменту повторной вакцинации) через 1 или 3–6 месяцев после первичной вакцинации малой дозой препарата. В то же время потенциальной возможности получать таблетки с существенно более высоким содержанием рекомбинантного ВОВ для ревакцинации практически не существует, если не вводить в технологию приготовления этого препарата дополнительных трудоемких и дорогостоящих процедур по концентрированию рекомбинантного ВОВ. В случае же двукратного введения препарата с интервалом 1–2 недели полного формирования базового иммунного ответа после первичной иммунизации малой дозой вакцины не успело произойти к моменту повторной вакцинации большой дозой препарата. Поэтому, вероятно, действующее начало вакцины «Ревакс-ВТ» при повторном введении существенно в меньшей степени (чем в группах В и Г) было нейтрализовано антителами, сформировавшимися после первичной вакцинации, что и привело к более активной стимуляции гуморального звена иммунитета у добровольцев групп А и Б на ВОВ. Факт повышения титров противооспенных антител при ревакцинации у людей, иммунизированных аналогичной вакциной только накожного применения, также был показан и

Таблица 1

Обобщенные результаты клинических испытаний вакцины «Ревакс-ВТ» при двукратной оральной вакцинации малой дозой ($7,6 \cdot 10^6$ ООЕ) и затем большой ($3,9 \cdot 10^7$ ООЕ) добровольцев (группы А, Б, В и Г), в детском возрасте привитых против оспы

Оцениваемый показатель		Группа добровольцев / Количество испытуемых				
		А / 10	Б / 10	В / 11	Г / 4	
		Иммунизирующая доза, ООЕ				
		7,6·10 ⁶ и через 1 неделю 3,9·10 ⁷	7,6·10 ⁶ и через 2 недели 3,9·10 ⁷	7,6·10 ⁶ и через 1 месяц 3,9·10 ⁷	7,6·10 ⁶ и через 3–6 месяцев 3,9·10 ⁷	
Введение малой дозы (первичная иммунизация)	Местные реакции в максимальном варианте ¹ :	число	2	2	1	1
	выраженность	Слабая ²	Слабая ²	Слабая ²	Слабая ²	
	Общие реакции в максимальном варианте ¹ :	число	2	2	2	0
	выраженность	Слабая ³	Слабая ³	Слабая ³	Слабая ³	
Введение большой дозы (вторичная иммунизация)	Местные реакции в максимальном варианте:	число	0	0	0	0
	выраженность	-	-	-	-	
	Общие реакции в максимальном варианте:	число	0	0	0	0
	выраженность	-	-	-	-	
Наличие вируса в пробах в течение 14 сут наблюдения после вакцинации:	слюна	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	
	плазма	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	
	моча	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	
Процент добровольцев, имеющих значимый гуморальный иммунный ответ через месяц после вакцинации на вирус:	вакцины	100	90,0	55,6	50	
	гепатита В	0	204	0	254	
Процент добровольцев с выраженными показателями клеточного иммунитета через месяц после вакцинации к вирусу:	вакцины	20	10	9	0	
	гепатита В	10	0	0	0	

Примечания: ¹ – общие и местные реакции имели место, как правило, в период с 7-х по 13-е сутки после вакцинации; ² – легкая гиперемия зева, увеличение подчелюстных лимфоузлов до 0,8 см; ³ – повышение температуры тела до 37,2 °С; ⁴ – зарегистрировано появление антител, но их концентрация была минимальной защитной (10 мМЕ/мл).

другими исследователями [12].

В табл. 2 приведены данные по динамике титров антител в ВОВ через 1, 3, 6 и 9 месяцев после двукратной оральной вакцинации малой и большой дозами препарата «Ревакс-ВТ» с интервалом между введениями 1 и 2 недели у добровольцев, ранее (в детском возрасте) привитых против оспы. Видно, что через 1 и 3 месяца после вакцинации происходит увеличение титра вируснейтрализующих антител к ВОВ у более 90 % добровольцев. Через 6 месяцев иммунная прослойка составляет 70 % среди привитых волонтеров из групп А и Б, тогда как при однократном введении вакцины происходит существенное уменьшение титров антител к ВОВ уже через 6 месяцев после вакцинации, и иммунная прослойка среди привитых волонтеров уменьшается до 20 % [9].

Значимого же уровня клеточного иммунного ответа на ВОВ при двукратном введении препарата не зарегистрировано, как и при однократной вакцинации [9], что, возможно, связано с низкой чувствительностью использованного нами метода оценки клеточного иммунитета.

Учитывая то обстоятельство, что разрабатываемая вакцина «Ревакс-ВТ» была приготовлена на основе штамма b7,5S2-S ВОВ, полученного путем выключения одного из генов вирулентности (гентамидинкиназы) штамма ЛИВП ВОВ за счет встройки фрагмента ДНК вируса ГВ, кодирующего синтез белков НВs и preS2, было проведено также изучение формирования гуморального иммунного ответа на НВs Ag (так же, как и клеточного) у двукратно вакцинированных волонтеров. При этом уровень специфических сывороточных антител во всех случаях был низким: иммунная прослойка среди привитых добровольцев

была существенно ниже 70 %. Другие исследователи [12] также отмечали отсутствие антител к НВs Ag после двукратного введения аналогичной рекомбинантной вакцины, но накожного применения.

Все образцы плазмы, слюны, мочи от двукратно вакцинированных добровольцев проверены на содержание рекомбинантного ВОВ. При этом ни в одном случае не зарегистрировано наличие ВОВ в исследуемых пробах, что свидетельствует о крайне низкой вероятности выделения вируса в окружающую среду при течении вакцинального процесса и соответственно исключает возможность неконтролируемой передачи инфекции, вызванной оральной двукратной иммунизацией препаратом.

Ревакцинацию (повторную вакцинацию) для профилактики натуральной оспы начали применять еще в 19 веке [14]. В первую очередь, это было связано с тем, что прививка против оспы обеспечивает надежную защиту в среднем на протяжении 3 лет, в дальнейшем протективный эффект постепенно ослабевает [6]. Так заболеваемость оспой среди привитых 1–3 года назад составила 0,3 %, 3–5 лет – 0,9 %, 5–10 лет – 8,3 % и более 10 лет – 10,7 % [5]. Сроки ревакцинаций и их количество варьировали в зависимости от задач, стоящих перед медиками и исследователями. В СССР перед отменой оспопрививания предусматривалась двукратная ревакцинация в возрасте 8 и 16 лет [6]. При ревакцинации вируснейтрализующие противооспенные антитела выявляются раньше (на 7-е сутки) и в более высоких титрах по сравнению с первичной вакцинацией (на 10–14-е сутки). Это обстоятельство позволяет использовать ревакцинацию как средство экстренной профилактики в первые дни после контакта с оспенным больным [6]. Полученные

Таблица 2

Данные по динамике титров вируснейтрализующих антител к вирусу осповакцины через 1, 3, 6 и 9 месяцев после двукратной оральной вакцинации малой и большой дозами препарата «Ревакс-ВТ» с интервалом между введениями 1–2 недели у добровольцев, в детском возрасте привитых против оспы

Номер добровольца (группа)	Титр противооспенных вируснейтрализующих антител через различные сутки наблюдения после вакцинации:				
	0	30	90	180	270
1 (Б)	1:5	1:125	1:125	1:125	Нд
2 (Б)	1:5	1:5	1:25	1:5	Нд
3 (Б)	Сн	1:125	1:25	1:125	Нд
4 (Б)	Сн	>1:125	1:125	>1:125	Нд
5 (Б)	1:5	1:25	1:25	1:25	Нд
6 (А)	1:5	1:25	1:25	1:125	Нд
7 (А)	Сн	1:25	1:25	>1:125	Нд
8 (А)	Сн	1:25	1:25	1:125	Нд
9 (А)	1:5	1:125	>1:125	1:5	Нд
10 (А)	Сн	1:125	>1:125	Сн	Нд
11 (Б)	Сн	1:125	Нд	Нд	>1:125
12 (А)	Сн	1:125	Нд	Нд	1:125
13 (А)	Сн	1:125	Нд	Нд	1:125
14 (Б)	Сн	1:125	Нд	Нд	1:125

Примечания: Приведены данные по добровольцам, имеющим через месяц после вакцинации протективные значения титров вируснейтрализующих антител к ВОВ, и которые наблюдались 6–9 месяцев; Нд – нет данных; Сн – серонегативный результат в реакции нейтрализации, в которой были использованы разведения исследуемых сывороток 1:5, 1:25, 1:125.

нами результаты также позволяют сделать заключение о возможности и перспективности двукратного введения вакцины «Ревакс-ВТ» для вакцинопрофилактики оспы у людей, ранее иммунизированных против ВО. Для этого предлагается оральная вакцинация людей сначала малой дозой вакцины и через 7–14 дней большой. Это позволит при отсутствии реактогенности получить уровень сероконверсии к ВОВ до 100 % у привитых. Результаты, полученные нами при клинических испытаниях вакцины в условиях двукратной оральной вакцинации добровольцев, в детском возрасте иммунизированных против оспы, свидетельствуют о перспективности применения этого подхода также для волонтеров, ранее не иммунизированных против оспы [11]. При этом для ослабления реактогенности предполагается уменьшить в несколько раз первую (малую) дозу вакцины.

Таким образом, у ранее привитых (в детском возрасте) против оспы добровольцев при проведении двукратной оральной иммунизации вакциной «Ревакс-ВТ» сначала малой дозой ($7,6 \cdot 10^6$ ООЕ) и через 7, 14, 30, 90 и 180 дней большой ($3,9 \cdot 10^7$ ООЕ) иногда наблюдалась лишь слабая реактогенность после первой вакцинации малой дозой, тогда как ревакцинация большой дозой не давала каких-либо клинических проявлений. При этом наиболее эффективным был метод двукратной иммунизации этим препаратом с интервалом в 1–2 недели, что приводило к формированию у 90–100 % добровольцев защитного уровня вируснейтрализующих антител к ВОВ через месяц после вакцинации, в то время как через 6 месяцев этот показатель снизился до 70 %. Уровень же клеточного иммунитета к ВОВ, оцененный с помощью реакции ГЗТ-эффекторов был низким (до 20 %). Двукратная иммунизация оральной вакциной добровольцев в условиях отдаленной вакцинации не приводила к формированию значимого уровня гуморального и клеточного иммунного ответа на маркер ГВ (иммунная прослойка среди вакцинированных была существенно менее 70 %). Ни в одном случае при двукратной иммунизации добровольцев вакциной не зарегистрировано наличие рекомбинантного ВОВ в исследуемых от них пробах крови, слюны, мочи.

Работа выполнена по Государственному контракту № 104-Д от 11.06.2009 г. в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: 1962. 256 с.
2. Беляев А.С., Путинцева Н.И., Дмитриев И.П., Аммосов А.Д., Черный Н.Б., Миронова Е.Б. и др. Рекомбинантная плазмидная ДНК p7,5 S2-S, содержащая pre-S2-S ген вируса гепатита В, способ ее конструирования и штамм рекомбинантного вируса осповакцины, экспрессирующий pre-S2-S ген вируса гепатита В. Патент РФ № 1575576 от 20.06.88.
3. Воробьев А.А., Подкуйко В.Н., Михайлов В.В., Махлай А.А. Непарантеральные методы иммунизации. ЖМЭИ. 1996; 5:117–21.
4. Гловер Д., редактор. Клонирование ДНК. Методы. М.: 1988. 540 с.

5. Ладный И.Д. Ликвидация оспы и предупреждение ее возврата. М.: 1985. 222 с.
6. Маренникова С.С., Шелкунов С.Н. Патогенные для человека ортопоксвирусы. М.: КМК Scientific Press Ltd; 1998. 386 с.
7. Методические рекомендации. Методы оценки клеточных эффекторных функций гиперчувствительности замедленного типа. М.: 1990. 11 с.
8. Муратов П.Ю., Сандахчиев Л.С., Дмитриев И.П., Беляев А.С., Бектемиров Т.А., Перекрест В.В. и др. Живая рекомбинантная вакцина гепатита В на основе вируса осповакцины для перорального применения и способ ее получения. Патент 2076735 РФ от 10.04.97.
9. Плясунов И.В., Сергеев А.Н., Сергеев А.А., Петрищенко В.А., Шишкина Л.Н., Генералов В.В. и др. Клинические исследования рекомбинантной бивакцины против оспы и гепатита В в условиях двукратной оральной вакцинации. Вопр. вирусол. 2006; 2:31–5.
10. Сергеев А.А., Сергеев А.Н., Петрищенко В.А., Шишкина Л.Н., Кочнева Г.В., Жуков В.А. и др. Изучение реактогенности, безопасности и иммуногенности рекомбинантной бивакцины против оспы и гепатита В на людях. Вопр. вирусол. 2004; 5:22–6.
11. Сергеев А.Н., Плясунов И.В., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Генералов В.М., Сергеев А.А. и др. Набор таблетированной живой рекомбинантной оральной бивакцины против натуральной оспы и гепатита В и способ вакцинации с использованием указанного набора. Патент РФ №2302259 от 10.07.07.
12. Чернос Н.В., Челябин Т.П., Антонова Т.П., Рахилина Л.Е., Уланов С.С., Альштейн А.Д. и др. Проверка безопасности, прививаемости, реактогенности и антигенных свойств живой рекомбинантной оспенно-гепатитной В-вакцины в опыте на добровольцах. Вопр. вирусол. 1990; 2:133–5.
13. Buller R.M. L., Smith G.L., Gemer K., Notkins A.L., Moss B. Decreased virulence of recombinant vaccine virus expression vectors is associated with a thymidinekinase negative phenotype. Nature. 1985; 317(6040):813–5.
14. Fenner F., Henderson D. A., Arita I., Jezek Z., and Ladnyi I. D. Smallpox and its eradication. Geneva: World Health Organization; 1988. 1460 p.
15. Leparc-Goffart I., Poirier B., Garin D., Tissier M-H, Fuchs F., Crance J-M. Standardization of a neutralizing anti-vaccinia antibodies titration method: an essential step for titration of vaccinia immunoglobulins and smallpox vaccines evaluation. J. Clin. Virol. 2005; 32:47–52.

I.V.Plyasunov, A.A.Sergeev, L.N.Shishkina, A.I.A.Sergeev, K.A.Titova, A.P.Agaonov, N.K.Evtin, E.A.Stavskiy, I.G.Drozdov

Clinical Studies of Vaccine Against Smallpox on the Base of Recombinant Vaccinia b7,5S2-S Strain under the Conditions of Double Oral Vaccination

State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Koltsovo

Volunteers who had been vaccinated against smallpox in their childhood were orally immunized with “Revax-BT” vaccine – initially with a small dose, then (in 7, 14, 30, 90 and 180 days) with a large one. Slight reactogenicity was observed after the first vaccination whereas revaccination induced no clinical manifestation. Double immunization with this preparation with 1–2 weeks interval proved to be the most effective method: the protective level of virus-neutralizing antibodies to vaccinia virus (VV) was formed in 90–100 % volunteers in a month after vaccination, and 6 months later this index decreased up to 70 %. The recombinant VV was not registered in the samples of blood, saliva and urine taken from the volunteers after double immunization.

Key words: recombinant virus of vaccinia, smallpox, hepatitis B, tablet vaccine, oral use, clinical trial, double vaccination, cellular immunity, humoral immunity, reactogenicity, safety.

Об авторах:

Плясунов И.В., Сергеев А.А., Шишкина Л.Н., Сергеев А.А., Титова К.А., Агафонов А.П., Евтин Н.К., Ставский Е.А., Дроздов И.Г. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Authors:

Plyasunov I.V., Sergeev A.A., Shishkina L.N., Sergeev A.A., Titova K.A., Agaonov A.P., Evtin N.K., Stavskiy E.A., Drozdov I.G. State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”. 630559, Novosibirsk Region, Koltsovo. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Поступила 12.11.09.

**В.В.Фирстова, И.В.Бахтеева, Г.М.Титарева, Е.В.Зырина, С.А.Иванов, Н.В.Киселева,
П.Х.Копылов, А.П.Анисимов, И.А.Дятлов**

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МАРКЕРА РАННЕЙ АКТИВАЦИИ CD69 НА ЛИМФОЦИТАХ ИММУННЫХ МЫШЕЙ ПОСЛЕ СТИМУЛЯЦИИ ИХ АНТИГЕНАМИ ЧУМНОГО МИКРОБА

ФГУН ГНЦ Прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболенск

В работе дана оценка способности антигенов чумного микроба F1 и V специфически активировать в системе *in vitro* субпопуляции Т-лимфоцитов мышей линии BALB/c, иммунизированных против чумы. В качестве маркера активации лимфоцитов предложено оценивать уровень экспрессии CD69 на поверхности лимфоцитов. Экспрессия раннего маркера активации CD69 в субпопуляциях Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов в ответ на стимуляцию *in vitro* F1 *Y. pestis* коррелировала с напряженностью поствакцинального иммунитета к чуме, индуцированного иммунизацией F1 или смесью F1 и V антигенов.

Ключевые слова: чума, поствакцинальный иммунитет, маркер CD69.

Используемая в странах СНГ живая чумная вакцина на основе штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ обеспечивает напряженный иммунитет от бубонной и легочной чумы за счет стимуляции как гуморального, так и клеточного звеньев иммунитета [2, 5], но обладает рядом существенных недостатков. Ревакцинация живой вакциной с интервалом менее 6 месяцев индуцирует иммунный ответ, достаточный для быстрой элиминации бактерий вакцинного штамма из организма. Это препятствует развитию полноценного процесса ревакцинации и не обеспечивает поддержания напряженного иммунитета на уровне, достаточном для защиты от последующего заражения вирулентными штаммами. Кроме того, живая вакцина может вызывать у части иммунизированных сторонние реакции различной степени тяжести, а также генерализованный инфекционный процесс у лиц с нарушениями иммунного статуса [1, 2, 5, 10]. В последнее время многие исследователи работают над конструированием «химических» (субъединичных) чумных вакцин. Эти вакцины позволяют за счет введения в их состав только индивидуальных иммунодоминантных антигенов *Y. pestis* значительно снизить реактогенность препарата в целом; эффективны для ревакцинации; могут быть использованы на фоне экстренной профилактики антибиотиками и исключают возможность возникновения инфекционного процесса у лиц с нарушениями иммунного статуса. Основным их недостатком является то, что большинство индивидуальных антигенов, в отличие от бактериальных клеток, индуцируют преимущественно гуморальный иммунитет [3, 7, 8, 10].

Решающим критерием профилактической ценности вакцин у людей является их эпидемиологическая эффективность, которую проводят на основе анализа снижения уровня заболеваемости среди вакцинированного населения. Оценка эффективности вакцинации против чумы затруднена в связи с тем, что в последние годы отмечаются лишь спорадические вспышки этой инфекции. До последнего вре-

мени косвенную оценку эффективности вакцинации проводили путем определения поствакцинальных титров антител к использованным для иммунизации антигенам (F1 и V) [10, 11]. Однако в целом ряде случаев серонегативные животные обладали напряженным иммунитетом к чуме [8].

Вышеизложенные факты указывают на необходимость разработки эффективных и воспроизводимых косвенных методов оценки напряженности клеточного звена поствакцинального иммунитета к чуме.

Одним из методов оценки активации лимфоцитов является скрининг экспрессии поверхностных маркеров клеток. CD69 рецептор – маркер ранней активации появляется на поверхности антиген- или аллерген-специфически активированных *in vitro* лимфоцитов [4, 9]. Экспрессируясь на поверхности клетки рецептор CD69 действует как костимулирующая молекула Т-клеточной активации и пролиферации [4, 12].

Цель исследования – оценить способность антигенов чумного микроба F1 и V специфически активировать в системе *in vitro* субпопуляции Т-лимфоцитов мышей линии BALB/c, иммунизированных против чумы.

Материалы и методы

Мышей линии BALB/c (5 групп по 5 животных) иммунизировали подкожно двукратно с интервалом 4 недели 0,9 % раствором натрия хлорида, гидроксидом алюминия – контрольные группы; антигенами *Y. pestis*, сорбированными на гидроокиси алюминия: V, F1, или смесью F1 и V антигенов. На 28-е сутки после второй иммунизации у мышей отбирали сыворотку крови и спленоциты.

Определение титра антител. Для определения титра антител использовали твердофазный иммуноферментный анализ. Сыворотки тестировали на планшетах, сенсibilизированных отдельно антигенами V и F1. В качестве контролей использовали сыворотки не иммунизированных мышей и сыворотки животных, которым вводили суспензию гидроокиси

алюминия без антигенов.

F1 и V антигены сорбировали на планшеты в течение 1 ч при 37 °С в 0,1 М карбонатном буфере, рН 9,6. После каждого этапа планшеты промывали 10 мМ трис-буфером, содержащим 0,15 М NaCl и 0,05 % твина-20, рН 7,2. Начиная с разведения 1:1000, антитела разводили с шагом в 2,5 раза. Каждую сы-воротку тестировали на трех различных планшетах. Продолжительность инкубации с рабочими растворами на всех этапах составляла 1 ч при 37 °С. Конъюгаты антимышиных антител с пероксидазой хрена разводили 1:3000. В качестве субстрата использовали ортофенилендиамин, ферментативную реакцию останавливали через 15 мин 1 М раствором серной кислоты и определяли оптическую плотность растворов в лунках при 490 нм. При измерении использовали функцию автоматического вычитания фона.

Определение поверхностных маркеров лимфоцитов. Спленоциты ($5 \cdot 10^5$ кл/мл) каждой группы мышей выделяли и инкубировали в лунках 96-луночного планшета по 200 мкл 24 ч при 37 °С, во влажной атмосфере, 5 % CO₂ в присутствии F1 (1 и 10 мкг/мл) или V антигена (1 и 10 мкг/мл) чумного микроба. В качестве положительного контроля служили лимфоциты иммунных и интактных мышей, активированные ConA (5 мкг/мл), в качестве отрицательного – лимфоциты иммунных и интактных мышей без стимуляции *in vitro*. По окончании инкубирования спленоциты отмывали и окрашивали моноклональными антителами к поверхностным маркерам CD3 PerCP (BD Biosciences Farmigen), CD4 APC, CD8 PE, CD69 FITC (Caltag, Invitrogen).

Анализ проводили на проточном цитофлюориметре FACSCalibur (Becton Dickinson) в объеме, указанном фирмой-производителем, и инкубировали в темноте в течение 15 мин при 20 °С.

Лимфоциты гейтировали – выделяли для анализа клетки с общими физическими параметрами светорассеяния и интенсивностью флюоресценции. Анализировали 10 тысяч событий каждого образца. После этого клетки отмывали и фиксировали. Готовые пробы хранили при 4 °С до проведения цитометрического исследования.

Процент клеток, несущих маркер CD69, определяли с помощью трехцветного цитометрического анализа в программе «Cell Quest».

Определение напряженности иммунитета. Оценку вирулентности проводили на мышах в условиях лаборатории уровня биологической безопасности BSL3. Мышей заражали подкожно 10-кратно возрастающими дозами суспензии 28-градусных культур *Y. pestis* 231 в 0,9 % растворе натрия хлорида в объеме 0,2 мл на животное (заражающая доза составляла от $2 \cdot 10^0$ до $2 \cdot 10^5$ КОЕ). Каждой заражающей дозой иммунизировали группу, состоящую из 5 животных. Наблюдение за зараженными животными проводили в течение 21 сут, погибших животных вскрывали и подвергали бактериологическому исследованию. Вычисление величин LD₅₀ проводили по

методу Кэрбера в модификации [6]. Напряженность иммунитета (индекс иммунитета (ИИ)), т.е. способность вакцинного препарата предохранять животное от заражения массивными дозами вирулентной культуры, определяли по величине заражающей дозы, выраженной в LD₅₀ вирулентного штамма для интактных животных, при заражении которой на 21-е сутки выживает не менее 50 % животных, определяли по формуле:

$$\text{ИИ} = \frac{LD50_{\text{имм}}}{LD50_{\text{инт}}}$$

где ИИ – индекс иммунитета; LD50_{имм} – LD₅₀ для животных, иммунизированных исследуемым препаратом; LD50_{инт} – LD₅₀ для интактных животных, КОЕ.

Все эксперименты с животными, описанные в данной работе, одобрены комитетом по биоэтике Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии.

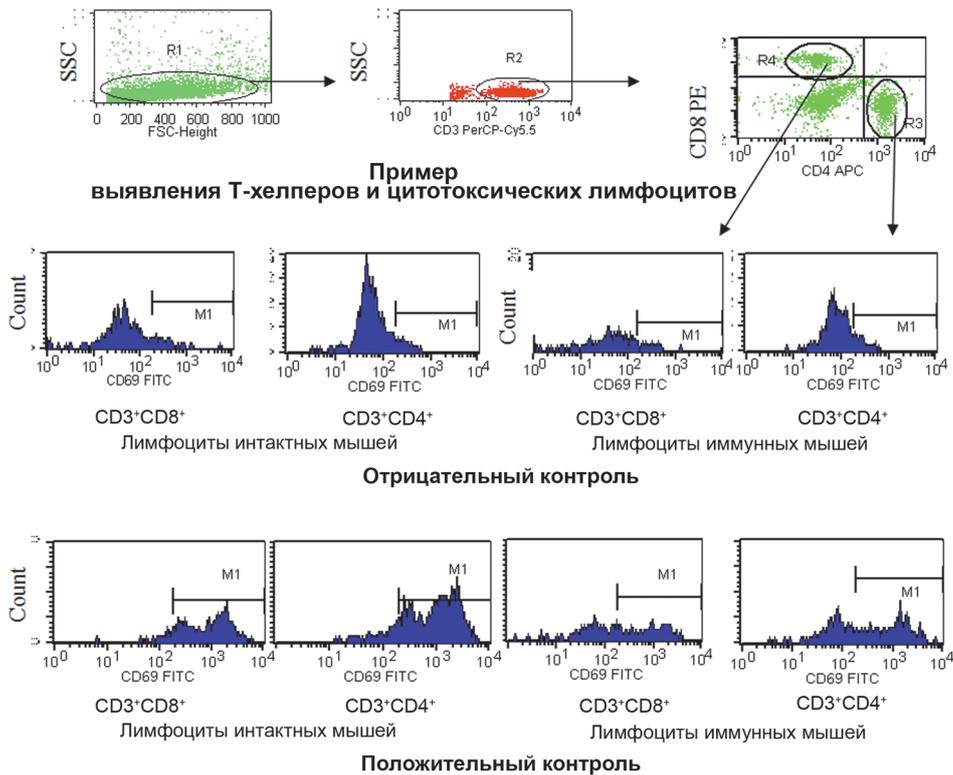
Результаты и обсуждение

На рис. 1 отображен порядок гейтирования лимфоцитов (логическое ограничение клеток по заданным параметрам), который позволяет выявить функционально-активированные субпопуляции Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов, несущих на поверхности CD69 рецептор.

В отрицательных контролях (клетки иммунных и интактных мышей, инкубированные 24 ч в полной среде RPMI) количество CD69-позитивных Т-хелперов и Т-супрессоров составляло 3–8 %. В положительных контролях (клетки иммунных и интактных мышей, инкубированные 24 ч в полной среде RPMI с ConA) появлялось до 90 % активированных CD69-клеток у интактных животных и 40–60 % CD69-позитивных лимфоцитов у животных, иммунизированных гидроксидом алюминия или антигенами чумного микроба, сорбированными на гидроокиси алюминия. Снижение способности лимфоцитов иммунных мышей экспрессировать ранний маркер активации CD69 в ответ на митогенный стимулятор ConA обусловлено развитием неспецифической иммунодепрессивной реакции за счет формирования иммунного ответа на антигены чумного микроба.

Стимуляция лимфоцитов интактных животных *in vitro* антигенами чумного микроба F1 или V в дозах 1 или 10 мкг/мл не приводила к усилению экспрессии на поверхности клеток CD69 рецептора (рис. 2).

Выраженное увеличение активированных Т-хелперов (60,69 %) и цитотоксических лимфоцитов (58,95 %) в ответ на стимуляцию спленоцитов *in vitro* F1 чумного микроба обнаружено в группе мышей, иммунизированных смесью антигенов чумного микроба F1 и V. Сыворотки крови этой группы мышей характеризуются высокими титрами антител к F1 и V антигенам чумного микроба (таблица). По сравне-



Пример выявления CD69⁺ цитотоксических лимфоцитов и Т-хелперов

Рис. 1. Экспрессия раннего маркера активации CD69 на Т-хелперах (CD3⁺CD4⁺) и цитотоксических лимфоцитах (CD3⁺CD8⁺) intactных и иммунных мышей

На рисунках показана последовательность выявления активированных популяций Т-лимфоцитов.

По боковому SSC и прямому FSC светорассеиванию гейтируют клетки различного размера без гранул – гейт (область) R1. Из гейта R1 выбирают позитивные по CD3⁺ рецептору лимфоциты R2. Внутри популяции CD3⁺ лимфоцитов (правая верхняя цитограмма) выделяют Т-хелперы CD3⁺CD4⁺ (R3) и цитотоксические лимфоциты CD3⁺CD8⁺ (R4). В каждой субпопуляции CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ клеток определяют процент CD69⁺ лимфоцитов. На линейных графиках (второй и третий ряд цитограмм) CD69-позитивные лимфоциты расположены под отрезком M1.

Положительный контроль – клетки intactных и иммунных мышей, стимулированные ConA; отрицательный – лимфоциты без стимуляции.

нию с фоном, средние значения которого составляли 0,02 оптических единицы против фосфатно-солевого буфера с Твином 20, достоверное повышение величины оптических плотностей для группы животных, иммунизированных смесью антигенов чумного микроба F1 и V, отмечалось при разведении сывороток $5 \cdot 10^{-6}$. У мышей, иммунизированных смесью анти-

генов чумного микроба F1 и V, формировался выраженный противочумный иммунитет (ИИ = 22241).

Достоверно-значимое увеличение CD69-позитивных лимфоцитов (18,61 % Т-хелперов и 23,25 % – цитотоксических лимфоцитов) в ответ на стимуляцию *in vitro* F1 чумного микроба отмечено также в группе мышей, иммунизированных F1 антигеном

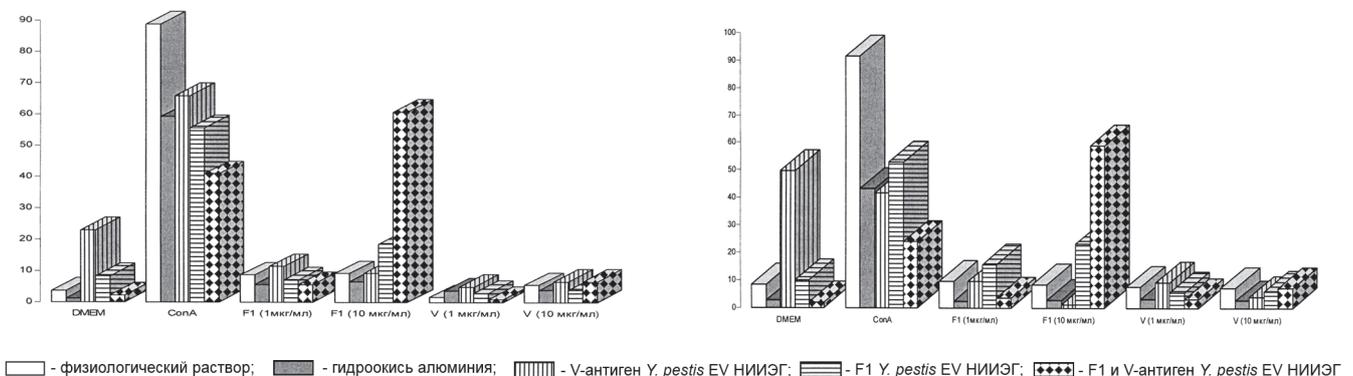


Рис. 2. Процент Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) и цитотоксических лимфоцитов (CD3⁺CD8⁺) intactных и иммунных мышей, экспрессирующих ранний маркер активации CD69, после стимуляции их *in vitro* антигенами чумного микроба

Левая диаграмма отображает процентное содержание CD69⁺ Т-хелперов, правая – CD69⁺ цитотоксических лимфоцитов. По оси абсцисс указано наличие стимуляторов в среде. Высота столбца отображает процент CD69-позитивных клеток в субпопуляции Т-лимфоцитов. Узор столбца идентифицирует группы мышей, иммунизированных одним и тем же препаратом

Оценка протективности поствакцинального противочумного иммунитета в экспериментальных группах мышей

Группа мышей	LD ₅₀ , КОЕ	ИИ	CD69 ⁺ , %*		Разведение сывороток ¹	
			CD3 ⁺ CD4 ⁺	CD3 ⁺ CD8 ⁺	F1	V
Интактные	1 (0,1–1,4)**	1	9,19	8,32	0	0
Иммунизированные Al(OH) ₃	1 (0,1–2)**	1	6,66	2,7	0	0
Иммунизированные V	222 (56–885)**	222	9,29	1,34	-	5·10 ⁻⁶
Иммунизированные F1	2224 (558–88544)**	2224	18,61	23,45	10 ⁻⁴	-
Иммунизированные F1 + V	22241 (7033–88543)**	22241	60,69	58,95	2·10 ⁻⁵	5·10 ⁻⁶

Примечания: ¹ – максимальное разведение сывороток, при котором выявляются антитела к антигенам чумного микроба; ИИ – индекс иммунитета; * n = 5 (спленоциты пулированы от 5 мышей); ** пределы колебаний LD₅₀.

чумного микроба. Максимальное разведение сывороток, при котором выявляли антитела к F1 антигену чумного микроба, составило 10⁻⁴. Индекс иммунитета составил 2224.

V антиген чумного микроба в дозах 1 или 10 мкг/мл не обладал способностью индуцировать *in vitro* усиление экспрессии CD69 рецептора на поверхности лимфоцитов мышей. Максимальное разведение сывороток, при котором выявляли антитела к V антигену чумного микроба, составило 5·10⁻⁶, индекс иммунитета – 2224.

Титры сывороток против антигена F1 у мышей, иммунизированных смесью антигенов, заметно превышали те же параметры у животных, которым вводили только F1, то есть при введении двух белков, антиген V усиливал гуморальный иммунный ответ на антиген F1. Титры антител против V антигена у мышей, иммунизированных только одним белком V и смесью белков, практически совпадали.

Увеличение невосприимчивости к заражению чумной инфекцией у мышей, иммунизированных смесью антигенов чумного микроба (F1 и V), коррелировало с появлением значительного количества CD69-позитивных Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов в ответ на стимуляцию их *in vitro* F1 антигеном чумного микроба.

Таким образом, экспрессия раннего маркера активации CD69 в субпопуляциях Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов в ответ на стимуляцию *in vitro* F1 *Y. pestis* коррелировала с напряженностью поствакцинального иммунитета к чуме, индуцированной иммунизацией F1 или смесью F1 и V антигенов.

Работа выполнена по проекту РФФИ 08-04-00405-а и Государственному контракту № 119-Д от 11.06.2009 г. в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белов Л.Г., Дальвадяню С.М. В кн.: Микробиологическая лабораторная диагностика и специфическая профилактика карантинных инфекций. Саратов; 1987. С. 84–90.
2. Дальвадяню С.М., Дробышева Т.М. Сравнительное изуче-

ние напряженности противочумного иммунитета у белых мышей, привитых «химической», убитой и живыми чумными вакцинами. Пробл. особо опасных инф. 1977; 6(58):31–3.

3. Коробкова Е.И. Живая противочумная вакцина. М.: Медгиз, 1956. 208 с.

4. Мейл Д. Иммунология. М.: Логосфера; 2007. 568 с.

5. Наумов А.В., Ледванов М.Ю., Дроздов И.Г. Иммунология чумы. Саратов; 1992. 172 с.

6. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Государственное издательство медицинской литературы, 1962. С. 85–104.

7. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. Clin. Microbiol. Rev. 2004; 17(2):434–64.

8. Smiley S.T. Cell-mediated defense against *Yersinia pestis* infection. Adv. Exp. Med. Biol. 2007; 603:376–86.

9. Testi R., D'Ambrosio D., De Maria R., Santoni A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. Immunol. Today. 1994; 15(10):479–83.

10. Tibball R.W., Williamson E.D. *Yersinia pestis* (plague) vaccines. Expert. Opin. Biol. Ther. 2004; 4(6):965–73.

11. Williamson ED, Flick-Smith HC, Lebutt C, Rowland CA, et al. Human immune response to a plague vaccine comprising recombinant F1 and V antigens. Infect. Immun. 2005; 73(6):3598–608.

12. Ziegler S.F., Ramsdell F., Alderson M.R. The activation antigen CD69. Stem Cells. 1994; 12(5):456–65.

V.V.Firstova, I.V.Bakhteeva, G.M.Titareva, E.V.Zyrina, S.A.Ivanov, N.V.Kisseleva, P.Kh.Kopylov, A.P.Anisimov, I.A.Dyatlov

Determination of the Expression of CD69 Marker of Early Activation in the Immune Mice Lymphocytes after their Stimulation with Plague Agent Antigens

SSC of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

Evaluated was the ability of plague microbe antigens F1 and V to activate specifically in the *in vitro* system subpopulations of T-lymphocytes of BALB/c mice immunized against plague. The level of CD69 expression at the lymphocytes surface was proposed to be evaluated as the marker of lymphocytes activation. Expression of CD69 early marker of activation in subpopulations of T-helpers and cytotoxic lymphocytes, reciprocated by the *in vitro* stimulation with *Y. pestis* F1, correlated with the intensity of the anti-plague postvaccinal immunity induced by immunization with F1 or F1 and V antigens mixtures.

Key words: plague, postvaccinal immunity, CD69 marker.

Об авторах:

Фирстова В.В., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Зырина Е.В., Иванов С.А., Киселева Н.В., Копылов П.Х., Анисимов А.П., Дятлов И.А. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Оболensk. E-mail: firstova@obolensk.org

Authors:

Firstova V.V., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Zyrina E.V., Ivanov S.A., Kisseleva N.V., Kopylov P.Kh., Anisimov A.P., Dyatlov I.A. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk. E-mail: firstova@obolensk.org

Поступила 21.10.09.

Б.А.Шабалин², В.Ю.Охупкина¹, И.В.Дармов¹, С.Л.Кузнецов³

ИЗУЧЕНИЕ ПАТОГЕННЫХ СВОЙСТВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БРУЦЕЛЛЕЗА В УСЛОВИЯХ ИСКУССТВЕННОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ

¹Федеральное государственное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации», ²Учреждение Российской академии наук «Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук», Киров; ³Управление биологической защиты Управления начальника войск радиационной, химической и биологической защиты Вооруженных Сил Российской Федерации, Москва

На основании экспериментальных исследований изучено влияние на течение бруцеллеза искусственно вызванного иммунодефицитного состояния. В опытах на лабораторных животных показано значительно более быстрое и интенсивное развитие в данных условиях инфекционного процесса, а также повышение частоты летального исхода заболевания, вызываемого возбудителями бруцеллеза.

Ключевые слова: бруцеллез, иммуносупрессия, вирулентность, летальность.

В естественных условиях каждый вид, а отчасти, и биотип возбудителей бруцеллеза, имеет строго очерченный круг восприимчивых хозяев, что в достаточной степени усложняет выбор универсальной экспериментальной модели для воспроизведения данной инфекции [1, 2]. В частности, для этих целей предлагалось использовать морских свинок, белых мышей, белых крыс, кроликов, обезьян, овец, телят и коров [3, 11]. Несмотря на возможность воспроизведения бруцеллеза на большей части указанных животных, предпочтение отдается морским свинкам и белым мышам, как наиболее хорошо изученным, доступным и удобным моделям.

В настоящее время для сравнительной количественной характеристики патогенных свойств культур штаммов бруцелл традиционно используется методика определения ИД₅₀ в опытах на морских свинках. Результаты исследования в этом случае учитываются исходя из совокупности данных, полученных как при бактериологическом, так и серологическом обследовании животных, инфицированных различными дозами микробов. При этом в равной степени положительными результатами считаются получаемые в опыте генерализованные, регионарные и даже субклинические формы инфекции, сопровождающиеся лишь серологической перестройкой организма при отрицательных результатах бактериологического обследования. Указанное обстоятельство способно повлиять на конечные результаты испытаний, поскольку одинаковые величины показателя ИД₅₀ обнаруживаются для культур, обуславливающих развитие как острых диссеминированных форм инфекции, так и для вызывающих регионарные и стертые его варианты. Кроме того, высоковирулентные культуры различных видов бруцелл практически не отличаются и не могут быть дифференцированы по величине показателя ИД₅₀.

В то же время, по данным ряда авторов [5, 6, 9, 10], патогенность для лабораторных животных может во многом зависеть от вида бруцелл. Согласно

результатам бактериологического, серологического и аллергологического исследований, способность прижиться и вызвать генерализацию инфекции в организме животных у культур вирулентных штаммов *Brucella abortus* значительно ниже, чем *B. melitensis* и *B. suis*. Кроме того, они вызывают меньшие деструктивные изменения во внутренних органах, маскирующие патоморфологические проявления заболевания.

Следует учитывать, что белые мыши в отличие от морских свинок более резистентны к заражению возбудителями бруцеллеза и отличаются значительными колебаниями индивидуальной реактивности. Для них характерны высокие значения величины ИД₅₀ и низкий индекс высеваемости из органов. По данным литературы [7], парентеральное заражение белых мышей удается осуществить лишь при использовании дозы возбудителя не менее 100 живых микробов. При этом заболевание развивается, как правило, только у 80 % животных, а генерализованная форма – у 92 % из них.

Имеются указания [4], что вирулентные характеристики культур возбудителей бруцеллеза возможно также оценивать при внутрибрюшинном введении белым мышам высоких (свыше 100 млн) доз микробов с последующим наблюдением за животными в течение 7–14 сут. Подобный методический прием обеспечивает воспроизведение практически у всех взятых в опыт животных специфического острого септицемического процесса, позволяющего проследить у них гибель.

Исход заболевания в данном случае определяется сочетанным механизмом его развития. В первую очередь, гибель белых мышей наступает в результате прямого летального воздействия липополисахарида бруцелл, находящихся в инокуляте. В дальнейшем она является следствием нарастающей септицемии, возникающей в ходе массивного обсеменения внутренних органов и приводящей к их тяжелым деструктивным поражениям. Показателями вирулент-

ности служат величины летальных доз микробов, а также динамика гибели мышей.

С использованием указанного метода проведены исследования по сравнительному изучению летальных свойств основных патогенных для человека видов возбудителей бруцеллеза. При этом белых мышей заражали внутрибрюшинно двухсуточными агаровыми культурами вирулентных штаммов *B. melitensis* 16М, 565, *B. abortus* 544 и *B. suis* 1330 и вакцинных штаммов *B. melitensis* Rev-1 и *B. abortus* 19ВА в дозах от 100 млн до 10 млрд микробов. Гибель животных учитывали в течение 7 сут с момента заражения с подтверждением ее специфичности бактериологическим методом. Величины показателя ЛД₅₀ рассчитывали на 1-е и 7-е сутки наблюдения (табл. 1).

Как следует из данных табл. 1, на 1-е сутки наблюдения между культурами бруцелл отсутствуют значительные различия по величине показателя летальности для животных. Это, вероятно, связано с тем, что гибель животных в течение 1 сут после заражения обусловлена, в первую очередь, токсическим действием липополисахарида введенных бактерий, который по данным свойствам близок для бруцелл разных видов. Не случайно летальный эффект при введении животным убитой культуры возбудителя был сопоставим с таковым при введении живых микробов.

К 7-м суткам наблюдения обнаруживаются различия величин показателя ЛД₅₀ между исследуемыми штаммами бруцелл, обусловленные их способностью вызывать поражения органов и тканей. Закономерно, что меньшие значения получены для культур вакцинных штаммов *B. melitensis* Rev-1, *B. abortus* 19ВА, а также вирулентного штамма *B. abortus* 544, который, согласно данным литературы [9, 10], вследствие своей видовой принадлежности вызывает менее выраженные патоморфологические повреждения органов в ходе заболевания. Значение показателя ЛД₅₀ для убитой культуры к 7-м суткам осталось практически на исходном уровне.

Обращают на себя внимание результаты исследования авторов, указывающих на значительное возрастание летальности при бруцеллезе на фоне снижения защитных функций организма [4, 8]. В связи

с этим на следующем этапе исследований было оценено летальное действие культур возбудителя бруцеллеза при внутрибрюшинном заражении белых мышей на фоне блокады иммунной системы. В опытах использовали цитостатик из группы алкилирующих соединений циклофосфан, характеризующийся достаточно быстрым развитием эффекта даже при однократном введении. Так, показано, что введение данного препарата животным в дозе 200 мг·кг⁻¹ уже через 24–48 ч обеспечивает выраженную иммуносупрессию [4].

В ходе экспериментов белым мышам вводили антибиотик в дозе 4 мг парентерально. Через 24 ч животных заражали двухсуточными агаровыми культурами штаммов: типовых *B. melitensis* 16М, *B. abortus* 544, *B. suis* 1330; природных *B. melitensis* 565, 21, 145 и вакцинных *B. melitensis* Rev-1 и *B. abortus* 19ВА в нарастающих дозах от 100 тыс. до 1 млрд микробов. Гибель животных учитывали в течение 7 сут с момента заражения с подтверждением ее специфичности бактериологическим методом. Величины показателя ЛД₅₀ рассчитывали на 1-е и 7-е сутки наблюдения (табл. 2).

Анализ данных табл. 2 свидетельствует, что иммуносупрессия значительно усиливает летальный эффект культур возбудителя бруцеллеза как на 1-е, так и в значительной степени на 7-е сутки. При этом отчетливо проявляется разница в величинах показателя ЛД₅₀ для культур разных видов бруцелл. Более низкие значения показателя отмечались для культур видов *B. melitensis* и *B. suis*. Минимальной данная величина была для природного штамма *B. melitensis* 145. Среди прочих вирулентных культур сравнительно менее патогенной оказалась культура штамма *B. abortus* 544. В то же время по данным оценки ИД₅₀ традиционным методом при внутрибрюшинном заражении белых мышей и подкожном заражении морских свинок культуры всех вирулентных штаммов характеризовались близкими значениями показателя ИД₅₀, и различия между ними не выявлялись. Как и

Таблица 1

Вирулентность (ЛД₅₀) культур штаммов возбудителей бруцеллеза при внутрибрюшинном заражении белых мышей (X ± I₉₅, n=3)

Культура штамма	Величина показателя ЛД ₅₀ на ... сутки наблюдения, живые микробы	
	1	7
<i>B. melitensis</i> 16М	(2,6 ± 1,4)·10 ¹⁰	(0,9 ± 0,9)·10 ¹⁰
<i>B. melitensis</i> 565	(2,0 ± 1,1)·10 ¹⁰	(0,6 ± 1,5)·10 ¹⁰
<i>B. melitensis</i> Rev-1	(6,3 ± 1,4)·10 ¹⁰	(3,9 ± 1,5)·10 ¹⁰
<i>B. abortus</i> 544	(4,1 ± 1,8)·10 ¹⁰	(1,9 ± 1,3)·10 ¹⁰
<i>B. abortus</i> 19ВА	(4,2 ± 1,9)·10 ¹⁰	(3,0 ± 1,6)·10 ¹⁰
<i>B. suis</i> 1330	(3,9 ± 1,1)·10 ¹⁰	(0,1 ± 1,1)·10 ¹⁰
Инактивированная нагреванием культура штамма <i>B. melitensis</i> 16М (контроль)	(6,2 ± 1,3)·10 ¹⁰	(6,0 ± 1,6)·10 ¹⁰

Таблица 2

Вирулентность (ЛД₅₀) культур штаммов возбудителей бруцеллеза при внутрибрюшинном заражении белых мышей с блокированными циклофосфаном функциями (X ± I₉₅, n=3)

Культура штамма	Величина показателя ЛД ₅₀ на ... сутки наблюдения, живые микробы	
	1	7
<i>B. melitensis</i> 16М	(3,9 ± 1,2)·10 ⁹	(1,5 ± 1,1)·10 ⁸
<i>B. melitensis</i> 565	(1,6 ± 1,4)·10 ¹⁰	(1,6 ± 1,4)·10 ⁸
<i>B. melitensis</i> 145	(1,6 ± 1,2)·10 ⁹	(7,9 ± 1,1)·10 ⁷
<i>B. melitensis</i> 21	(7,9 ± 1,2)·10 ⁹	(3,2 ± 0,9)·10 ⁸
<i>B. melitensis</i> Rev-1	(1,6 ± 1,5)·10 ¹⁰	(3,2 ± 1,2)·10 ⁹
<i>B. abortus</i> 544	(6,6 ± 1,5)·10 ⁹	(6,9 ± 1,5)·10 ⁸
<i>B. abortus</i> 19ВА	(6,3 ± 1,7)·10 ¹⁰	(4,0 ± 1,1)·10 ⁸
<i>B. suis</i> 1330	(3,2 ± 1,5)·10 ⁹	(1,5 ± 1,5)·10 ⁸
Инактивированная нагреванием культура штамма <i>B. melitensis</i> 16М (контроль)	(3,9 ± 1,9)·10 ¹⁰	(3,8 ± 1,7)·10 ¹⁰

Таблица 3

Вирулентность (ИД₅₀) культур вакцинных штаммов *B. abortus* 19 VA и *B. melitensis* Rev-1 при внутрибрюшинном заражении белых мышей с блокированными циклофосфаном функциями (X ± I₉₅, n=3)

Группа животных	Величина показателя ИД ₅₀ для культуры штамма ..., живые микробы	
	<i>B. abortus</i> 19 VA	<i>B. melitensis</i> Rev-1
Получивших циклофосфан	4720,2 ± 1,4	3388,4 ± 1,7
Контрольная	11200,0 ± 1,5	9025,6 ± 1,4

следовало ожидать, меньший летальный эффект был характерен для культур вакцинных штаммов.

На следующем этапе исследований представлялось целесообразным оценить влияние иммуносупрессии на характеристики показателя ИД₅₀. Поскольку величины данного показателя для вирулентных культур и в обычных условиях оказываются низкими, в опытах использовались культуры вакцинных штаммов *B. abortus* 19 VA и *B. melitensis* Rev-1, изменение величин ИД₅₀ у которых можно достоверно зарегистрировать в более широких пределах.

Белым мышам за сутки до заражения вводили циклофосфан в дозе 4 мг. Величины показателя ИД₅₀ определяли при внутрибрюшинном инфицировании животных по общепринятой методике. В качестве контроля служила группа мышей без введения цитостатика (табл. 3).

Согласно полученным данным (табл. 3) на фоне иммуносупрессии вирулентность культур вакцинных штаммов для белых мышей при внутрибрюшинном заражении увеличилась в несколько раз.

На основании вышеизложенного можно сделать заключение о значительном влиянии на течение бруцеллеза сопутствующего иммунодефицитного состояния. В данном случае отмечается не только более быстрое и интенсивное развитие инфекционного процесса, но также и вероятность повышения летальности вызываемого возбудителем бруцеллеза заболевания. Особо необходимо отметить отрицательное воздействие предшествующей иммуносупрессии на течение вакцинального процесса, так как при этом создаются благоприятные условия для реализации остаточной вирулентности культур вакцинных штаммов.

Полученные данные свидетельствуют о целесообразности использования методического приема, связанного с созданием искусственной иммуносупрессии, с целью первичной сравнительной оценки патогенных свойств различных штаммов бруцелл.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вершилова П.А., Голубева А.А. Бруцеллез в СССР. М.; 1970.
2. Вершилова П.А., редактор. Бруцеллез. М.; 1972
3. Вершилова П.А., Чернышева М.И., Князева Э.Н. Патогенез и иммунология бруцеллеза. М.: Медицина; 1974.
4. Гордиенко Л.Н., Булдыгин Д.В., Ощепков В.Г. и др. Способ оценки вирулентных свойств S-форм бруцелл. Патент на изобретение № 2209251. Бюл. «Изобретения, полезные модели». М., 2003; 17.
5. Кайтмазова Е.И., Островская Н.Н. К вопросу о характеристике бруцелл, выделенных на территории СССР. Сообщение I. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1967; 1: 12–6.
6. Кайтмазова Е.И., Островская Н.Н. К вопросу о характеристике бруцелл, выделенных на территории СССР. Сообщение II. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1967; 2: 66–70.
7. Корзенко В.Н. Бруцеллез человека. Минск; 1980.
8. Ременцова М.М., Грушина Т.А. Влияние гидрокортизона и методов заражения на высвасимость бруцелл из организма белых мышей. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1978; 1: 61–5
9. Таран И.Ф. О некоторых особенностях патогенеза и иммуногенеза бруцеллезной инфекции. В кн.: Тез. докл. научной конференции по вопросам микробиологии, иммунологии и вакцинопрофилактики бруцеллеза; Москва, 9–10 февраля 1966 г. М.; 1966. С. 46–9.
10. Таран И.Ф., Мухамедьянов С.М., Галко И.К. Бруцеллез: Принципы эпидемиологического анализа, профилактики и борьбы. Ташкент: Медицина; 1983
11. Триленко П.А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных. Ленинград; 1976.

B.A. Shabalin, V.Yu. Okhapkina, I.V. Darmov, S.L. Kuznetsov

Study of Pathogenic Properties of Brucellosis Agents under Artificial Immunosuppression Conditions

48 Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation; The Institute of Physiology, Komi Science Center, the Ural Division of the Russian Academy of Sciences; Biological Defense Division of the Administration of the Commander of the Forces of Radiation, Chemical and Biological Defense of the Russian Federation Armed Forces

The influence of artificial immunodeficiency state upon brucellosis course has been studied experimentally. Trials on laboratory animals demonstrated faster and more intensive progression of infectious process as well as increased frequency of the fatal cases of the disease caused by brucellosis agents.

Key words: brucellosis, immunosuppression, virulence, lethality.

Об авторах:

Охупкина В.Ю., Дармов И.В. 48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны РФ. Киров.
Шабалин Б.А. Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук. Киров.
Кузнецов С.Л. Управление биологической защиты Управления начальника войск радиационной, химической и биологической защиты вооруженных сил РФ.

Authors:

Okhapkina V.Yu., Darmov I.V. 48 Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Kirov.
Shabalin B.A. The Institute of Physiology, Komi Science Center, the Ural Division of the Russian Academy of Sciences. Kirov.
Kuznetsov S.L. Biological Defense Division of the Administration of the Commander of the Forces of Radiation, Chemical and Biological Defense of the Russian Federation Armed Forces.

Поступила 08.12.09.

Н.А.Шарапова, Е.Г.Абрамова, А.К.Никифоров, М.Н.Киреев, Л.В.Савицкая, Л.Н.Минаева,
Т.А.Михеева, М.В.Галкина, Я.М.Краснов

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ АНТИРАБИЧЕСКИХ СЫВОРОТОК И ПРЕПАРАТА ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА *IN VITRO* В ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗЕ

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Впервые сконструирован диагностикум на основе наночастиц коллоидного золота со средним размером 15–17 нм для обнаружения специфических антител к вирусу бешенства в антирабических сыворотках и препарате антирабического иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе [15]. Проведены исследования по выявлению корреляции между результатами реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах и дот-иммуноанализа. Результаты последнего коррелируют с таковыми в реакции нейтрализации и, следовательно, предложенный метод можно рассматривать как альтернативный методу *in vivo* – реакции нейтрализации на белых мышах. Применение метода *in vitro* актуально при исследовании активности антирабических сывороток на этапе иммунизации лошадей.

Ключевые слова: бешенство, наночастицы, коллоидное золото, диагностикум.

Бешенство, в связи с абсолютной летальностью и необходимостью проведения курса лечебно-профилактических прививок по жизненным показаниям, является серьезной проблемой практического здравоохранения. Эпизоотическая и эпидемическая ситуация в большинстве регионов России по бешенству чрезвычайно сложна, и поэтому организации мер борьбы с опасной болезнью, общей для человека и животных, придается особое значение [3, 10, 14]. Ежегодно в Российской Федерации за антирабической помощью обращаются около 500 тыс. чел., примерно половина из них получает направление на специфическое антирабическое лечение [10]. Для экстренной профилактики заболевания людей гидрофобией при тяжелых укусах бешеными или подозрительными на бешенство животными применяют антирабический иммуноглобулин в сочетании с антирабической вакциной [12, 19].

При производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина уровень активности антирабических сывороток и готового препарата определяют *in vivo* в реакции нейтрализации (РН) вируса бешенства на белых мышах [8]. Однако данный метод трудоемок, требует большого количества животных, длительного времени наблюдения (14 дней) и предполагает использование инфекционного агента. В связи с этим актуальной представляется разработка альтернативных методов определения специфической активности антирабических гипериммунных сывороток и иммуноглобулина, что неоднократно подчеркивал в своих документах комитет экспертов ВОЗ [24, 25].

В производстве антирабических препаратов для обнаружения специфических антител в иммунных сыворотках *in vitro* применяют следующие методы: реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) [21], недостатками которой являются использование для конструирования диагностикума нестабильных биологических компонентов и трудоемкость постановки; тест ингибции фокусов флуоресценции

(ТИФФ) [13], который является трудоемким, дорогостоящим, требующим наличия квалифицированных специалистов и специального оборудования для работы с перевиваемой культурой клеток, использования токсичных реагентов для фиксации клеток; реакция диффузионной преципитации (РДП) [19], реакция связывания комплемента (РСК) [20], недостатками которых является их низкая чувствительность; иммуноферментный анализ (ИФА) [5, 17], при постановке которого применяют токсичные, канцерогенные хромогены, а учет результатов предусматривает использование спектрофотометрического анализатора. Последний из вышеперечисленных методов наиболее распространен в биотехнологической практике.

Указанные недостатки методов обусловили необходимость разработки безынструментальных тест-систем с использованием неферментных диагностикумов для определения уровня специфических антител [16]. На наш взгляд, оптимальным решением данной задачи является применение дот-иммуноанализа с использованием конъюгата на основе наночастиц коллоидного золота (КЗ). До настоящего времени дот-иммуноанализ не находил широкого применения в производстве антирабического иммуноглобулина в связи с отсутствием соответствующих коммерческих диагностикумов для исследования активности иммунных сывороток.

В последние годы возрастает количество публикаций, посвященных применению наночастиц КЗ и его конъюгатов в твердофазном иммуноанализе для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний человека и животных [4, 9, 23]. На сегодняшний день наночастицы КЗ, используемые в качестве метки, являются важным компонентом современных иммунохимических тест-систем [5, 7]. Процедура получения КЗ и его комплексов с антигенами экспрессна, предусматривает использование одноэтапной методики приготовления. Использование в качестве маркера КЗ исключает целый ряд дополнительных процедур,

свойственных ИФА, кроме того, чувствительность тест-систем с использованием золотосодержащих маркеров превосходит чувствительность методов с использованием ферментных меток [4].

Целью настоящего исследования явилось конструирование диагностикума на основе наночастиц КЗ для определения специфической активности антирабических сывороток и иммуноглобулина в дот-иммуноанализе и изучение возможности применения диагностикума при производстве антирабического иммуноглобулина.

Материалы и методы

Использовали инактивированную кроличью вирусосодержащую 10 % мозговую суспензию и осажденный из суспензии путем сахарозо-ацетоновой экстракции фиксированный вирус бешенства штамма «Москва-3253» [2]. Работы по получению и инактивации вирусосодержащей мозговой суспензии проводили в соответствии с МУ 3.3.1.1099-02 [11] и СП 1.3.2322-08 [18].

Раствор КЗ с диаметром частиц 15–17 нм получали по методу Г.Френса из золотохлористоводородной кислоты [22]. Для максимального удаления балластных частиц ткани мозга инактивированный вирусосодержащий материал центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин и фильтровали через нитроцеллюлозный фильтр с размером пор 0,22 мкм. «Золотое число» определяли по методу Р.Жигмонди [6]. Для оптимальных условий стабилизации увеличивали рН коллоидного раствора золота 0,2 М раствором углекислого калия (0,2 М K_2CO_3) до рН 7,0. Далее в раствор коллоидного золота с оптимальным значением рН 7,0 добавляли необходимое количество антигена в соотношении по объему маркера к антигену от 10:1 до 320:1 в соответствии с выявленным «золотым числом». С целью блокировки свободных сайтов поверхности наночастиц золота и вторичной стабилизации конъюгата к нему добавляли 0,5 % раствор высокомолекулярного полимера ПЭГ-20М до конечной концентрации 0,02 %. Затем полученный диагностикум выдерживали при температуре 3–5 °С не менее 1 ч, по истечении которого конъюгат брали в работу.

В качестве твердой фазы при постановке прямого варианта дот-иммуноанализа применяли расчерченную на квадраты нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,45 мкм. В микротитровальных планшетах готовили последовательные двукратные разведения исследуемых образцов на деионизованной воде 1/20, 1/40, 1/80 и т. д. по 20 мкл. Исследуемый образец сыворотки или иммуноглобулина наносили на нитроцеллюлозную мембрану аликвотами по 2 мкл. Полоску мембраны с нанесенными образцами выдерживали до полного высушивания. Для блокировки свободных сайтов связывания мембрану погружали в 0,5 % раствор ПЭГ-20М или 1–3 % раствор БСА, приготовленные на деионизованной воде, и инкубировали в течение 15 мин при температуре

20–22 °С. После инкубации мембрану промывали деионизованной водой и помещали в пакет-камеру из пленки типа «Parafilm», куда добавляли 400 мкл диагностикума. Мембрану выдерживали до появления красных пятен. Для повышения чувствительности метода проводили процедуру усиления цветового сигнала, для чего мембрану погружали в раствор физического проявителя. Трехкомпонентный проявитель готовили непосредственно перед использованием, для чего к 600 мкл деионизованной воды добавляли 400 мкл 0,5 % раствора лимонной кислоты, 1000 мкл 0,2 % раствора метола и 40 мкл 0,2 % раствора нитрата серебра. После процедуры усиления мембрану отмывали в деионизованной воде и высушивали.

За титр сыворотки или иммуноглобулина принимали то наибольшее разведение, при котором визуально регистрировали четко различимое пятно.

Результаты и обсуждение

При исследовании специфической активности препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина (АИГ) методом *in vitro* положительный результат регистрировали в разведении 1:5000 – 1:10000, у отдельных серий – до 1:20000. Для выявления корреляции результатов дот-иммуноанализа и РН проводили сравнительное изучение активности препарата АИГ серий № 34–46 (таблица).

Титры специфических антител, выявленные в реакции нейтрализации на мышах, колебались в пределах от 1:2576 до 1:13772, титры специфических антител, определенные методом дот-иммуноанализа, – от 1:2500 до 1:20000. Показана линейная корреляция между результатами РН и дот-иммуноанализа, коэффициент корреляции $r = 0,9$ [1].

Уровень активности гипериммунных антирабических лошадиных сывороток, выявленный методом дот-иммуноанализа, соответствовал значениям 1:320 – 1:640, у отдельных сывороток – до 1:1280.

На рисунке представлены результаты определения активности препарата гетерологичного иммуноглобулина различных серий (а) и антирабических гипериммунных сывороток (б) методом дот-иммуноанализа. КЗ, входящее в состав диагностикума, обеспечивает интенсивное розовое или краснокоричневое окрашивание пятен, соответствующих положительной реакции последовательных разведений исследуемых образцов с конъюгатом.

Несомненный научный и практический интерес представляло изучение возможности применения сконструированного на основе наночастиц КЗ диагностикума при определении активности сывороток людей, прошедших специфическое антирабическое лечение в связи с укусом подозрительных на бешенство животных. В работе была исследована сыворотка пациента С., прошедшего курс вакцинации концентрированной культуральной антирабической вакциной. Материал для изучения был взят через месяц после окончания вакцинации. При определении

Специфическая активность препарата антирабического иммуноглобулина и антирабических лошадиных гипериммунных сывороток в тестах *in vivo* (РН) и *in vitro* (дот-иммуноанализ)

Номер серий препарата АИГ	Титр специфических антител в РН	Количество LD ₅₀ /0,03 мл в РН	Активность в РН, МЕ/мл	Титр специфических антител в ДИА
34	1:8000	333	320	1:10000
35	1:8812	333	360	1:10000
36	1:12912	333	410	1:10000
37	1:7962	562,5	621	1:5000
38	1:5623	576,5	634	1:5000
39	1:2951	562,5	230	1:2500
40	1:7130	469	358	1:5000
41	1:8689	469	434	1:10000
42	1:2576	576,5	291	1:2500
43	1:12302	617,8	419	1:10000
44	1:10000	617,8	341	1:10000
45	1:13772	316	556	1:20000
46	1:10839	316	438	1:10000
Средняя геометрическая титров 1:8582				Средняя геометрическая титров 1:8462

уровня содержания вируснейтрализующих антител в крови вакцинированного выявлен титр 1:1280.

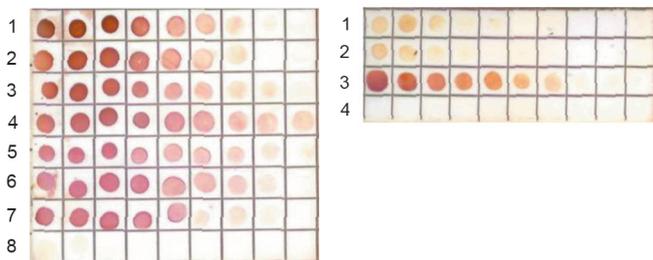
Таким образом, для определения активности антирабических гипериммунных сывороток и готового препарата иммуноглобулина предложен прямой вариант дот-иммуноанализа, рассматриваемый как альтернативный методу *in vivo* – реакции нейтрализации на белых мышах, особенно актуальный на этапе иммунизации лошадей-продуцентов, когда необходимо оценить активность иммунных сывороток в короткие сроки с целью определения тактики эксплуатации лошади. Результаты дот-иммуноанализа коррелируют с таковыми в реакции нейтрализации. Предлагаемый метод прост и экономичен как в отношении трудозатрат, так и времени, не требует применения инфекционного агента, лабораторных животных и специального оборудования для учета результатов. Применение неферментного конъюгата при постановке дот-иммуноанализа безопасно для

пользователя, поскольку коллоидное золото нетоксично и неаллергенно.

Работа выполнена по Государственному контракту № 115-Д от 11.06.2009 г. в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев П.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.; 1962. 180 с.
2. Выявление циркуляции арбовирусов. Методы вирусологических и серологических исследований. Клинико-эпидемиологические характеристики малоизученных арбовирусных инфекций. Подходы к мониторингу природных очагов арбовирусов (методические рекомендации). Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Вирусология. 1991; 25. 116 с.
3. Данилов А.Н., Фёдорова З.П., Кожанова О.И. Эпизоотическая ситуация по бешенству в Саратовской области и некоторые проблемы профилактики рабической инфекции. Матер. IX съезда Всероссийского науч.-практ. об-ва эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. М.; 2007. 165 с.
4. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Щеголев С.Ю., Хлебцов Н.Г. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение. М.: Наука, 2008. 259 с.
5. Евстигнеев О.В., Ручко С.В., Борисевич С.В. и др. Разработка и экспериментальное изучение иммуноферментных тест-систем для выявления антигена вируса бешенства и антител к нему. В кн.: Актуальные проблемы защиты от возбудителей опасных и особо опасных инфекционных заболеваний: Матер. науч.-практ. конф. Сергиев Посад, 2004. С. 128–9.
6. Жигмонди Р. Коллоидная химия. Харьков, Киев: Изд-во НК Снаба УССР; 1933. 452 с.
7. Загоскина Т.Ю., Марков Е.Ю., Калиновский А.И. и др. Выявление антигенов бруцелл методом дот-иммуноанализом с использованием стафилококкового белка А, меченного частицами коллоидного золота. Пробл. особо опасных инф. 1999; 77: 77–81.
8. Каплан М., Копровски Х., редакторы. Методы лабораторных исследований по бешенству. Женева: ВОЗ; 1975. С. 94–97.
9. Краснов Я. М. Исследование агрегации наночастиц коллоидного золота и их конъюгатов с биополимерами [дис. ... канд. хим. наук]. Саратов; 2003. 126 с.
10. Львов Д.К., редактор. Медицинская вирусология: Руководство. М.: ООО Медицинское информационное агентство; 2008. 656 с.
11. Методические указания «Безопасность работы с производственными штаммами фиксированного вируса бешенства» МУ 3.3.1.1099-02. М.; 2002. 28 с.
12. Мовсисянц А.А. Препараты для профилактики бешенства. В кн. Медицинские иммунобиологические препараты для



Результаты дот-иммуноанализа с использованием конъюгата с наночастицами золота:

- а – по оси абсцисс: двукратные разведения иммуноглобулина, начиная с 1:160; по оси ординат: 1–7 – антирабический иммуноглобулин серий 02, 09, 12, 13, 14, 19, 32; 8 – нормальная лошадиная сыворотка (отрицательный контроль);
- б – по оси абсцисс: двукратные разведения сывороток и иммуноглобулина, начиная с 1:160; по оси ординат: 1, 2 – антирабические лошадиные сыворотки; 3 – антирабический иммуноглобулин серии 37; 4 – нормальная лошадиная сыворотка (отрицательный контроль)

профилактики, диагностики и лечения актуальных инфекций. М.; 2004. С. 47–48.

13. Недосеков В.В., Вишняков И.Ф., Жестерев В.И. и др. Титрование антирабических антител с помощью теста ингибции фокусов флуоресценции. Ветеринария. 1998; 7: 28–30.

14. Онищенко Г.Г., Верещагин А.И. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2006 году: Государственный доклад. М.: Федеральний центр гигиены Роспотребнадзора; 2007. 360 с.

15. Подборонова Н.А., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К. и др. Иммунодиагностикум и тест-система для определения активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* методом дот-иммуноанализа. Патент RU 2360252. 27.06.2009

16. Раев М.Б., Орлова Е.Г., Горбунова О.Л. и др. Конструирование и применение универсальной тест-системы с использованием неферментных диагностикумов для безинструментальной оценки уровня специфических антител. Биотехнология. 2006; 1: 84–88.

17. Сазанова Э.Я., Кузнецова С.В., Маслов Е.В. и др. Иммуоферментный анализ при индикации вируса бешенства и определении уровня антител. Ветеринария. 1991; 8: 63–4.

18. Санитарные правила «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» СП 1.3.2322-08. М., 2008.

19. Селимов М.А., Клюева Е.В., Аксенова Т.А. и др. Лечение инактивированной культуральной антирабической вакциной и антирабическим гамма-глобулином людей, укушенных бешеными или подозрительными на бешенство животными. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1978; 12: 105–12.

20. Тюшнякова М.К., Неболюбова Г.Е. Реакция связывания комплемента как метод определения специфической активности антирабической сыворотки и гамма-глобулина. Тр. Томского НИИВС. Томск; 1960: XII: 261–5.

21. Шафеева Р.С., Шамсувалеева А.К. Использование РНГА для титрования сывороток доноров при получении антирабического иммуноглобулина из крови человека. В кн.: Роль иммунобиологических препаратов в современной медицине. Уфа; 1995. Ч. 1. С. 206–8.

22. Frens G. Controlled nucleation for the particle size in monodisperse gold suspension. Nature Phys. Sci.; 1973.

23. Petrov R.V., Shwartsburd B.I., Bogatyrev V.A. et al. Solid-phase immunoassay with colloidal gold conjugates for diagnosis of HIV-infection. In: 15th Intern. Congr. biochem. Jerusalem; 1991.

24. World Health Organization. Expert Consultation on Rabies. Technical Report Series 824. Geneva, Switzerland; 1994.

25. World Health Organization. Expert Consultation on Rabies. Technical Report Series 931, Geneva, Switzerland; 2005.

N.A.Sharapova, E.G.Abramova, A.K.Nikiforov, M.N.Kireev, L.V.Savitskaya, L.N.Minaeva, T.A.Mikheeva, M.V.Galkina, Ya.M.Krasnov

Determination of the Activity of the Anti-Rabies Sera and Heterologous Anti-Rabies Immunoglobulin *in vitro* in the Dot Immunoassay

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

For the first time constructed was a diagnosticum based on colloid gold nanoparticles (with an average size of about 15–17 nm) to detect specific antibodies against rabies virus in the anti-rabies sera and immunoglobulin *in vitro* in the dot-immunoassay [24]. Investigated was the correlation between the results of the rabies virus neutralization test on white mice and the results of the dot immunoassay. The results of the dot immunoassay correlated with those of the neutralization test on white mice. Thus, the method offered can be considered as an alternative to the *in vivo* neutralization test. This *in vitro* method can be used to test the activity of the anti-rabies sera at the stage of horses immunization.

Key words: rabies, nanoparticles, colloid gold, diagnosticum.

Об авторах:

Шарапова Н.А., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Киреев М.Н., Савицкая Л.В., Минаева Л.Н., Михеева Т.А., Галкина М.В., Краснов Я.М. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Sharapova N.A., Abramova E.G., Nikiforov A.K., Kireev M.N., Savitskaya L.V., Minaeva L.N., Mikheeva T.A., Galkina M.V., Krasnov Ya.M. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 01.10.09.

Е.Н.Афанасьев, И.С.Тюменцева, О.И.Коготкова, Л.В.Ляпустина, И.В.Жарникова,
И.В.Савельева, Д.А.Будыка

РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПОДХОДОВ К ПОЛУЧЕНИЮ ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА МЕДИЦИНСКИХ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»

Разработаны эффективные схемы иммунизации для получения чумных, бруцеллезных, сибиреязвенных, туляремиальных, холерных, лептоспирозных, легионеллезных, кампилобактериозных гипериммунных сывороток, основанные на оптимальной комбинации специфических белковых антигенных комплексов с иммуномодуляторами, обеспечивающие высокий специфический иммунный ответ практически у 100 % животных, значительное сокращение сроков иммунизации, материальных и трудовых затрат. Полученные иммунные сыворотки являются высококачественным биологическим сырьем для производства различных диагностических иммунобиологических препаратов.

Ключевые слова: антиген, антитело, иммунные сыворотки, схемы иммунизации, иммунокорректор.

Для изготовления тест-систем иммуноферментных, магноимносорбентных, иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих, диагностикумов эритроцитарных требуются преципитирующие антитела (Аг), которые получают при гипериммунизации животных растворимыми антигенами (Аг). Это можно объяснить тем, что при использовании корпускулярных антигенов титры Аг при первичном и вторичном иммунном ответе мало различаются. При введении животным растворимых Аг увеличивается синтез Аг при вторичном иммунном ответе [10, 11].

В процессе иммунизации необходимо учитывать целый ряд факторов: физико-химическое состояние Аг, дозы, способы, интервалы и кратность введения Аг, общую продолжительность цикла иммунизации, применение адъювантов и иммунокорректоров, которые в совокупности должны обеспечивать получение иммунных сывороток с достаточно высоким титром специфических Аг за сравнительно короткий промежуток времени при минимальном расходовании антигенного и другого материала и не приводить к состоянию иммунологической толерантности животного.

Цель исследования – разработка эффективной схемы иммунизации животных для получения высокоактивных, специфичных гипериммунных сывороток, являющихся качественным биологическим сырьем для производства медицинских иммунобиологических препаратов.

Материалы и методы

Водорастворимые Аг получали из стерильных микробных биомасс возбудителей чумы, бруцеллеза, сибирской язвы, туляремии, холеры, лептоспироза, легионеллеза, кампилобактериоза методом водно-солевой экстракции с последующей ультразвуковой дезинтеграцией.

В опытах были использованы 500 кроликов обоего пола породы шиншилла массой 3–3,5 кг. В процессе содержания животных поддерживали рекомендуемый режим питания согласно приказу № 1179 [5].

Количественное определение белка проводили методом сравнения поглощения белков при 280 и 260 нм на спектрофотометре СФ-46 [13]. Титр специфических Аг в сыворотках крови определяли в непрямой реакции иммунофлуоресценции (РНИФ) [14]. Специфическую активность Аг и полученных иммунных сывороток определяли в реакции иммунодиффузии (РИД) в 1 % агаровом геле (Difco, USA) [12]. Лиофилизацию сывороток проводили в камере LZ-9с (Чехия). Для подтверждения воспроизводимости и достоверности результатов, полученных при исследовании, применяли методы вариационной статистики, изложенные в работе [8]. При оценке доверительного коэффициента исходили в каждом случае из степени числа свобод выбранной нами точности 95 %.

Результаты и обсуждение

Для получения гипериммунных сывороток применяли белковые антигенные комплексы из микробных биомасс, адъюванты и иммунокорректоры, обладающие разнообразным биологическим действием.

Попытки иммунизации кроликов по схеме, состоящей из последовательных многоточечных внутрикожных введений Аг с полным адъювантом Фрейнда, приводили к иммунному ответу лишь у 25–30 % иммунизируемых животных, при этом длительность иммунизации составляла 2,5–3 мес., а у кроликов развивалась адъювантная болезнь, которая выражалась в возникновении множественных опухолевидных образований на месте введения с последующими изъятиями.

В дальнейшем в качестве иммуномодулирующе-

го вещества мы применили феракрил (смесь железных (II, III) солей полиакриловой кислоты), который способен вызывать выраженное увеличение антиглобулирующих Т- и В-клеток [3]. Разработана схема иммунизации: грундиммунизация включала пять последовательных парентеральных введений смеси Аг с 3% водно-спиртовым раствором феракрила с интервалами в 3–7 дней. Через 30 сут после последней инъекции Аг у животных брали из краевой вены уха кровь и отделяли не менее 4 мл иммунной сыворотки, в которую добавляли Аг с целью получения комплекса Аг – Ат. Основной цикл иммунизации состоял из четырех внутривенных инъекций комплекса Аг – Ат через каждые 3–4 дня тому же животному, от которого была получена иммунная сыворотка. При такой схеме иммунизации получили кроличьи гипериммунные сыворотки с высокой специфической активностью в иммунологических реакциях. При этом иммуностимулирующий эффект при отсутствии токсического воздействия на животное, без возникновения адьювантной болезни, достигался у 95 % кроликов. Что же касается продолжительности цикла иммунизации, то она не всегда приемлема, поскольку конечные результаты достигались не ранее 49–54 дней [6].

С учетом накопленного опыта и теоретических предпосылок предложена и экспериментально обоснована новая схема иммунизации животных: антигенный материал пятикратно вводили внутривенно, одновременно внутримышечно в качестве иммуномодулятора инъецировали тималин, в третью инъекцию дополнительно вводили внутримышечно циклофосфан. Использование в качестве иммуномодулятора тималина способствовало значительному повышению титров специфических сывороточных Ат за счет увеличения числа антиглобулирующих клеток в результате стимуляции функции макрофагов и хелперных Т-клеток. Циклофосфан, являясь классическим иммуносупрессором, также активизировал макрофаги, стимулируя фагоцитарную, цитотоксическую и супрессивную (в отношении главным образом Т-лимфоцитов) функции [4]. Такая избирательность в действии иммуностимулятора, с одной стороны, и определенная селективность в действии иммуносупрессора, с другой, служили оптимальной комбинацией препаратов обеих групп и режимов их использования для активации одних механизмов иммунитета и выключения других. При данном способе продолжительность цикла иммунизации составляла 31–35 дней, расход антигенного материала – 7550 мкг на одного кролика. Титры специфических Ат в сыворотках животных при определении в РИД достигали показателей $1:15,4 \pm 1,25$ – $1:28,8 \pm 2,5$, а в НРИФ – не ниже $1:13926,4 \pm 1372,16$. Такие характеристики соответствовали требованиям оценки сырья для производства иммунобиологических препаратов [7].

Дальнейшее проведение исследований позволило предложить новую схему гипериммунизации кроликов с одним иммунокорректором – тимогеном,

при этом удалось значительно снизить антигенную нагрузку при иммунизации. Применение тимогена сопровождалось мобилизацией регуляторных и эффекторных механизмов адаптации организма к воздействию ксенобиотических факторов. Согласно концепции пептидного регуляторного каскада, после его экзогенного введения в организме происходило освобождение других пептидов, для которых исходный пептид служит индуктором. Биологическое действие тимогена реализовалось на уровне предшественников Т-клеток. Эффекты препарата на клеточном уровне включали в себя специфическое связывание с мембраной лимфоцитов, активацию систем вторичных посредников и регуляцию функционального состояния лимфоидных клеток через цАМР-зависимые протекиназы [9].

Схема иммунизации состояла из следующих манипуляций: кроликам вводили внутривенно каждые пять дней белковый антигенный комплекс в увеличивающихся дозах. В эти же сроки внутримышечно инъецировали по 10 мкг тимогена. На 7–10-й день после последнего введения иммуногена животных кровопускали. Активность гипериммунных сывороток, полученных по этой схеме, в РИД составляла $1:28,8 \pm 2,5$ – $1:53,3 \pm 5,01$, в НРИФ – $1:13926,4 \pm 1372,16$ – $1:24576 \pm 2744,32$.

Благодаря применению иммунокорректора тимогена, обладающему полифункциональным действием, значительно сокращены дозировки вводимого антигенного материала (с 7550 мкг до 450 мкг), иммунокорректора – в 500 раз, длительность процесса иммунизации с 35 до 22 дней, при этом повышен выход целевого продукта за счет увеличения антиглобулюрования у животных-продуцентов с одновременным уменьшением трудозатрат.

Обнадеживающие результаты получены при использовании иммунокорректора иммунофана – синтетического гексопептида ($C_{36}H_{61}O_{10}N_{12}$), способного резко увеличивать титры и длительность циркуляции специфических Ат. После пятикратного внутривенного введения Аг на фоне внутримышечных инъекций иммунофана удалось получить относительно сходные результаты практически у 100 % животных.

Для повышения специфичности полученных иммунных сывороток необходимо проведение сорбции антител, дающих перекрестные реакции с гетерологичными антигенами. Как показал наш собственный опыт, истощение сывороток микронными клетками, широко применяемое в сывороточном производстве, существенно понижает специфические титры антител, зачастую приводя к полной непригодности сырья. Использование твердофазных полиакриламидных сорбентов на основе водорастворимых антигенов из гетерологичных микроорганизмов приводит к повышению специфичности сывороток, при этом титры антител снижаются незначительно. Однако технология приготовления полиакриламидных сорбентов включает использование высокотоксичных импортных реактивов и трудоемка. Этих недостатков ли-

шен аффинный сорбент с магнитными свойствами на основе кремнезема – алюмосиликата, примененный нами. Наличие у иммуносорбента магнитных свойств дает возможность его сепарации с помощью постоянного магнита, исключая этап центрифугирования, что упрощает и ускоряет процесс сорбции, при этом сорбент можно регенерировать 3М раствором роданистого калия и многократно использовать [1, 2].

Таким образом, разработаны новые, эффективные подходы для получения чумных, бруцеллезных, сибиреязвенных, туляремийных, холерных, лептоспирозных, легионеллезных, кампилобактериозных гипериммунных сывороток, которые являются высококачественным биологическим сырьем для производства различных иммунобиологических препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афанасьев Е.Н., Ефременко В.И., Тюменцева И.С., Жарникова И.В., Жданова Е.В. Способ сорбции иммунной сыворотки крови. Патент на изобретение № 2200324 от 10.03.2003 г.
2. Жарникова И.В., Тюменцева И.С., Ефременко В.И., Афанасьев Е.Н., Бинатова В.В. Способ получения иммуносорбента (варианты). Патент на изобретение № 2138813 от 27.09.1999 г.
3. Кирдей Е.Г., Пинигина Н.М., Тюменцев С.Н. и др. Способ стимуляции антителообразования у животных. Авторское свидетельство № 1390836 от 1986 г.
4. Лазарева Д.Н., Алехин Е.К. Стимуляторы иммунитета. М.: Медицина; 1985. 255 с.
5. Приказ № 1179 от 10 октября 1983 г. Об утверждении нормативов затрат кормов для лабораторных животных в учреждениях здравоохранения. М.; 1983.
6. Тюменцев С.Н., Андреевская Н.М., Тюменцева И.С., Калиновский А.И., Ретина Л.П., Загоскина Т.Ю. Способ получения диагностической сыворотки. Патент на изобретение № 2010577 от 15.04.1994 г.
7. Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Ефременко В.И., Базиков И.А., Алиева Е.В. Способ получения диагностической сыворотки. Патент на изобретение № 2135210 от 27.08.1999 г.
8. Урбах В.Ю. Статистические методы в биологических и медицинских исследованиях. М.: Медицина; 1975. 296 с.
9. Хавинсон В.Х., Морозов В.Г. Тималин – иммуномодули-

рующий препарат из тимуса. В кн.: Тимус и его влияние на организм. Томск: Изд-во Томского университета; 1982. С. 201–3.

10. Hurn B.A.L., Chantler S.M. Production of reagent antibodies. *Methods in Enzymology*. 1980; 70(5):104–42.

11. Nossal G.J.V., Szenberg A., Ada G.L. et al. Single cell studies 19S antibody production. *J. Exp. Med.* 1964; 119(3):485–502.

12. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gel. *Ark. Kemi Min. Geol.* 1949; B26:1–9.

13. Warburg O., Christian W. Isolierung und Kristallisation des Garugsterments Enolase. *Biochem. Z.* 1941; 310:384–421.

14. Weller T.H., Coons A.H. Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 1954; 86:789–94.

E.N.Afanasiev, I.S.Tyumentseva, O.I.Kogotkova, L.V.Lyapustina,
I.V.Zharnikova, I.V.Savelyeva, D.A.Budyka

Development of New Approaches of Obtaining the Hyperimmune Sera for Production of Medical Immunobiological Preparations

Stavropol Research Anti-Plague Institute

Developed were the new immunization schedules of obtaining plague, brucellar, anthrax, tularemia, cholera, leptospirosis, legionellosis and campylobacteriosis hyperimmune sera based on optimal combinations of specific protein antigenic complexes with immunomodulators, providing high specific immune response in 100 % of animals, significant reduction of immunization terms, material and labor input. Immune sera obtained are high quality biological material to be used for production of different diagnostic immunobiological preparations.

Key words: antigen, antibody, immune sera, immunization schedules, immunomodulator.

Об авторах:

Афанасьев Е.Н., Тюменцева И.С., Коготкова О.И., Ляпустина Л.В., Жарникова И.В., Савельева И.В., Будыка Д.А. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru

Authors:

Afanasiev E.N., Tyumentseva I.S., Kogotkova O.I., Lyapustina L.V., Zharnikova I.V., Savelyeva I.V., Budyka D.A. Stavropol Anti-Plague Research Institute. 355035, Stavropol, Sovetskaya St., 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru

Поступила 20.04.09.

С.А.Еремин, Н.И.Микшис, О.А.Волох, О.М.Кудрявцева, И.А.Шепелев, А.Ю.Гончарова,
Ю.А.Попов, А.К.Никифоров

ИЗУЧЕНИЕ БИОКИНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ И ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО АСПОРОГЕННОГО ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ПРОТЕКТИВНОГО АНТИГЕНА СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Рекомбинантный штамм *Bacillus anthracis* 55ΔТПА-1Sp^{o-} при пассировании *in vitro* сохраняет свойство аспорогенности и способность к репликации гибридной плазмиды. Синтез иммуногенного белка генно-инженерным продуцентом не зависит от содержания в атмосфере CO₂. Определены условия культивирования аспорогенного штамма для увеличения продукции протективного антигена. Использование в технологическом процессе не образующего спор штамма *B. anthracis* позволит обеспечить безопасность и экологичность процедуры получения основного компонента химической сибиреязвенной вакцины.

Ключевые слова: культивирование, *Bacillus anthracis*, протективный антиген.

Анализ заболеваемости природно-очаговыми и зооантропонозными инфекциями в 2007 г. показал лишь незначительное уменьшение случаев сибирской язвы у людей по сравнению с предыдущим годом [3]. Возможность заражения человека возбудителем этого особо опасного инфекционного заболевания поддерживается существованием множественных почвенных очагов и периодически возникающими эпизоотиями. Кроме того, *B. anthracis* относится к категории А агентов биотерроризма [12].

Наиболее действенным способом профилактики сибирской язвы является вакцинация людей групп риска и сельскохозяйственных животных. Применяемые в России живые сибиреязвенные вакцины, несмотря на свою эффективность, обладают относительно высокой реактогенностью. Более безопасные химические вакцины состоят главным образом из протективного антигена (ПА), выделенного из аттенуированных штаммов *B. anthracis* [11, 14]. Входящий в состав сибиреязвенного экзотоксина ПА обладает ярко выраженными иммуногенными свойствами, однако две другие его составляющие – отечный и летальный факторы, участвуют в реализации патогенного действия микроорганизма [5, 15]. Существующая технология получения ПА из аттенуированных культур не позволяет добиться полного разделения компонентов токсина, ввиду близких значений их молекулярных масс. С помощью рекомбинантных технологий возможно создание продуцентов ПА, лишенных генов, детерминирующих синтез основных факторов патогенности возбудителя сибирской язвы. В то же время, с позиции биологической безопасности в производстве химических вакцин предпочтительнее использование бактериальных штаммов, не образующих спор.

В РосНИПЧИ «Микроб» сконструирован аспорогенный продуцент ПА сибиреязвенного микроба [2]. Генно-инженерный штамм содержит структурный ген *rag* в составе гибридного репликона pUB110PA-1 и продуцирует около 100 мкг/мл ПА, что в 4–5 раз

больше значений, определенных для *B. anthracis* СТИ-1 и *B. anthracis* 55. По биологическим характеристикам синтезируемый штаммом ПА претендует на роль основного компонента в усовершенствованной химической вакцине. Целью настоящего исследования было определение условий культивирования рекомбинантного продуцента ПА, обеспечивающих высокий выход белкового продукта.

Материалы и методы

В работе использован рекомбинантный штамм *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Sp^{o-}) (КМ97, патент РФ № 2321629) [Саp-(pXO2⁻), Тох-(pXO1⁻), Км^o(pUB110PA-1), Sp^{o-}].

Для выращивания использовали бульон Хоттингера, казеиновый бульон, L-бульон, S-бульон [4], содержащий (г/л): триптон – 33,0; дрожжевой экстракт – 20,0; L-гистидин – 2,0; NaCl – 7,4; Na₂HPO₄ – 8,0; KH₂PO₄ – 4,0 (рН 7,4). В готовую среду при необходимости добавляли: глюкозу – 2,0 г/л; канамицин – 25 мкг/мл.

Чистоту культуры *B. anthracis* контролировали бактериоскопически и бактериологически.

Оценку биокинетических показателей роста проводили с использованием морфометрических и биокинетических методов анализа. Физиологическое состояние популяции оценивали по следующим показателям:

1) выход биомассы (Σ)

$$\Sigma = V_{жф} \times X / V_{жф} + V_{тф},$$

где V_{жф} – объем жидкой фазы, V_{тф} – объем твердой фазы, X – концентрация биомассы.

2) удельная скорость роста клеток (μ)

$$\mu = 2,3 (\log X - \log X_0) / t - t_0,$$

где X₀ и X – начальная и конечная концентрации,

t_0 и t – начальный и конечный момент времени.

3) удельная скорость образования антигена (qp)

$$qp = P - P_0 / X(t - t_0),$$

где P_0 и P – начальная и конечная концентрации антигена, X – концентрация биомассы, t_0 и t – начальный и конечный момент времени.

Протеолитическую активность штамма *B. anthracis* исследовали на полусинтетической среде следующего состава (г/л): бакто-агар – 15,0; дрожжевой экстракт – 4,0; казеин (альбумин) – 2,0; трис-HCl – 1,21; K_2HPO_4 – 0,5; $MnSO_4 \cdot H_2O$ – 0,03; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,4; $CaCl_2$ – 0,08; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,005; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,005; $(NH_4)_2SO_4$ – 2,0 (pH 7,4). Изолированные колонии суточной агаровой культуры *B. anthracis* наносили на поверхность пластинки агара (не более 16 клонов на чашку), инкубировали при температуре 37 °C в течение 24 ч. На среде с казеином или альбумином вокруг колоний штамма с высокой активностью протеолитических ферментов на мутном фоне среды образовывались зоны просветления шириной до 10 мм. Через 48 ч инкубации на этой же среде регистрировали синтез желтого диффундирующего пигмента по возникновению вокруг посева желтой радиальной зоны на беловатом общем фоне.

Постановку реакции радиальной диффузионной преципитации осуществляли на казеиновой среде, содержащей кроличьи анти-ПА антитела, переносом уколом изолированных колоний штаммов. Посевы инкубировали в течение 16 ч при температуре 37 °C, а затем в течение 24 ч при комнатной температуре.

Наличие гибридной плазмиды в штамме *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo⁻) подтверждали данными электрофоретического разделения выделенной ДНК, а наличие клонированного гена *pag* – результатами ПЦР-анализа с олигонуклеотидными праймерами на основе нуклеотидных последовательностей, фланкирующих тандемные повторы ДНК в составе *pag*-гена плазмиды рХО1 *B. anthracis* (РосНИПЧИ «Микроб»). Реакцию проводили с препаратами плазмидных ДНК (концентрация ДНК – 100 нг/мкл), выделенных из рекомбинантных бациллярных штаммов, а также из контрольного штамма *B. anthracis* СТИ-1.

Экспрессию гена *pag* исследовали с помощью комплекса биохимических и иммунохимических методов. Концентрацию белка определяли по методу Лоури [9] с применением набора реактивов «Bio-Rad DC Protein Assay» (США). Чистоту препаратов ПА контролировали в SDS-PAGE электрофорезе по U.K.Laemmli, а иммуноспецифичность – в иммуноблоте по методу H.Towbin [8, 13]. В иммунохимических реакциях использовали кроличьи поликлональные антитела к ПА. Для определения продукции ПА использовали непрямой твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА). В каждом ряду 96-луночного планшета титровали культуральные фильтраты, в последнем ряду – очищенный белок, начиная от уста-

новленной концентрации. Меченные пероксидазой видоспецифические антитела (Sigma, США) использовали в рабочем разведении 1:20000. Хромогенными субстратами служили ортофенилдиамин или ABTS (Sigma, США). Учет результатов проводили при длине волны 492 или 405 нм соответственно.

Результаты и обсуждение

В качестве продуцента протективного антигена сибиреязвенного микроба использовали аспорогенный рекомбинантный штамм *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo⁻). Данный штамм, сочетающий высокую продукцию протективного антигена с низкой активностью протеолитических ферментов, получен в результате генетической передачи гибридной плазмиды рUB110PA-1 со встроенным геном *pag* [2] в аспорогенный и протеазодефицитный реципиентный штамм *B. anthracis* 55ΔТ [1].

В течение более 30-суточных пассажей штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo⁻) на питательных средах с добавлением селективного антибиотика случаев элиминации плазмиды рUB110PA-1 не отмечено. Элиминации плазмиды рUB110PA-1 не происходило и при условии непродолжительного выращивания штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo⁻) в жидкой питательной среде без селективного антибиотика. Однако продление времени культивирования рекомбинантного аспорогенного продуцента ПА в отсутствие канамицина более 3 сут, а также увеличение количества суточных пассажей (более 3), приводило к резкому нарастанию темпов утраты гибридного репликаона. Аспорогенность культур подтверждали через каждые 5–7 пересевов. На промежуточных этапах и по окончании всех схем пассирования реверсии к спорообразующему фенотипу не происходило. Кроме того, тестировали протеолитическую активность штамма. При исследовании на среде с казеином у всех тестируемых клонов отсутствовали зоны деградации белкового субстрата вокруг посевов.

По данным белкового электрофореза и иммуноблота, продукция ПА у аспорогенного рекомбинантного штамма была выше, чем у контрольного вакцинного штамма *B. anthracis* 55. Результаты реакции преципитации на среде с анти-ПА антителами подтвердили преимущество *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo⁻) в способности к синтезу ПА. Зоны радиальной диффузии антигена вокруг посевов клонов аспорогенного рекомбинанта достигали 10 мм, в то время как у вакцинного штамма *B. anthracis* 55 они были не более 2 мм. С использованием ТИФА осуществили количественную оценку уровня продукции ПА рекомбинантным штаммом – около 100 мкг/мл. Продукция ПА вакцинными штаммами *B. anthracis* СТИ-1 и *B. anthracis* 55 составила 15 и 20 мкг/мл соответственно.

Технология выделения ПА из аттенуированных штаммов *B. anthracis* предполагает выращивание бактериальных культур в атмосфере с повышенным

содержанием CO₂. В нашем случае моделирование указанных выше условий секреции ПА оказалось излишним. Продукция ПА рекомбинантным штаммом с pUB110PA-1 весьма эффективно происходила и в обычной атмосфере. Сконструированный штамм с клонированным геном *pag* выгодно отличается от аттенуированных продуцентов, ввиду отсутствия у него области, детерминирующей синтез CO₂-зависимого транскрипционного регулятора – AtxA. В штаммах сибирезвеного микроба область AtxA локализована в составе высокомолекулярного репликона pXO1. Как известно, экспрессия гена *pag* в составе pXO1, находится под строгим контролем CO₂-зависимого транскрипционного регулятора – AtxA [7]. Повышение содержания CO₂ является пусковым моментом для осуществления координированной регуляции синтеза ПА, ОФ, ЛФ, капсулы, белков S-слоя и, возможно, других факторов [6, 7, 10]. В штамме с клонированным геном *pag* область AtxA отсутствует, что объясняет CO₂-независимый синтез ПА.

Для определения возможного влияния состава среды на секрецию ПА, культуру штамма *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo⁻) выращивали на средах, различающихся по содержанию питательных ингредиентов (в порядке убывания): S-бульоне, L-бульоне, бульоне Хоттингера с добавлением триптона (20 мг/мл), бульоне Хоттингера, казеиновой среде. Одинаковое количество микробной взвеси *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo⁻) заседали во флаконы с равным объемом перечисленных сред, добавляли канамицин в селективной концентрации и выращивали в течение 18 ч при температуре 37 °С с аэрацией. Протеины, секретиромые в среду культивирования, осаждали сульфатом аммония и разводили равными объемами буфера для электрофореза. После электрофоретического разделения протеинов сравнивали продукцию белка с молекулярной массой 83 кДа. Иммунореактивность

и специфичность данного белка подтверждали результатами реакции иммуноблота, дот-анализа, ТИФА с антителами к ПА. Во всех случаях отмечали образование окрашенных иммунных комплексов. Двукратная иммунизация кроликов дозой 50 мкг ПА приводила к формированию адаптивного иммунитета с высокими значениями титров анти-ПА антител – 1:8000 и 1:16000 (по результатам ТИФА). В случаях иммунизации культурой *B. anthracis* СТИ-1 титры составляли 1:1000 – 1:2000.

Наилучшие условия для роста и секреции ПА обеспечивал S-бульон. При выращивании на казеиновой среде продукция ПА была минимальной. Бульон Хоттингера и казеиновая среда могут быть использованы в технологии получения ПА только после добавления в них триптона.

На следующем этапе тестировали влияние продолжительности выращивания в жидких питательных средах разного состава на секрецию ПА. Уровень продукции ПА и рост биомассы сравнивали в поздней логарифмической или в ранней стационарной фазе роста (через 16, 18 и 24 ч культивирования). Использовали следующие среды: S-бульон, казеиновый бульон (140 мг% амминного азота), бульон Хоттингера (200 мг% аминного азота), а также последние две среды с добавлением триптона (20 мг/мл). Триптон (Difco) вводили в состав среды или непосредственно перед высевом культуры штамма-продуцента, или через 4 (16) часов роста в объемном соотношении 1/10 (2 мл штокового раствора на 20 мл бульона). Культивирование проводили при температуре 37 °С в колбах (250 мл) на термостатируемой качалке RC-ТК (США) с аэрацией (130 об/мин). Объем среды во всех случаях составлял 20 мл. Для создания селективных условий в среды вносили канамицин (25 мкг/мл). Посевной материал готовили из 18-часовой агаровой (LB-агар) культуры *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo⁻) 4-й

Сравнительный анализ выхода биомассы и продукции ПА штаммом *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo⁻) на различных средах

Среда	Концентрация, через					
	16 ч		18 ч		24 ч	
	культуры в процессе роста, млрд м.к./мл	ПА, мг/мл	культуры в процессе роста, млрд м.к./мл	ПА, мг/мл	культуры в процессе роста, млрд м.к./мл	ПА, мг/мл
S-бульон	15	5,0	15	4,48	20	2,0
Казеиновый бульон с добавлением триптона перед началом выращивания	20	18,0	22	2,60	20	1,0
Бульон Хоттингера с добавлением триптона перед началом выращивания	20	21,0	20	4,80	25	1,20
Казеиновый бульон с добавлением триптона через 4 ч от начала выращивания	18	0,80	20	0,60	18	0,24
Бульон Хоттингера с добавлением триптона через 4 ч от начала выращивания	20	0,64	20	0,60	28	0,32
Казеиновый бульон с добавлением триптона через 16 ч от начала выращивания	15	0,24	12	0,12	23	0,06
Бульон Хоттингера с добавлением триптона через 16 ч от начала выращивания	17	0,96	18	0,64	27	0,12

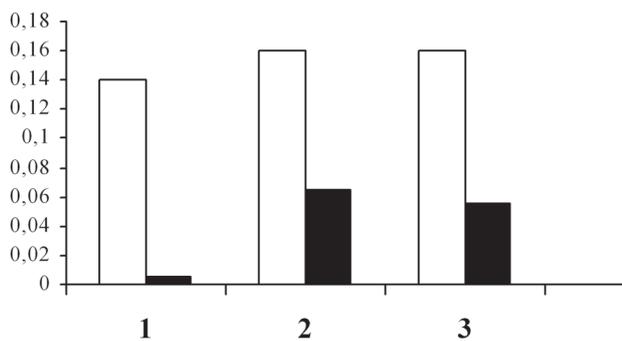


Рис. 1. Зависимость удельной скорости роста (μ) штамма-продуцента *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo⁻) и скорости образования ПА (qp) от среды культивирования на 16 ч от начала выращивания:

1 – S-бульон, 2 – бульон Хоттингера с добавлением триптона перед началом культивирования, 3 – казеиновый бульон с добавлением триптона перед началом культивирования.

□ – удельная скорость роста штамма; ■ – удельная скорость образования ПА

генерации. Инокулят добавляли в объеме 0,5 мл до конечной концентрации в питательной среде – $1,5 \cdot 10^9$ м.к./мл. Концентрацию ПА в культуральных фильтратах рассчитывали с помощью ТИФА. Ростовые качества среды оценивались по концентрации микробных клеток, определяемой по стандарту мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича.

Накопление биомассы наиболее интенсивно происходило на средах с высоким содержанием триптона, постепенно достигая максимума к 24 ч инкубации (таблица).

Содержание ПА в культуральных фильтратах зависело от наличия триптона в составе питательных сред, времени его внесения, продолжительности выращивания. В условиях культивирования на богатых питательных средах способность к синтезу ПА рекомбинантного аспорогенного штамма возрастала во много раз (рис. 1).

По результатам эксперимента к 16 ч от начала культивирования концентрация ПА оказалась самой низкой в культуральном фильтрате штамма

B. anthracis 55ΔТПА-1(Spo⁻), выращенного на казеиновой среде. Несколько более высокие показатели отмечались при культивировании на бульоне Хоттингера без добавления триптона и с добавлением триптона через 4 ч от начала выращивания. Концентрация ПА в условиях роста аспорогенного рекомбинантного продуцента в S-бульоне ожидаемо была выше в несколько раз. Самые высокие значения уровня продукции ПА зарегистрированы при росте *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo⁻) в бульоне Хоттингера или казеиновой среде с добавлением триптона перед началом выращивания.

На всех средах максимальные концентрации ПА отмечались к 16 ч (рис. 2). В дальнейшем происходило постепенное снижение содержания ПА в культуральных фильтратах. Минимальные значения оказались через 24 ч выращивания. Особенно четко данная тенденция прослеживалась при использовании бульона Хоттингера или казеиновой среды с добавлением триптона. Вероятно, после 16 ч культивирования синтезируемый ПА начинает постепенно разрушаться под действием активизирующихся протеолитических ферментов штамма-продуцента.

Таким образом, установлено, что продукция ПА рекомбинантным штаммом *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo⁻) не зависит от содержания CO₂ в атмосфере. Для лучшей секреции ПА предпочтительнее выращивание культуры генно-инженерного продуцента на среде с высоким содержанием триптона и дрожжевого экстракта. В качестве альтернативы S-бульону возможно использование бульона Хоттингера или казеиновой среды с добавлением триптона в высокой концентрации. Во избежание возможной протеолитической деградации ПА продолжительность роста культуры штамма-продуцента не должна превышать 16 ч.

Работа выполнена по Государственному контракту № 124-Д от 11.06.2009 г. в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

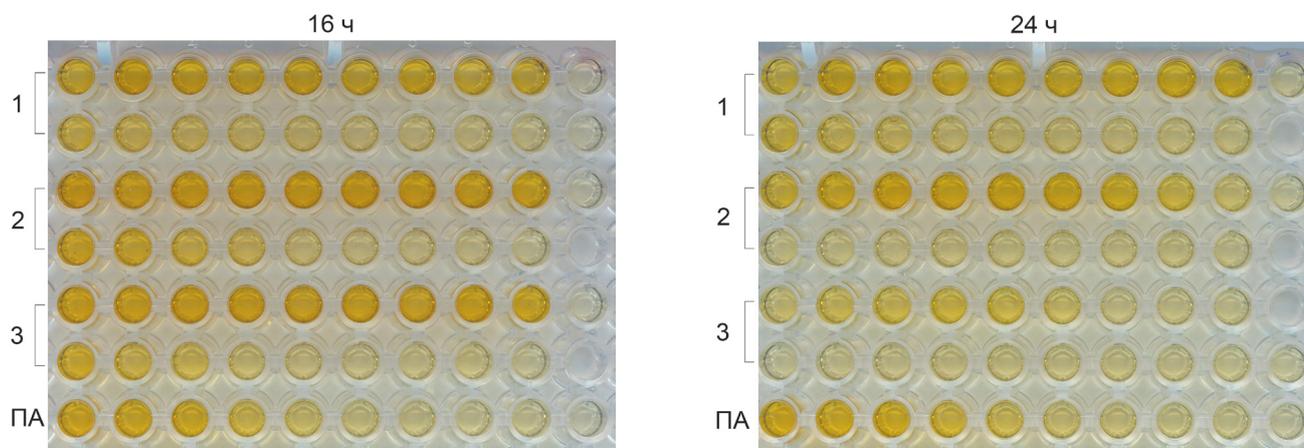


Рис. 2. Результаты ТИФА с антителами к ПА. Цифрами обозначены разведения культуральных фильтратов аспорогенного продуцента *B. anthracis* 55ΔТПА-1(Spo⁻), выращенного на:

1 – S-бульоне, 2 – бульоне Хоттингера с добавлением триптона, 3 – казеиновом бульоне с добавлением триптона. В последних рядах 2-кратные разведения очищенного препарата ПА, начиная с концентрации 320 мкг/мл

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Микуш Н.И., Болотникова М.Ф., Новикова Л.В. и др. Получение аспорогенных штаммов *Bacillus anthracis*. Биотехнология. 2003; 1:3–11.
2. Микуш Н.И., Кудрявцева О.М., Болотникова М.Ф. и др. Иммуногенность рекомбинантных бациллярных штаммов с клонированным геном синтеза протективного антигена *Bacillus anthracis*. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2007; 3:15–21.
3. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2007 году: Государственный доклад. М., Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2008.
4. Farchaus J., Ribot W., Downs M., Ezzell J. Purification and characterization of the major surface array protein from the avirulent *Bacillus anthracis* delta Sterne-1. J. Bacteriol. 1995; 177(9):2481–9.
5. Gladstone G. Immunity of anthrax: protective antigen present in cell-free culture filtrates. Brit. J. Exp. Pathol. 1946; 27:393–410.
6. Hoffmaster A., Koehler T. The anthrax toxin activator gene *atxA* is associated with CO₂-enhanced non-toxin gene expression in *Bacillus anthracis*. Infect. Immun. 1997; 65:3091–9.
7. Koehler T., Dai Z., Kaufman-Yarbray M. Regulation of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene: CO₂ and a trans-acting element activate transcription from one of two promoters. J. Bacteriol. 1994; 176:586–95.
8. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227:680–5.
9. Lowry O., Risebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951; 193:265.
10. Mignot T., Mock M., Fouet A. A plasmid encoded regulator couples the synthesis of toxins and surface structures in *Bacillus anthracis*. Mol. Microbiol. 2003; 47:917–27.
11. Pittman P., Kim-Ahn G., Pifat D. et al. Anthrax vaccine: safety and immunogenicity of a dose-reduction, route comparison study in humans. Vaccine. 2002; 20:1412–20.
12. Spencer R., Wilcox M. Agents of biological warfare. Rev. Med. Microbiol. 1993; 4:138–43.
13. Towbin H., Stachelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979; 76:4350–4.
14. Turnbull P. Anthrax vaccines: past, present and future.

Vaccine. 1991; 9:533–9.

15. Wright G., Green T., Kanode R. Studies on immunity in anthrax. Immunizing activity of alumprecipitated protective antigen. J. Immunol. 1954; 73(6):387–91.

S.A.Eremin, N.I.Mikshis, O.A.Volokh, O.M.Kudryavtseva, I.A.Shepelev, A.Yu.Goncharova, Yu.A.Popov, A.K.Nikiforov

Study of Biokinetic Properties and Optimization of the Conditions of Propagation of Recombinant Asporogenic Strain Producing Anthrax Agent Protective Antigen

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov

Recombinant *Bacillus anthracis* strain 55Δ TPIA-1Sp^o passed *in vitro* preserved its asporogenic property and ability to replicate recombinant plasmid. Synthesis of immunogenic protein by genetically engineered producer did not depend on CO₂ content in the atmosphere. Determined were the conditions of propagation of asporogenic strain to increase the production of protective antigen. Using *Bacillus anthracis* asporogenic strain in technological process will provide the safe and ecological procedure of obtaining the major component of chemical anthrax vaccine.

Key words: propagation, *Bacillus anthracis*, protective antigen.

Об авторах:

Еремин С.А., Микуш Н.И., Волох О.А., Кудрявцева О.М., Шепелев И.А., Гончарова А.Ю., Попов Ю.А., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Eremin S.A., Mikshis N.I., Volokh O.A., Kudryavtseva O.M., Shepelev I.A., Goncharova A.Yu., Popov Yu.A., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 01.10.09.

Г.А.Афанасьева, Н.П.Чеснокова, Н.Б.Захарова

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ УРОВНЯ IL-1A В КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧУМНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

ГОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет»

Проведена сравнительная оценка изменений содержания в сыворотке крови IL-1 α и уровня молекул средней массы в условиях воздействия возрастающих доз липополисахарида (ЛПС) (от ЛД₂₅ до 2ЛД₅₀) *Yersinia pestis*. ЛПС *Y. pestis* выступает в роли индуктора образования IL-1 α клетками-продуцентами данного цитокина с последующей реализацией его локальных и системных полимодальных эффектов. В динамике чумной интоксикации, индуцируемой введением возрастающих доз ЛПС *Y. pestis*, имело место стабильно высокое содержание в крови IL-1 α , даже в условиях эндотоксического шока.

Ключевые слова: *Y. pestis*, эндотоксин, интерлейкин-1 α .

Роль факторов патогенности *Yersinia pestis* в формировании инфекционного процесса и, соответственно, в развитии полиморфизма клинических проявлений чумной инфекции интенсивно исследуется на протяжении многих лет на молекулярно-клеточном, тканевом, органном и системном уровнях [2, 3, 4].

Как известно, ведущая роль в патогенезе чумы принадлежит эндотоксину *Y. pestis*, высокоактивным компонентом которого является липополисахарид (ЛПС) [2, 3, 5, 6].

В результате рецепции ЛПС клетками-мишенями (полиморфно-ядерными лейкоцитами, моноцитами, макрофагами, клетками эндотелия и другими) происходит активация ряда клеточных функций, обеспечивающих фагоцитоз, презентацию антигенов на мембране моноцитарно-макрофагальных клеточных элементов, усиление продукции NO, активных форм кислорода, ряда низкомолекулярных и других медиаторов воспаления, в частности, группы провоспалительных цитокинов: IL-1, IL-2, IL-6, IL-18, TNF и т.д. [6, 7, 8].

До настоящего момента остаются в значительной степени не изученными характер и механизмы изменений цитокинового статуса при бактериальном эндотоксикозе, свойственном чумной инфекции и интоксикации, в частности, не подтверждена способность эндотоксина чумного микроба к дозозависимой индукции изменения уровня IL-1.

Целью данной работы явилась сравнительная оценка изменений содержания в сыворотке крови IL-1 α и молекул средней массы в крови белых мышей при введении возрастающих доз ЛПС *Y. pestis*.

ЛПС эндотоксина чумного микроба вводили беспородным белым мышам обоего пола массой 18–20 г внутрибрюшинно в дозах, эквивалентных ЛД₂₅, ЛД₅₀ и 2ЛД₅₀. ЛПС получен из ФГУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.

Концентрацию IL-1 α определяли в сыворотке крови с использованием тест-систем для иммуно-

ферментного анализа (ООО «Цитокин», Санкт-Петербург).

Тяжесть аутоинтоксикации оценивали по уровню молекул средней массы (МСМ) сыворотки крови экспериментальных животных общепринятым спектрофотометрическим методом [1].

Результаты проведенных экспериментов показали, что через 4 ч после введения ЛПС белым мышам, то есть в период выраженных клинических проявлений интоксикации (адинамия, лихорадка, одышка, цианоз, летальные исходы у части животных), происходило увеличение концентрации IL-1 α ($p < 0,001$). Одновременно имело место нарастание уровня МСМ в сыворотке крови мышей ($p < 0,001$), что свидетельствовало о развитии аутоинтоксикации. В данной модификации ЛПС-интоксикации выявлена положительная корреляционная взаимосвязь между увеличением содержания в крови МСМ ($p < 0,001$) и уровнем IL-1 α , который оставался стабильно высоким.

Анализ полученных результатов позволяет высказать предположение, что ЛПС *Y. pestis* является одним из индукторов образования IL-1 α клетками-продуцентами с последующей реализацией его локальных и системных полимодальных эффектов. Этот вывод аргументируется и результатами последующей серии экспериментальных исследований.

Так, при использовании эндотоксина в большей дозе (ЛД₅₀) в аналогичные сроки наблюдения, характеризующиеся дозозависимым утяжелением клинической картины и гибелью части экспериментальных животных, уровень IL-1 α значительно превышал показатели контроля ($p < 0,001$), как и в серии экспериментов с использованием ЛПС в дозе, эквивалентной ЛД₂₅.

Увеличение дозы ЛПС *Y. pestis* до 2ЛД₅₀ вызывающее формирование эндотоксического шока и массовую гибель животных, характеризовалось значительным увеличением тяжести интоксикации и сопровождалось прогрессирующим накоплением

МСМ в сыворотке крови выживших белых мышей ($p < 0,001$). В то же время содержание в сыворотке крови IL-1 α оставалось стабильно высоким по сравнению с таковыми показателями контрольной серии ($p < 0,001$), как и в экспериментах с использованием доз ЛПС, эквивалентных LD₂₅ и LD₅₀.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов с моделированием ЛПС-интоксикации в диапазоне доз от LD₂₅ до 2LD₅₀ указывают на отсутствие дозозависимых эффектов возрастания уровня IL-1 α в крови под воздействием ЛПС *Y. pestis* и корреляции их со степенью выраженности аутоинтоксикации, поскольку однотипное увеличение содержания IL-1 α отмечено в различных вариантах моделирования ЛПС-интоксикации с использованием возрастающих доз эндотоксина.

Касаясь значимости выявленного нами феномена, следует отметить, что IL-1 – это полипептидный провоспалительный цитокин, выполняющий регуляторные и эффекторные функции в иммунном ответе, участвующий в процессах взаимодействия иммунной и нейроэндокринной систем. IL-1 выступает в роли индуктора активации Т- и В-лимфоцитов, процессов клеточной пролиферации, экспрессии на эндотелиальных клетках молекул адгезии, активирует процессы эмиграции гранулоцитов, моноцитов, усиливает их фагоцитарную функцию, продукцию ими супероксидных и нитрооксидных радикалов и других цитокинов (IL-2, IL-4, IL-6, γ -интерферона, колоние-стимулирующих факторов). Нейротропные эффекты IL-1 включают в себя индукцию лихорадки, анальгетическое действие, а также активацию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [5, 8].

Таким образом, обнаруженная нами закономерность возрастания уровня IL-1 α в крови при чумной ЛПС-интоксикации различной степени тяжести, безусловно, свидетельствует об адаптивной роли высоких концентраций указанного цитокина, обеспечивающих активацию иммуногенеза.

Следует отметить и другой механизм адаптации, который реализуется под влиянием IL-1 α . Как известно, IL-1 α преодолевая гематоэнцефалический барьер, стимулирует продукцию кортикотропин-рилизинг гормона и глюкокортикоидов, то есть опосредует развертывание острой фазы биологического стресса в условиях чумной инфекции и интоксикации [5, 8]. Таким образом, механизмы адаптации, обеспечиваемые IL-1 α , остаются стабильными даже при прогрессировании тяжести клинических проявлений эндотоксикоза вплоть до развития эндотоксического шока.

Однако объективная оценка значения избыточной продукции IL-1 α может быть сформулирована лишь при исследовании нарушения динамического взаимодействия про- и противовоспалительных цитокинов в динамике чумной интоксикации.

Таким образом, липополисахарид (ЛПС) *Y. pestis* выступает в роли индуктора образования IL-1 α клетками-продуцентами данного цитокина с последующей реализацией его локальных и системных полимодальных эффектов; в динамике чумной интоксикации, индуцируемой введением возрастающих доз ЛПС *Y. pestis*, имеет место стабильно высокое содержание в крови IL-1 α ; механизмы адаптации, формирующиеся на фоне высоких концентраций IL-1 α в крови экспериментальных животных при чумной ЛПС-интоксикации различной степени тяжести клинических проявлений интоксикации, довольно стабильны, поскольку уровень указанного цитокина не снижается, даже при развитии эндотоксического шока.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гудим В.И., Габриэлян Н.И. Средние молекулы как уремические токсины (состояние вопроса). Лаб. дело. 1985; 13:145.
2. Дальвадяц С.М., Белобородов Р.А. Изучение токсических свойств антигена, изолированного из чумного микроба по методу Вестфал-Людеритца. Пробл. особо опасных инф. 1969; 2(6):138–42.
3. Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Молекулярные аспекты изучения возбудителей особо опасных инфекций. Пробл. особо опасных инф. 2003; 86:54–68.
4. Кутырев В.В., Смирнова Н.И. Генодиагностика и молекулярное типирование возбудителей чумы, холеры и сибирской язвы (обзор). Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2003; 1:6–14.
5. Чеснокова Н.П., редактор. Инфекционный процесс. М.: Академия естествознания, 2006. С. 37–56.
6. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Афанасьева Г.А. Интегративные показатели реактогенности липополисахарида, полученного из вакцинного штамма *Yersinia pestis*. Мед. академический журн. 2003; 3(3, приложение 4):86–7.
7. Neumann D. CD14 and LPB in endotoxemia and infections caused by Gram-negative bacteria. J. Endotox. Res. 2001; 7(6):439–41.
8. Ulmer A.J., Flad H., Rietschel T. et al. Induction of proliferation and cytokine production in human T lymphocytes by lipopolysaccharide (LPS). Toxicology. 2000; 152(1–3):37–45.

G.A.Afanasieva, N.P.Chesnokova, N.B.Zakharova

Patterns of the Alterations of IL-1 α Blood Level in Experimental Plague Intoxication

State Medical University, Saratov

Carried out was comparative evaluation of the alterations of IL-1 α content in the blood serum and the level of the medium mass molecules under the conditions of treating with the *Yersinia pestis* lipopolysaccharide (LPS) in increasing doses (from LD₂₅ up to 2LD₅₀). *Y. pestis* LPS was shown to induce IL-1 α generation by its cell-producers with subsequent realization of this cytokine local and systematic polymodal effects. While plague intoxication induced by *Y. pestis* LPS increasing doses administration progressed, IL-1 α content remained stably high, even in endotoxin-caused shock.

Key words: *Y. pestis*, endotoxin, interleukin-1 α .

Об авторах:

Афанасьева Г.А., Чеснокова Н.П., Захарова Н.Б. Саратовский государственный медицинский университет. 410012, Саратов, ул. Б. Казачья, 112. E-mail: gafanaseva@yandex.ru

Authors:

Afanasieva G.A., Chesnokova N.P., Zakharova N.B. Saratov State Medical University. 410012, Saratov, B. Kazach'a St., 112. E-mail: gafanaseva@yandex.ru

Поступила 15.06.09.

**ПАМЯТИ АЛЕКСАНДРА СЕМЕНОВИЧА МАРАМОВИЧА
(1937–2009)**

22 декабря 2009 г. скончался Александр Семенович Марамович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом эпидемиологии Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока. Ушел из жизни известный ученый-эпидемиолог, видный деятель противочумной системы нашей страны, автор многих фундаментальных научных трудов, внесший значительный вклад в развитие эпидемиологической науки и обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия территории Сибири и Дальнего Востока.



А.С.Марамович обосновал принципиально важные положения по актуальным и дискуссионным вопросам современной эпидемиологии: возможность сапрофитической фазы существования патогенных микроорганизмов, роль экологических и эпидемиологических взаимосвязей в формировании эндемичных очагов, закономерности

эндемичности и эпидемичности чумы и холеры. Он неоднократно участвовал в ликвидации эпидемических вспышек опасных инфекционных болезней на территории Российской Федерации, работал в качестве консультанта ВОЗ в Монголии.

Научно-общественная деятельность Александра Семеновича Марамовича была многогранной. Он был членом редколлегий и редакционных советов ряда известных журналов, возглавлял Иркутское отделение Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, входил в состав Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации, двух диссертационных советов.

В памяти коллег Александр Семенович навсегда останется талантливым ученым, мудрым педагогом, добрым товарищем и прекрасным человеком.

ПРАЙС-ЛИСТ
медицинских иммунологических препаратов, производимых ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» на 2010 г.
Тел./факс (8452)51-49-81, 27-86-78, 51-52-12, 51-69-65. E-mail: microbe@san.ru

№ п.п.	Наименование препарата	Ед. изм.	Цена без НДС (руб)
Препараты для диагностики чумы			
1.	Сыворотка диагностическая чумная антифаговая сухая	1 мл N 10	484,20*
2.	Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие чумные сухие	1 мл N 10	1074,00*
3.	Иммуноглобулины диагностические агглютинирующие чумные сухие	1 мл N 10	925,50*
4.	Бактериофаг диагностический чумной Л-413С сухой	1 мл N 10	447,00*
5.	Бактериофаг диагностический чумной Покровской сухой	1 мл N 10	447,00*
6.	Бактериофаг диагностический псевдотуберкулезный сухой	1 мл N 10	447,00*
7.	Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие псевдотуберкулезные сухие	1 мл N 10	1074,00*
8.	Иммуноглобулины диагностические агглютинирующие псевдотуберкулезные сухие	1 мл N 10	925,50**
Препараты для диагностики холеры			
9.	Сыворотка диагностическая холерная О1 адсорбированная сухая	1 мл N 10	843,00*
10.	Сыворотка диагностическая холерная ОГАВА адсорбированная сухая	1 мл N 10	843,00*
11.	Сыворотка диагностическая холерная ИНАБА адсорбированная сухая	1 мл N 10	843,00*
12.	Сыворотка диагностическая холерная ОО адсорбированная сухая	1 мл N 10	843,00*
13.	Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие холерные сухие	1 мл N 10	1074,00*
14.	Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие холерные кроличьи О139 сухие	1 мл N 10	960,00**
15.	Бактериофаги диагностические холерные ХДФ-3,4,5 сухие	набор 1 мл N 9	464,40*
16.	Бактериофаги диагностические холерные ТЭПВ(1-7) жидкие	набор 2 мл N 7	693,00*
17.	Фаг дифференциально-диагностический ДДФ сухой	1 мл N 10	504,00*
18.	Сыворотка диагностическая холерная О139 адсорбированная кроличья сухая	1 мл N 10	490,50*
19.	Бактериофаги диагностические холерные классический и эльтор сухие	набор 1 мл N 10	510,00*
20.	Бактериофаги диагностические холерные эльтор сtх ⁺ , сtх ⁻ жидкие	2 мл N 10	984,00*
Препараты для профилактики холеры			
21.	Вакцина холерная бивалентная химическая таблетированная	1 ч/д	57,00*
Лечебные препараты общеклинического назначения			
22.	Иммуноглобулин антирабический из сыворотки крови лошади жидкий – 5 ампул по 5 мл + иммуноглобулин разведенный 1:100 – 5 ампул по 1 мл	1 компл. 1 литр	2160,00* 86400,00*
Кровь			
23.	Кровь гемолизированная	5 мл N 10	375,00*
24.	Эритроциты барана	1 л	4500,00**
25.	Сыворотка нормальная лошадиная	флак. 100 мл	720,00**
Препараты для контроля стерилизации			
26.	Индикаторы биологические в комплекте с питательной средой	шт. 5 мл амп.	24,30* 6,00*
Генодиагностические препараты			
27.	Тест-система для выявления ДНК чумы методом ПЦР «ГенПест» (на 100 определений)	компл.	4680,00*
28.	Тест-система для выявления ДНК холеры методом ПЦР «Ген Хол» (на 100 определений)	компл.	4680,00*
29.	Тест-система для выявления ДНК сибирской язвы методом ПЦР «Ген Сиб» (на 50 определений)	компл.	4680,00*
30.	Тест-система для выявления ДНК бруцеллеза методом ПЦР «Ген Бру» (на 50 определений)	компл.	4680,00*
31.	Тест-система для выявления ДНК туляремии методом ПЦР «Ген Тул» (на 100 определений) для лабораторных исследований	компл.	4680,00**
32.	Набор для выделения ДНК	набор	2415,00**
33.	Набор для электрофореза (на 200 определений)	набор	540,00**

* НДС по ставке 10 %; ** НДС по ставке 18 %