

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

Выпуск 105

3 · 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 *Т.А.Докалина*

Технический редактор
Т.К.Меркулова

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

Подписано в печать 12.08.12

Формат 60×88 1/8

Бумага мелованная

Печать офсетная

Усл. печ. л. 9,5

Гарнитура Таймс

Заказ

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. 105. 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),
С.В.Балахонов, докт. мед. наук, профессор (Иркутск),
И.В.Борисевич, докт. мед. наук, профессор (Москва),
А.Л.Гинцбург, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва),
И.А.Дятлов, докт. мед. наук, профессор (Оболensk),
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)

*Журнал включен в Реферативный журнал и Базы данных ВИНТИ.
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., Пакскина Н.Д., Топорков В.П., Топорков А.В., Шиянова А.Е., Кутырев В.В. Научно-методические основы реализации Международных медико-санитарных правил (2005 г.) на территории Российской Федерации

5

Обзоры

Заднова С.П., Смирнова Н.И. Роль внеклеточного экзополисахарида в адаптации возбудителя холеры во внешней среде.

13

Попов Ю.А., Микшис Н.И. Генетические (ДНК) вакцины

20

Эпидемиология

Куклев Е.В., Пичугина Л.М., Кологоров А.И., Данилов А.Н., Кожанова О.И. Эпидемиологические особенности острого гепатита В в Саратовской области в современных условиях

25

Лопатин А.А., Сафронов В.А., Раздорский А.С., Куклев Е.В. Современное состояние проблемы математического моделирования и прогнозирования эпидемического процесса

28

Лямкин Г.И., Тихенко Н.И., Манин Е.А., Вилинская С.В., Головнева С.И., Русанова Д.В. Эпизоотолого-эпидемиологическая обстановка по бруцеллезу в Южном федеральном округе Российской Федерации в 2006–2009 гг.

31

Сафронов В.А., Раздорский А.С., Скаленко С.Ю., Лопатин А.А., Ковтунов А.И., Пискунова Н.В., Кологоров А.И., Куклев Е.В., Топорков В.П. Географическая информационная система для эпидемиологического надзора за природно-очаговыми инфекционными болезнями в сочетанных очагах на территории Астраханской области

35

Устун Н.М. Современные особенности эпидемиологии кампилобактериоза в Азербайджане

39

Микробиология, иммунология, диагностика

Барков А.М., Баркова И.А., Алексеев В.В., Липницкий А.В., Кулаков М.Я. Обнаружение антител к протективному антигену *Bacillus anthracis* с использованием реакции непрямой гемагглютинации и твердофазного иммуноферментного метода

42

Гончарова А.Ю., Микшис Н.И., Кудрявцева О.М., Болотникова М.Ф., Новикова Л.В., Красичков Г.Г., Аленкина Т.В., Попов Ю.А. Получение поликлональных антител к белкам S-слоя *B. anthracis* и изучение их специфичности в иммуноферментном анализе

46

CONTENTS

Onischenko G.G., Pakschina N.D., Toporkov V.P., Toporkov A.V., Shiyanova A.E., Kutyrev V.V. Methodological Principles of Implementation of International Health Regulations (2005) in the Territory of the Russian Federation

Review

Zadnova S.P., Smirnova N.I. The Role of Extracellular Exopolysaccharide in Cholera Agent Adaptation in the Environment

Popov Yu.A., Mikshis N.I. Genetic (DNA) Vaccines

Epidemiology

Kouklev E.V., Pichugina L.M., Kologorov A.I., Danilov A.N., Kozhanova O.I. The Epidemiologic Features of Acute Hepatitis B in the Saratov Region in Modern Conditions

Lopatin A.A., Safronov V.A., Razdorskiy A.S., Kouklev E.V. Current State of Problem of Mathematical Modeling and Prognosis of the Epidemic Process

Lyamkin G.I., Tikhenko N.I., Manin E.A., Vilinskaya S.V., Golovneva S.I., Rusanova D.V. The Epizootological and Epidemiologic Situation on Brucellosis in the Southern Federal District of the Russian Federation in 2006–2009

Safronov V.A., Razdorskiy A.S., Skalenko S.Yu., Lopatin A.A., Kovtunov A.I., Piskunova N.V., Kologorov A.I., Kouklev E.V., Toporkov V.P. Geographical Information System for Epidemiological Surveillance of Natural Focal Infectious Diseases in Combined Foci in the Territory of the Astrakhan Region

Ustun N.M. Modern Particularities of Campylobacteriosis Epidemiology in Azerbaijan

Microbiology, Immunology, Diagnostics

Barkov A.M., Barkova I.A., Alekseev V.V., Lipnitskiy A.V., Kulakov M.Ya. Detection of Antibodies to Protective Antigen of *Bacillus anthracis* Using Indirect Hemagglutination Test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Goncharova A.Yu., Mikshis N.I., Kudryavtseva O.M., Bolotnikova M.F., Novikova L.V., Krasichkov G.G., Alenkina T.V., Popov Yu.A. Obtaining of Polyclonal Antibodies against *B. anthracis* S-layer Proteins and Study of their Specificity in Enzyme Immunoassay

Морозова Т.П., Домотенко Л.В., Храмов М.В. Оценка диагностических свойств прозрачной питательной среды для культивирования и выделения туляремийного микроба (Ft-агара)..... 50

Оборин В.А., Пименов Е.В., Ивонин А.Г. Влияние условий культивирования штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ на его адгезивные свойства 54

Биотехнология

Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Лобовикова О.А., Еремин С.А., Васин Ю.Г., Михеева Т.А., Жулидов И.М., Минаева Л.Н., Галкина М.В., Савицкая Л.В., Селезнева А.Г., Свинцов Р.А., Генералов С.В., Шульгина И.В. Производство гетерологичного антирабического иммуноглобулина – итоги первых пяти лет 58

Степанов А.В., Майоров Н.В., Никифоров А.К. Совершенствование технологии синтеза олигонуклеотидных праймеров для производства ПЦР-тест-систем 63

Краткие сообщения

Гончаров А.И., Шапошникова Л.И. Об особенностях морфологии представителей *Callopsylla caspia* из различных частей ее ареала 68

Казина И.С. Эпидемиолого-эпизоотологическая ситуация по лептоспирозам на территории Республики Мордовия за 2002–2008 гг. 71

Кочетов Е.Н., Богачева А.И., Андрущенко Ю.В. Опыт подготовки специализированных формирований в Республике Мордовия..... 74

Юбилей

К 70-летию Виктора Васильевича Малеева 76

Информация

Участие специализированной противоэпидемической бригады ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб», модернизированной на базе автошасси, в Международном салоне «Комплексная безопасность – 2010» 77

Morozova T.P., Domotenko L.V., Khramov M.V. Evaluation of the Diagnostic Properties of Transparent Nutrient Medium for Cultivation and Isolation of Tularemia Agent (Ft-agar) 50

Oborin V.A., Pimenov E.V., Ivonin A.G. The Influence of Growth Conditions of *Yersinia pestis* EV NIIEG Strain on Its Adhesion Properties 54

Biotechnology

Abramova E.G., Nikiforov A.K., Lobovikova O.A., Eremin S.A., Vasin Yu.G., Mikheeva T.A., Zhulidov I.M., Minaeva L.N., Galkina M.V., Savitskaya L.V., Selezneva A.G., Svintsov R.A., Generalov S.V., Shoulgina I.V. Heterologous Anti-Rabies Immunoglobulin – Results of the First Five Years of Production 58

Stepanov A.V., Mayorov N.V., Nikiforov A.K. Improvement of Oligonucleotide Primers Synthesis Technology for PCR Test Systems Production 63

Brief Communications

Goncharov A.I., Shaposhnikova L.I. The Particularities of Morphology of the *Callopsylla caspia* Representatives from Different Parts of Its Areal 68

Kazina I.S. The Epidemiological and Epizootiological Situation on Leptospirosis in the Territory of the Republic of Mordovia for 2002–2008 71

Kochetov E.N., Bogacheva A.I., Andrushchenko Yu.V. The Experience of Specialized Teams Training in the Republic of Mordovia 74

Anniversaries

To the 70-th anniversary of Victor V. Maleev 76

Information

Participation of the RAPRI “Microbe” Specialized Anti-Epidemic Team Modernized on the Basis of the Cross-Country Chassis in the International Exhibition “Integrated Safety and Security, 2010” 77

Г.Г.Онищенко¹, Н.Д.Пакскина¹, В.П.Топорков², А.В.Топорков²,
А.Е.Шиянова², В.В.Кутырев²

НАУЧНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РЕАЛИЗАЦИИ МЕЖДУНАРОДНЫХ МЕДИКО-САНИТАРНЫХ ПРАВИЛ (2005 г.) НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

¹Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва;

²ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Реализация ММСП (2005 г.) на территории Российской Федерации выходит за рамки формального признания и технического исполнения. Внедрению подлежат существенно измененные и принципиально новые концептуальные основы данного международного документа по отношению к ранее действовавшим ММСП (1969 г.). С учетом этого реализация ММСП (2005 г.) носит в известной мере опытный (исследовательский) характер. Следовательно, функционирование ММСП (2005 г.) процедурно требует мониторингования и перманентной оценки со стороны ВОЗ (в докладах Генерального директора) относительно адекватности документа современным эпидемиологическим, социально-экономическим и геополитическим реалиям.

Реализация ММСП (2005 г.) на территории Российской Федерации потребовала разработки определенной методологии и специального алгоритма действий, включающих дифференцирование спектра компонентов концептуальной новизны данного документа, их интеграцию в содержание, принципы санитарной охраны, совершенствование ее 3-уровневой системы на основе структурно-функционального укрепления сети мониторинга возбудителей инфекционных и паразитарных болезней, подготовку специалистов по ММСП (2005 г.) и санитарной охране территории Российской Федерации.

Ключевые слова: Международные медико-санитарные правила (ММСП, 2005 г.), санитарная охрана территории Российской Федерации.

Международные медико-санитарные правила (2005 г.), далее ММСП (2005 г.), принятые 58-й сессией Всемирной ассамблеи здравоохранения (ВАЗ), вступили в силу 15 июня 2007 г., заменив ММСП 1969 г. (с изменениями 1973 и 1981 гг.).

Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) разработаны направления поэтапного внедрения ММСП (2005 г.) [8] – до 14 июня 2009 г. и 2012 г. (+2 года → 2014; +2 года → 2016). Основное назначение разработок – приведение национальных возможностей по противодействию чрезвычайным ситуациям в области общественного здравоохранения (ЧС), имеющим международное значение, к уровню, соответствующему основным требованиям ММСП (2005 г.). При этом оценка национальных возможностей и выбор решений, требующих времени, вложений и готовности к изменениям, предоставлены самим странам.

Рекомендации ВОЗ [7, 8] имеют общий характер, не затрагивая методологические аспекты внедрения ММСП (2005 г.) на национальном уровне. Лаконичный характер формулировок в стратегии ВОЗ до 2016 г., не раскрывающих весь спектр компонентов концептуальной новизны ММСП (2005 г.), не позволяет использовать их для разработки унифицированной методологической основы системы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения на национальном уровне, ориентированной, как известно, на ранее действовавшие и утратившие силу ММСП (1969 г.).

Вместе с тем замена методологической базы ММСП (1969 г.) на методологическую базу ММСП

(2005 г.), имеющую продолжение в национальной нормативно-методической базе, носит, в связи с их принципиальным отличием, опытный характер и поэтому требует научного сопровождения при постоянной оценке адекватности новых национальных документов современным эпидемиологическим, социально-экономическим и геополитическим реалиям.

В работах отечественных и зарубежных исследователей [9, 10, 11, 26, 27, 28, 33, 36, 37] охарактеризованы преимущества ММСП (2005 г.). Причем сделано это как на этапе разработки проекта документа, так и после его принятия ВАЗ в 2005 г. и вступления в силу в 2007 г. Принципиально новые концептуальные основы проекта ММСП прошли успешную апробацию в 2003 г. в процессе борьбы с SARS, что в немалой степени способствовало их принятию на национальном и международном уровне. В 2009 г. ММСП (2005 г.) успешно были применены в противодействии распространению пандемического гриппа А/Н1N1/-09.

Приводимые ВОЗ обзоры по реализации ММСП (2005 г.) на национальном уровне [2, 3, 12, 13, 35] носят в основном технический характер, не имея отношения к методологии реализации ММСП (2005 г.) с точки зрения многокомпонентности их концептуальной новизны, и касаются в основном:

- формирования сети национальных координаторов и контактных пунктов ВОЗ;
- статистики событий, регистрируемых в странах и сообщаемых в ВОЗ (на февраль 2010 г. 1242 события);
- функционирования защищенного веб-сайта и

пополнения базы данных (877 пользователей, представляющих 178 государств);

- укрепления межведомственных связей и сотрудничества Национальных координаторов по ММСП с другими правительственными и неправительственными организациями¹;

- технической помощи со стороны ВОЗ в укреплении национального потенциала²;

- деятельности Глобальной сети оповещения о вспышках болезней и ответных мер.

Опытный характер внедрения ММСП (2005 г.) на национальном уровне требует соответствующего последовательного научно-методического сопровождения этого процесса, поскольку речь идет о поэтапной интеграции компонентов новизны данного документа в национальную правовую, нормативную и методическую базу, ориентированную на ММСП (1969 г.). Сам факт создания и реализации концептуально новых ММСП (2005 г.) – это в известной мере международный эксперимент, проводимый в целях повышения надежности выявления, скрининга, мониторинга и контроля наиболее опасных угроз санитарно-эпидемиологического характера. Моделью противоэпидемической готовности на международном уровне может служить «Глобальный план ВОЗ по подготовке к борьбе с гриппом» (2005 г.) и принятие в 2006 г. резолюции ВА3 59.2 по применению ММСП (2005 г.), до официального вступления их в силу (в 2007 г.), в отношении предупреждения гриппа птиц и пандемии гриппа.

Из опубликованных материалов, отражающих опыт различных стран по внедрению ММСП (2005 г.) [6, 25, 29, 30, 31, 32, 34, 36], можно выделить такие общие черты, как использование законодательного подхода³, разработка более детализированных национальных руководств, технических стандартов⁴, назначение в качестве Национального координатора органа (министерства, ведомства), ответственного за вопросы здравоохранения. Вместе с тем можно кон-

статировать, что страны находятся на разных этапах внедрения ММСП (2005 г.), и подход к решению возникающих вопросов также неоднозначен. Так, в ряде стран с федеральным устройством потребовались определенные политические меры, направленные на преодоление негативного влияния децентрализации на своевременный и эффективный национальный ответ на ЧС [36]. В Австралии, Канаде и США решение предложено на основе гармонизации законодательства, создания меморандумов о взаимопонимании. При этом в США и Австралии в сферу внедрения ММСП (2005 г.) включены силы безопасности, законодательно надзор в области общественного здравоохранения увязан с системой национальной безопасности. Регламентирование межведомственного сотрудничества при выявлении и противодействии ЧС представлено в формате соглашений между правительствами федерального и территориального уровней (Канада, Австралия).

Вступление в силу ММСП (2005 г.) на территории Российской Федерации произошло без оговорок или каких-либо условий, поскольку все предложения Российской Федерации принципиального характера были приняты ВОЗ в рабочем порядке и учтены еще на этапе разработки проекта указанного международного документа.

Некоторые аспекты существа новой идеологии противодействия современным угрозам и вызовам, ориентированной на устойчивую тенденцию появления новых и возвращающихся инфекционных болезней, а также на предотвращение массовых неинфекционных заболеваний (отравлений), обстоятельно проанализированы в работах Г.Г.Онищенко и соавт. [9, 10, 11]. В этих работах соединены решения саммитов стран G8 (2006, 2007, 2008 гг.) и ММСП (2005 г.) в рамках единой стратегии борьбы с инфекционными болезнями. В настоящем исследовании, в отличие от предшествовавших работ, рассматривается весь комплекс компонентов новизны ММСП (2005 г.),

¹Данные в ВОЗ представили 119 государств, во всех приняты меры по информированию о требованиях ММСП различных ведомств, среди которых чаще всего (более 85 %) упоминаются секторы здравоохранения, политики и лица, принимающие решения, персонал, участвующий в обеспечении готовности к чрезвычайным ситуациям, персонал сектора безопасности пищевых продуктов. Ведомства, с которыми Национальные координаторы по ММСП чаще всего (более 80 %) устанавливают сотрудничество – сектор здравоохранения, секторы безопасности пищевых продуктов, сельского хозяйства, рыболовства и лесного хозяйства, сектор лекарственных средств и химической безопасности.

²Предоставление технических стандартов, технических средств, укрепление систем обеспечения качества лабораторий посредством программ внешней оценки микробиологического качества, двусторонних лабораторных программ, подготовки по лабораторной безопасности, лабораторной сертификации для транспортировки инфекционных субстанций, региональных сетей по эпидемиологическому надзору, подготовки по полевой эпидемиологии, в области передачи информации о рисках, технических руководств и поддержки в отношении определенных аэропортов, портов и наземных транспортных узлов, представление через библиотеку по ММСП многоязычных онлайн-материалов и учебных модулей.

³Например, в Швеции ММСП были внедрены в национальную законодательную систему новым Актом по защите от международных угроз общественному здравоохранению, предложенным правительственным биллем (законопроектом) взамен существовавшего Карантинного Акта.

Данный законодательный акт дополняет регулирование относительно контроля инфекционных болезней и управления химическими и радиоактивными угрозами. Правительством Китайской Народной Республики был пересмотрен «Закон о медико-санитарном контроле и карантине при пересечении границы» в связи с применением положений ММСП. В Королевстве Тонга обеспечение законодательного соответствия с ММСП (2005 г.) связано с рассмотрением Закона об общественном здравоохранении 1992 г. В Республике Беларусь в связи с принятием ММСП (2005 г.) внесены изменения и дополнения в Закон Республики Беларусь «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» (1993 г.). В Индии предложена новая законодательная база, которая предоставляет федеральному правительству полномочия в отношении ЧС, объявленной ВОЗ как имеющая международное значение.

⁴В частности, в КНР – разработка технических стандартов по эпиднадзору, отчетности, оценке, выявлению и уведомлению в отношении ЧС. Примером нормативного документа США может быть Акт о готовности к пандемиям и всевозможным угрозам. В Республике Беларусь – это «Порядок оценки и уведомления ВОЗ о событиях, которые могут представлять собой ЧС». В Швеции Национальным Советом здравоохранения и Благополучия выпущены правила в целях внедрения Акта по защите от международных угроз общественному здравоохранению, а также правила относительно болезней, сообщения о которых должны быть переданы ответственными властями Национальному координатору (список содержит болезни, указанные в Приложении 2 ММСП (2005 г.), и содержания данных сообщений).

предопределивших методологию и алгоритм их реализации на территории Российской Федерации.

С внедрением ММСП (2005 г.) на территории Российской Федерации основной задачей стало научное и материально-техническое обеспечение их интеграции в методологию эпидемиологического надзора и контроля инфекционных болезней, в содержание и принципы санитарной охраны, в развитие межведомственного взаимодействия, в укрепление национальной лабораторной сети, осуществляющей мониторинг возбудителей инфекционных болезней, подготовку специалистов.

Решение этой задачи стало возможным при проведении отдельного исследования, целью которого являлась разработка унифицированной методологической основы поэтапной реализации концептуальной новизны ММСП (2005 г.), складывающейся в типовой алгоритм внедрения этого документа на национальном уровне на примере Российской Федерации. В рамках исследования проведена инвентаризация и систематизация всех аспектов концептуальной новизны ММСП (2005 г.) с учетом комплексной оценки недостатков ММСП (1969 г.), с выделением элементов, подлежащих реализации на национальном уровне.

Из положений ММСП (1969 г.), а также аспектов их смысловой нагрузки, которые утратили актуальность в современных условиях, можно выделить следующие:

- регламентация только трех карантинных инфекционных болезней и мероприятий против них в основном тексте документа;
- сложная процедура корректировки перечня регламентируемых болезней;
- требование неотложного уведомления ВОЗ со стороны национальных органов управления здравоохранением о каждом случае карантинной болезни вне зависимости от его значимости для международных сообщений (например, бубонная чума);
- уведомление ВОЗ о случаях карантинной болезни только после расшифровки этиологического агента на национальном уровне и отсутствие процедуры неотложного уведомления на основе клинико-эпидемиологических признаков;
- отсутствие процедуры коммуникации ВОЗ с государствами-членами на основе сообщений в средствах массовой информации;
- общение ВОЗ на страновом уровне только с официальными структурами государственного здравоохранения и зависимость при принятии решения от уведомления из страны;
- недооценка устойчивой тенденции появления новых инфекционных болезней;
- отсутствие в учетной номенклатуре событий угроз санитарно-гигиенического (токсикологического) порядка;
- приоритет национального эпидемиологического надзора за карантинными инфекционными болезнями в глобальном его осуществлении.

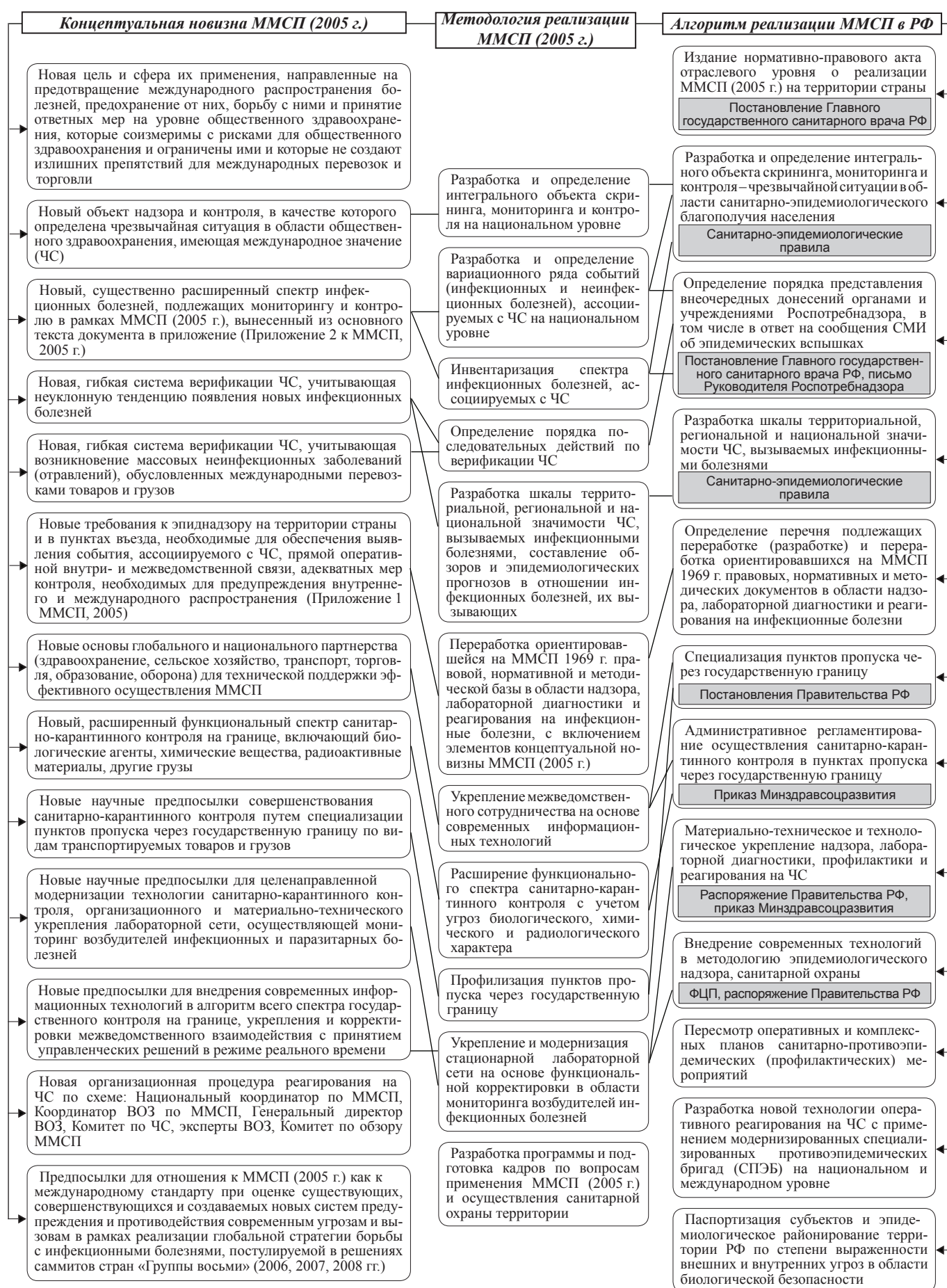
Новизна ММСП (2005 г.), как известно из приведенных выше работ, складывается из ряда принципиально новых положений, начиная с формулировки целевого назначения этого документа, определения основного объекта надзора и контроля и завершая приложениями 1 и 2, в которых регламентирован алгоритм скрининга, мониторинга и контроля ЧС. Внедрению на национальном уровне подлежат перечисленные новые положения (схема), конкретизирующие концептуальные основы ММСП (2005 г.).

При внедрении приведенных на схеме новых положений необходимо учитывать особенности санитарно-эпидемиологической обстановки, международных связей и состояния служб здравоохранения в конкретных странах.

В настоящем исследовании проанализирован, охарактеризован и систематизирован весь спектр научно-практических задач по реализации ММСП (2005 г.) в Российской Федерации, решение которых позволило создать методологию и соответствующий алгоритм действий, принципиально применимых на национальном уровне. Научное обеспечение реализации ММСП (2005 г.) на территории Российской Федерации является составной частью данного алгоритма.

На момент вступления в силу ММСП (2005 г.) в Российской Федерации сложились следующие условия для их внедрения:

1. Наличие в стране восприимчивой к концептуальной новизне ММСП (2005 г.) законодательной основы, в качестве которой выступает Федеральный закон от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения», статья 30 которого трактует содержание санитарной охраны территории страны, близкое к основным положениям ММСП (2005 г.).
2. Действие в стране пакета подзаконных правовых, нормативных и методических документов (актов Правительства Российской Федерации, санитарно-эпидемиологических правил, методических указаний), достаточно, с точки зрения ММСП (1969 г.), регламентирующих надзор и контроль инфекционных болезней.
3. Наличие в стране исходных структур здравоохранения – государственной санитарно-эпидемиологической службы и лечебно-профилактической сети, включая службу медицины катастроф, и определяющих их функции законодательной и нормативно-методической баз, играющих ключевую роль в профильном противодействии ЧС и организации межведомственного взаимодействия на территориальном, региональном и национальном уровнях.
4. Создание в результате административной реформы в стране Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) с закреплением за ней функции обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения, обеспечения биологической безопасности [14], организации и ко-



Функциональные связи элементов концептуальной новизны ММСП (2005 г.), методологических аспектов и алгоритма реализации данного документа в Российской Федерации

ординации взаимодействия на межведомственном уровне в рамках созданной системы государственно-санитарно-эпидемиологического надзора.

5. Наличие в стране обновленной после административной реформы нормативной базы, определяющей межведомственное взаимодействие при предупреждении и ликвидации ЧС. Координирующей структурой при взаимодействии на основе ММСР (2005 г.) являются санитарно-противоэпидемические комиссии (СПК), возглавляемые руководителями органов исполнительной власти субъектов Российской Федерации.

Реализация ММСР (2005 г.) включает как формальные процедуры организационного и нормативно-методического плана, так и содержательную, методологическую часть – интеграцию в национальную нормативно-методическую базу нового содержания и новых принципов в области эпидемиологического надзора, санитарной охраны, корректировок терминологического плана, программы подготовки специалистов, укрепление лабораторной сети и межведомственного взаимодействия (схема).

Точки приложения ММСР (2005 г.) были определены уже на первом этапе нормативно-правовым актом отраслевого уровня о реализации нового международного документа на территории страны [16]:

- функции Национального Координатора по ММСР возложены на Федеральную службу по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека;

- предусмотрена необходимость корректировки комплексных планов по эпидемиологическому надзору с целью адаптирования их к ММСР (2005);

- определены направления межведомственного взаимодействия при осуществлении ММСР на национальном уровне: администрация территорий, Пограничная служба ФСБ России, Федеральная таможенная служба, органы управления здравоохранением, органы и учреждения Роспотребнадзора, а также органы и учреждения Россельхознадзора, ветеринарные органы и учреждения субъектов Российской Федерации, Министерство транспорта и связи, МВД, МЧС, Минобороны России (в рамках деятельности СПК).

На основе анализа правовых, нормативных и методических документов в области эпидемиологического надзора, санитарной охраны территории определен перечень документов, подлежащих переработке с учетом новых концептуальных основ ММСР (2005 г.) [15].

На принципиально новой основе разработаны Санитарно-эпидемиологические правила «Санитарная охрана территории Российской Федерации» (СП 3.4.2318-08), в которых нормативно закреплены концептуальные основы новизны ММСР (2005 г.) и, по существу, методологические аспекты их реализации:

- определен унифицированный объект эпидемиологического надзора, санитарной охраны – чрез-

вычайная ситуация в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения, имеющая национальное значение; определение данному термину дано в энциклопедическом словаре-справочнике «Профилактическая медицина и эпидемиология» [1];

- адаптирован к условиям Российской Федерации алгоритм верификации ЧС, приведенный в ММСР (2005г.);

- скорректирован перечень инфекционных болезней и в целом определен вариационный ряд событий, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации;

- разработана шкала территориальной, региональной и национальной значимости ЧС, вызываемых инфекционными болезнями, получившая нормативное закрепление в Санитарно-эпидемиологических правилах СП 3.1.7.2492-09 «Профилактика чумы» и методических указаниях «Организация и проведение эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации». МУ 3.1.3.2355-08.

При реализации ММСР (2005 г.) ВОЗ акцентирует внимание стран на системообразующие свойства этого документа при осуществлении глобального и национального эпидемиологического надзора [8]. По мнению К. Wilson *et al.* [36], на основе реализации ММСР (2005 г.) возможно создание всеобъемлющей, полностью интегрированной системы выявления и реагирования на ЧС.

В порядке реализации ММСР (2005 г.) в Российской Федерации в условиях создания инновационной атмосферы и технологической модернизации в области биологической безопасности проведено укрепление стационарной лабораторной сети и мобильных формирований.

В соответствии с Приказом Роспотребнадзора от 17 марта 2008 г. № 88 «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней» в Российской Федерации на функциональной основе создана система, включающая 5 видов центров [5]:

- референс-центры по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней с функциями в рамках ММСР (2005 г.);

- национальные центры верификации диагностической деятельности;

- национальные центры, осуществляющие функции государственных коллекций Роспотребнадзора;

- региональные центры по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней II–IV и I–II групп патогенности;

- центры индикации и диагностики возбудителей опасных инфекционных болезней.

Осуществлен четырехлетний инновационный цикл в совершенствовании деятельности специализированных противоэпидемических бригад (СПЭБ) Роспотребнадзора, заключающийся в:

- модернизации материально-технической базы как самих бригад, так и инфраструктуры противо-

чумных институтов, позволившей вывести работу по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения в условиях ЧС на современный высокотехнологический уровень;

- интегрировании и масштабировании (от патентов до создания и тиражирования мобильных комплексов СПЭБ) современных технологий с модульным принципом укомплектования на базе пневмокаркасных палаток и автошасси, повышающих уровень мобильности и автономности функционирования;

- создании гибкой структурно-функциональной организации СПЭБ, позволяющей в режиме реального времени варьировать силами и средствами, тактическими приемами практического использования в зависимости от масштаба ЧС и условий возникновения (стихийные бедствия, гуманитарные катастрофы, техногенные аварии, акты биотерроризма), объема и профиля помощи территориальным структурам здравоохранения; тактически СПЭБ используют в виде отдельных эпидемиолого-диагностических групп (полевые эпидемиологические группы), модулей, в полном составе или одновременно несколько СПЭБ.

Завершенный инновационный цикл совершенствования деятельности СПЭБ, а по существу, созданная новая технология оперативного реагирования на ЧС, была продемонстрирована в рамках Международного салона «Комплексная безопасность – 2010», проведенного на полигоне МЧС России в Ногинске Московской области 21 мая 2010 г., и на экспозиции на Всероссийском выставочном центре в Москве 18–21 мая.

В рамках реализации новых требований к эпидемиологическому надзору приведено к адекватному уровню информационное обеспечение данной области. Определен порядок внутриведомственного поуровневого оперативного представления информации в электронном виде [17, 24], оперативного предоставления официальных данных в ответ на появление сообщений об эпидемических вспышках в средствах массовой информации [4].

Новая сфера применения ММСП (2005 г.) предполагает расширение функционального спектра санитарно-карантинного контроля в пунктах пропуска через государственную границу с учетом угроз биологического, химического и радиологического характера. Это, в свою очередь, потребовало решения вопросов нормативного и материально-технического обеспечения его проведения, укрепления межведомственного сотрудничества, в том числе на основе современных информационных технологий.

Постановлениями Правительства Российской Федерации [18, 19] в развитие положений законодательной базы установлена очередность осуществления всех видов государственного контроля в пунктах пропуска через государственную границу при функциональном разделении санитарно-карантинного контроля: в отношении лиц – до проведения иных видов контроля, в отношении товаров и грузов – после пограничного и таможенного контролей.

Определены принципы межведомственного взаимодействия, установлена специализация пунктов пропуска через государственную границу по видам перемещаемых грузов [20, 21].

В рамках осуществления федеральной целевой программы «Государственная граница Российской Федерации» и реализации положений ММСП (2005 г.) осуществляется технологическая модернизация санитарно-карантинных пунктов (в соответствии с приказом Роспотребнадзора от 18.09.2006 г. № 320 [25]) и ФГУЗ «ЦГиЭ», участвующих в обеспечении осуществления санитарно-карантинного контроля. Осуществлено административное регламентирование процедуры санитарно-карантинного контроля с учетом требований ММСП (2005 г.) [22].

Проблемы технологической модернизации и усовершенствования межведомственного взаимодействия с учетом поэтапного внедрения ММСП (2005 г.) комплексно решаются в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

При этом создается интегрированная система эпидемиологического и санитарно-гигиенического мониторинга и контроля на основе ГИС-технологии и поэтапно осуществляется паспортизация субъектов Российской Федерации и эпидемиологическое районирование территории страны по степени выраженности внешних и внутренних угроз биологической безопасности, способных создать чрезвычайную ситуацию санитарно-эпидемиологического характера, с разработкой компьютерных программных продуктов для поддержки принятия управленческих решений.

Важным звеном в методологии осуществления ММСП (2005 г.) является разработка программы и подготовка кадров по вопросам применения ММСП (2005 г.) и осуществления санитарной охраны территории. На курсах и семинарах в 2008–2010 гг. подготовлено 540 специалистов из всех субъектов Российской Федерации и регионов Республики Беларусь в порядке сотрудничества в рамках Таможенного союза.

В процессе реализации концептуальной новизны ММСП (2005 г.) на территории Российской Федерации переработаны и разработаны вновь распорядительные документы: Правительства Российской Федерации – 6, Минздравсоцразвития России – 1, Роспотребнадзора – 11, а также санитарно-эпидемиологические правила – 2, методические указания – 2, другие методические документы федерального уровня. В целом в Российской Федерации разработаны и осуществляется План поэтапной реализации ММСП (2005 г.) с учетом разработанной ВОЗ стратегии до 2016 г.

Таким образом, в процессе научного сопровождения реализации ММСП (2005 г.) на территории Российской Федерации создана методология (совокупность тактических и методических подходов), основанная на поэтапном учете внедрения их

концептуальной новизны и, следовательно, оценке полноты реализации на национальном уровне современной стратегии предупреждения и борьбы с чрезвычайными ситуациями санитарно-эпидемиологического характера. В замене утративших актуальность положений ММСП 1969 г. на новые положения ММСП (2005 г.) состоит универсальность подхода к перезагрузке готовности страны к предупреждению и ликвидации чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Эта методология может быть рекомендована ВОЗ для использования в обзорах, касающихся имплементации ММСП (2005 г.) на национальном и международном уровнях.

Разработанная методология оценки внедрения ММСП (2005 г.) на территории Российской Федерации, имеющая принципиально унифицированный характер для национального и международного уровня, в том числе формата СНГ, ЕврАзЭС, ШОС, АТЭС и др., рекомендуется к использованию в рамках Таможенного союза с целью оценки готовности к осуществлению мониторинга и контроля чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арутюнов А.Т., Денисенко В.И., Турзин П.С., Ходжаев С.С. Профилактическая медицина и эпидемиология. Энциклопедический словарь-справочник. Москва – Смоленск; 2010. 756 с.
2. Выполнение Международных медико-санитарных правил (2005 г.) в Европейском регионе ВОЗ. 59-я сессия Европейского регионального комитета ВОЗ, Копенгаген, 14–17 сентября 2009 г. EUR/RC59/10+EUR/RC59/Conf.Doc./8. 10 августа 2009 г. 91380.
3. Доклад-отчет Генерального директора о действиях, предпринятых ВОЗ в рамках ММСП в ответ на пандемию гриппа А(H1N1)-2009 г. <http://www.who.int/ihp>
4. Информационное письмо Роспотребнадзора от 27.11.2007 г. № 0100/12225-07-32 «О предоставлении внеочередных донесений в ответ на сообщения об эпидемических вспышках в СМИ».
5. Кутырев В.В., Пакскина Н.Д., Щербакова С.А. Перспективы совершенствования лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней. Дезинфекционное дело. 2009; 2:36–7.
6. Международные медико-санитарные правила (2005 г.). 2-е изд. ВОЗ, Женева; 2008. Дополнение 2: оговорки и другие сообщения государств-участников в связи с ММСП (2005 г.).
7. Международные медико-санитарные правила (2005 г.). Краткое введение в проблему осуществления на уровне национального законодательства. Всемирная организация здравоохранения; 2009 г. 14 с. <http://www.who.int/ihp>
8. Международные медико-санитарные правила (2005 г.). Направления работы по выполнению правил. Июнь 2007 г. <http://www.who.int/ihp/finalversion9Nov07.pdf>
9. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Кривуля С.Д., Федоров В.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. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Кривуля С.Д., Федоров Ю.М., Топорков В.П. Санитарная охрана территории Российской Федерации: современное нормативно-методическое, организационное и научное обеспечение. Пробл. особо опасных инф. 2007; 1(93):5–10.
11. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Топорков В.П., Чистякова Г.Г., Пакскина Н.Д. Реализация глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями и применение современных технологий в государствах-участниках СНГ. В кн.: Матер. IX Межгос. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ. Волгоград; 2008. С. 9–12.
12. Осуществление ММСП (2005 г.). Доклад Генерального директора на 126 сессии исполнительного комитета ВОЗ 12.11.09 г. EB 126/5. <http://www.who.int/ihp>
13. Осуществление ММСП (2005 г.). Доклад Генерального директора на 63 сессии ВАР. А 63/5. <http://www.who.int/ihp>
14. Постановление Правительства РФ от 16 мая 2005 г. № 303 «О разграничении полномочий федеральных органов исполнительной власти в области обеспечения биологической и химической безопасности Российской Федерации» (с изменениями от 23 марта 2006 г., 13 марта 2008 г.).
15. План Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации по обеспечению гармонизации национальной нормативно-методической базы с ММСП (2005) (утвержден Руководителем Роспотребнадзора 25.06. 2007 г.).
16. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 11.05. 2007 г. № 27 «О реализации Международных медико-санитарных правил (2005)».
17. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 24.02.2009 г. № 11 «О представлении внеочередных донесений о чрезвычайных ситуациях в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера»
18. Постановление Правительства Российской Федерации от 20.11.2008 г. № 872 «Об утверждении Правил осуществления контроля в пунктах пропуска через государственную границу Российской Федерации».
19. Постановление Правительства Российской Федерации от 16.02.2008 г. № 94 «О видах контроля, осуществляемых в пунктах пропуска через Государственную границу Российской Федерации».
20. Постановление Правительства Российской Федерации от 21 февраля 2008 г. № 109 «Об определении перечней пунктов пропуска через государственную границу Российской Федерации, специально оборудованных и предназначенных для ввоза на территорию Российской Федерации животных, продуктов животноводства и кормов, подкарантинной продукции (подкарантинного материала, подкарантинного груза)».
21. Постановление Правительства Российской Федерации от 21.02.2008 г. № 110 «Об определении перечней пунктов пропуска через государственную границу Российской Федерации, специально оборудованных и предназначенных для ввоза на территорию Российской Федерации товаров, химических, биологических и радиоактивных веществ, отходов и иных грузов, представляющих опасность для человека, пищевых продуктов, материалов и изделий».
22. Приказ Минздравсоцразвития России от 31.12.2006 г. № 893 «Об утверждении Административного регламента Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по осуществлению санитарно-карантинного контроля в пунктах пропуска через Государственную границу Российской Федерации».
23. Приказ Роспотребнадзора от 18.09.2006 г. № 320 «О регламенте оснащения пунктов пропуска».
24. Приказ Руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 16.03.08 № 84 «Об оперативном предоставлении информации в электронном виде в режиме постоянного времени».
25. Римжа М.И., Нарушевич Г.А., Себут Н.С., Галенчик А.В. Санитарная охрана территории Республики Беларусь от завоза и распространения опасных инфекционных болезней. В кн.: Матер. VIII Межгос. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ. Саратов; 2007. С. 104–6.
26. Топорков В.П., Кутырев В.В., Федоров Ю.М., Шиянова А.Е., Меркулова Т.К. Глобализационные процессы как фактор, определяющий современную концепцию санитарной охраны территории. Пробл. особо опасных инф. 2005; 2(90):36–9.
27. Федоров Ю.М., Кутырев В.В., Топорков В.П., Иванов М.П. Анализ и оценка проекта Международных медико-санитарных правил, разработанных Секретариатом ВОЗ. Пробл. особо опасных инф. 2004; 1(87):5–9.
28. Фукуда К. Заявление от имени ВОЗ на слушаниях Совета Европы по вопросам пандемии (H1N1) – 2009. 26 января 2010 г. <http://www.who.int>
29. IHR assessment in Sierra Leone. WHO Country Office, Sierra Leone, Newsletter. January – February 2009. P. 5–7.
30. Implementation of International Health Regulations (2005). Report of the First Regional Workshop Male, Republic of Maldives, 23–25 April 2007. WHO, Regional Office for South-East Asia (SEARO). New Delhi, February 2008. 32 p.
31. Implementation of the International Health Regulations in Sweden. <http://www.socialstyrelsen.se>.
32. Implementation of the International Health Regulations in the African region: progress report. Information Document. Regional committee for Africa, 59-th session, Kigali, Republic of Rwanda, 31 August – 4 September 2009. AFR/RC59/INF.DOC/3. 29 June 2009.
33. Kimball A.M., Moore M., French H.M., Arima Y., Ungchusak K., Wibulpolprasert S. et al. Regional Infectious Disease Surveillance Networks and their Potential to Facilitate the Implementation of the International Health Regulations. Med. Clin. North Am. 2008; 92(6):1459–71.
34. Schlaich C. Implementation of the International Health

Regulations 2005 at ports from the German perspective. Presentation to the Association of Port Health Authorities Conference in Manchester Sept. 11th 2008.

35. WHO Technical consultation on the "Implementation and Evaluation of Annex 2 of the IHR (2005)". Geneva, Switzerland 20 to 22 October 2008.

36. Wilson K., McDougall C., Fidler D., Lazar H. Strategies for implementing the new International Health Regulations in federal countries. Bull. World Health Organ. 2008; 86(3):215–20.

37. Wilson K., Tigerstrom B.M., McDougall C. Protecting global health security through the International Health Regulations: requirements and challenges. CMAJ. 2008; 179(1):44–8.

G.G.Onischenko, N.D.Pakskina, V.P.Toporkov, A.V.Toporkov,
A.E.Shiyanova, V.V.Kutyrev

**Methodological Principles of Implementation
of International Health Regulations (2005)
in the Territory of the Russian Federation**

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

Implementation of IHR (2005) in the territory of Russian Federation is beyond the scope of formal admission and technical execution. Fundamentally amended and principally new conceptual essentials of the present international document in relation to previously valid IHR (1969) are to be implemented. In view of above-mentioned, the realization of IHR (2005) is of experimental (research) character to a certain extent. In connection with this, the proce-

cedure of functioning of IHR (2005) demands the monitoring and permanent evaluation by the WHO (in the reports of Director-General) with regards to correspondence of the document to the modern epidemiological, social and economic, and geopolitical realities.

The IHR (2005) realization in the territory of the Russian Federation demands the development of a certain methodology and special algorithm of activity which include the differentiation of a range of components of conceptual originality of this document, their integration into the content, principles of sanitary protection, improvement of its 3-levels system on the basis of structural and functional strengthening of the network for monitoring of infectious and parasitic diseases agents, training of specialists on IHR (2005) and sanitary protection of the Russian Federation territory.

Key words: International Health Regulations (IHR 2005), sanitary protection of the territory of the Russian Federation

Об авторах:

Онищенко Г.Г., Пакскина Н.Д. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва.

Топорков В.П., Топорков А.В., Шианова А.Е., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Onischenko G.G., Pakskina N.D. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare. Moscow.

Toporkov V.P., Toporkov A.V., Shiyanova A.E., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 16.07.10.

С.П.Заднова, Н.И.Смирнова

РОЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА В АДАПТАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ХОЛЕРЫ ВО ВНЕШНЕЙ СРЕДЕ

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

В обзоре представлены литературные данные об участии внеклеточного экзополисахарида в формировании морфологически измененных ругозных вариантов холерного вибриона, отличающихся большей устойчивостью к действию неблагоприятных факторов внешней среды, а также генетическим контролем синтеза ругозного экзополисахарида. Кроме того, приведены собственные экспериментальные данные об обнаружении в популяции *Vibrio cholerae* классического биовара клонов с измененной морфологией колоний (мутные) в результате продукции внеклеточного экзополисахарида и координированным изменением синтеза некоторых важных факторов патогенности (холерного токсина, растворимой гемагглютинин/протеазы, подвижности). Полученные данные позволили высказать предположение о выявлении нового механизма адаптации холерных вибрионов классического биовара при смене среды обитания.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, ругозные варианты, экзополисахарид, адаптация.

Vibrio cholerae вызывает опасное заболевание человека – холеру, известное человечеству с 1817 г., когда была зафиксирована первая пандемия. Всего известно 7 пандемий холеры, вызванных холерными вибрионами O1 серогруппы разных биоваров. Предполагается, что возбудителями первых шести пандемий азиатской холеры (с 1817 по 1926 год) были вибрионы *V. cholerae* классического биовара. Причиной седьмой пандемии (с 1961 г. по настоящее время) являются холерные вибрионы другого биовара – эльтор, отличающиеся от классических вибрионов по ряду фенотипических и генетических свойств. Появившийся в 1992 г. новый возбудитель холеры O139 серогруппы вызывает локальные вспышки заболевания. Эльтор вибрионы являются менее вирулентными, чем классические, но они отличаются большей устойчивостью к действию неблагоприятных факторов внешней среды и могут длительное время находиться в воде открытых водоемов. Установлено, что при нахождении во внешней среде холерные вибрионы выработали несколько стратегий для выживания – переход в некультивируемое состояние, формирование биопленки и образование ругозных колоний [11, 17, 19, 28, 47, 48]. Два последних процесса зависят от способности *V. cholerae* синтезировать экзополисахарид или EPS (от англ. exopolysaccharide), или VPS (от англ. *Vibrio* polysaccharide) [9, 37, 47]. Необходимо отметить, что холерные вибрионы синтезируют три вида поверхностных структур, включающих полисахариды, – липополисахарид (LPS), капсула и EPS. Предполагают, что липополисахарид и капсула в основном защищают *V. cholerae* в организме человека, а EPS – во внешней среде [17]. Продукция экзополисахарида является важным этапом при формировании биопленки. Синтезируясь на конечном этапе формирования биопленки, EPS окружает клетки защитным чехлом и способствует формированию сложной трехмерной структуры с

каналами, через которые поступают питательные вещества к бактериям и вымываются продукты их жизнедеятельности [12, 13, 52]. Повышенная продукция экзополисахарида на поверхности отдельных клеток приводит к изменению морфологии колоний и формированию ругозных (морщинистых) или р колоний (рис. 1). При этом переключение «гладкие-ругозные» варианты у холерного вибриона классифицируются

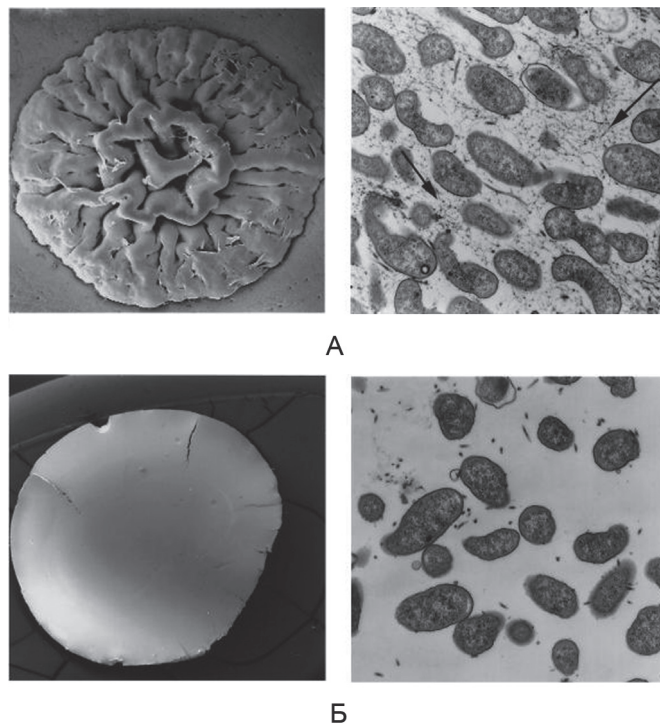


Рис. 1. Морфология колоний *V. cholerae* и электронномикроскопическое выявление экзополисахаридного слоя (окраска рутением красным) [Yildiz F.H. et al., 2001]:

А – ругозная морфология колоний. Стрелками слева отмечен экзополисахаридный слой, окружающий бактерии.

Б – гладкая морфология колоний

как фазовые вариации [8, 11, 15, 31, 34, 36, 37, 42, 45, 47, 49].

Состав и функция экзополисахарида ругозных вариантов

Ругозные варианты впервые описаны I. Balteneau в 1926 г. Впоследствии они были выявлены и другими исследователями в популяции как клинических штаммов *V. cholerae*, так и штаммов, выделенных из внешней среды. Очень часто холерные вибрионы, имеющие ругозную морфологию колоний, обнаруживаются в составе биопленки. Необходимо учитывать, что ругозные варианты не растут на TCBS (от англ. thiosulfate citrate bile salts) агаре, который используется для выделения природных изолятов *V. cholerae*. Так как в состав данной среды входит сахароза, наличие которой, как и других сахаров (декстрозы, фруктозы, мальтозы, арабинозы) в среде выращивания, приводит к резкому снижению продукции экзополисахарида. В связи с этим холерные вибрионы в ругозной форме не обнаруживаются при мониторинговых исследованиях [9, 27].

При смене морфологии колоний вирулентность штаммов *V. cholerae* не изменяется, ругозные варианты сохраняют полную вирулентность. Ругозные формы обнаружены не только у холерных вибрионов O1 серогруппы, но и у *V. cholerae* O139 серогруппы, а также у вибрионов неO1/неO139 серогрупп, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, что указывает на общий процесс, характерный для рода *Vibrio*. Кроме того, эти формы выявлены и у других патогенных бактерий (*Salmonella*, *Pseudomonas*) [8, 20, 32, 34].

В лабораторных условиях ругозные варианты получают при длительном культивировании штаммов на агаре LB при 37 °C, в щелочной пептонной воде, пептонной воде с 0,05 % цитрата железа, минимальной среде M9 при 16 °C или при 4 °C с азрацией. Для эпидемических штаммов эльтор вибрионов, выделенных от больных, переход гладких вариантов в ругозные и обратно является довольно частым явлением [8, 15, 34].

Кроме морфологии колоний, ругозные варианты отличаются от гладких сниженной подвижностью, что связано с изменением экспрессии генов, необходимых для хемотаксиса и биосинтеза жгутика [8, 49]. Однако, несмотря на незначительную подвижность, которая является одним из необходимых составляющих при формировании биопленки, ругозные варианты лучше прикрепляются к абиотической поверхности и образуют более значительную биопленку, чем варианты с гладкой морфологией колоний. Толщина биопленки, образованной ругозными колониями, составляет более 35 мкм, а гладкие варианты формируют биопленку толщиной менее 25 мкм [8, 11, 47]. Это связано, во-первых, с повышенной продукцией EPS в ругозных вариантах, во-вторых, с увеличенной экспрессией генов, кодирующих хитиназу, участвующую в прикреплении вибрионов к абиотической поверхности, и, в-третьих, с уменьшением в ругозных вариантах синтеза аутоиндукторов, что имитирует

условия низкой плотности клеточной популяции и стимулирует процесс формирования биопленки [40, 49, 51].

Ругозные варианты в меньшей степени подвержены истреблению простейшими, обладают большей устойчивостью к действию сывороток, комплемента и различных повреждающих факторов внешней среды (хлор, кислая реакция среды, ультрафиолетовое излучение, осмотический и оксидативный стрессы), чем гладкие варианты [12, 31, 35, 36, 37, 42, 45, 47, 49]. Устойчивость ругозных вариантов к неблагоприятным факторам связана со способностью клеток к агрегации и образованию защитного полисахаридного матрикса [35, 37]. При этом сахара, входящие в состав экзополисахарида, способны инактивировать некоторые агенты, например хлор. Необходимо отметить, что сохранение патогена в хлорированной воде имеет очень важное эпидемиологическое значение, так как вспышки холеры чаще всего развиваются при водном пути заражения [49].

При химическом анализе экзополисахарида, выделенного из различных штаммов холерного вибриона эльтор биовара, были обнаружены незначительные отличия в составе моносахаридов. Так EPS штамма *V. cholerae* A1552 состоял в основном из глюкозы и галактозы и небольшого количества N-ацетил-D-глюкозамина, маннозы и ксилозы [47]. В то же время в экзополисахариде штамма *V. cholerae* TSI-4 глюкоза не обнаружена, но выявлены N-ацетилглюкозамин, D-манноза, 6-дезоксид-галактоза и D-галактоза [42]. Экзополисахаридный слой холерного вибриона, как и других грамотрицательных и грамположительных бактерий, выявляется методом электронной микроскопии при окраске бактерий поликатионными красителями (рис. 1).

Генетическая детерминированность синтеза экзополисахарида

Продукция экзополисахарида кодируется генами *vps* (30,7 т.п.н.) (от англ. *Vibrio polysaccharide synthesis*), расположенными на большой хромосоме в двух кластерах – *vpsI* (*vpsA-K*) и *vpsII* (*vpsL-Q*) (рис. 2). С одной стороны, данный участок ограничен геном *acrD*, ответственным за синтез белка, определяющего устойчивость холерных вибрионов к лекарственным средствам, а с другой – геном *glyA*, кодирующим серин гидроксиметил трансферазу [7, 47, 49]. Мутация в любом гене из *vps* кластера приводит к образованию гладких колоний и формированию вибрионами незначительной биопленки [7, 47, 48, 50]. В межгенном регионе находятся пять *rbmA-F* (от англ. rugosity and biofilm structure modulators) генов, участвующих в формировании ругозных колоний и поддержании архитектуры биопленки (рис. 2). При этом секретируемый белок RbmA (от англ. for rugosity and biofilm structure modulation), кодируемый первым геном, выполняет одновременно структурную и регуляторную функции, участвуя в стабилизации структуры экзополисахарида, а также контролируя содержание в клетке важной сигнальной молекулы –

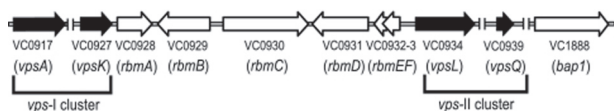


Рис. 2. Генетическая организация локуса хромосомы, содержащего гены *vps* [Fong J.C.N., Yildiz F.H., 2007]

вторичного мессенжера 3',5'-циклического дигуанинмонофосфата или c-di-GMP [21].

Позитивными регуляторами транскрипции генов *vps* являются белки VpsR (от англ. *Vibrio polysaccharide regulator*) и VpsT, которые гомологичны белкам двухкомпонентных регуляторных систем (рис. 3). Кроме генов *vps*, белок VpsR позитивно контролирует экспрессию еще 118 белков и репрессирует 173, причем функция половины из них не изучена. Данный белок принадлежит к транскрипционным регуляторам семейства NtrC, для которых характерно взаимодействие с альтернативными сигма факторами [14, 36, 48, 49]. При активации транскрипции генов *vps* белок VpsR взаимодействует с альтернативным сигма-фактором σ^{54} или белком RpoN, который сам выполняет роль глобального регулятора, так как контролирует транскрипцию более 20 % генов холерного вибриона. Установлено, что в ругозных вариантах RpoN позитивно регулирует транскрипцию 379 генов и негативно – 429 [26, 48, 49]. Экспрессия VpsR позитивно контролируется еще одним глобальным белком-регулятором – CRP (от англ. cyclic AMP receptor protein) [27]. Белки VpsR и VpsT являются не только позитивными регуляторами продукции экзополисахарида, но и белков, например RbmA, а также позитивно контролируют собственную транскрипцию (рис. 3) [49].

В 2004 г. F.H.Yildiz и соавторы высказали предположение, что регуляторная система, участвующая в синтезе экзополисахарида и формировании биопленки, функционирует не только при нахождении холерного вибриона во внешней среде, но и в организме человека и взаимосвязана с системой, контролирующей продукцию факторов патогенности (рис. 3). Впоследствии и другие исследователи, подтвердили данное предположение. B.W.Lim и со-

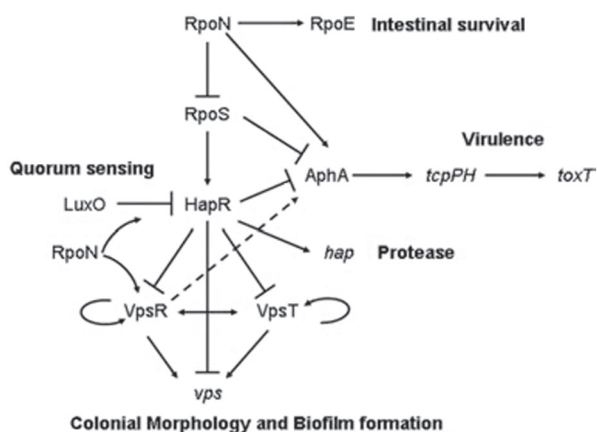


Рис. 3. Схема регуляторной сети *V. cholerae*, контролирующей экспрессию генов вирулентности и *vps* [Yildiz F.H. et al., 2004]

авторы [28], установили, что c-di-GMP, являющийся положительным регулятором транскрипции генов *vps* и увеличивающий синтез экзополисахарида и формирование биопленки, контролирует также продукцию факторов вирулентности у *V. cholerae*. Как известно, синтез и деградация c-di-GMP в клетках микроорганизмов контролируется белками с дигуанилат циклазной (DGC) и фосфодиэстеразной активностью (PDE) и содержащих соответственно GGDEF и EAL домены. У холерного вибриона в настоящее время выявлено 72 белка, обладающих данными активностями, синтез 7 из которых увеличен в ругозных вариантах [11, 17, 28, 29, 41, 50]. Первым идентифицированным белком, положительно контролирующим продукцию ругозного экзополисахарида посредством регуляции содержания c-di-GMP в клетках, был белок RocS (от англ. regulation of cell signaling). Данный белок содержит оба GGDEF и EAL домена и регулирует у *V. cholerae* не только продукцию EPS, но и подвижность [8, 36]. В 2010 г. исследования, проведенные M.Yang и соавт., показали, что важный белок регуляторного каскада – AphA (рис. 3), участвующий в активации транскрипции генов вирулентности, является в то же время и положительным регулятором гена *vpsT* [46].

Кроме позитивных, существуют и негативные регуляторы генов *vps* – белки CytR, RpoS и HapR. Белок CytR контролирует экспрессию генов, участвующих в катаболизме нуклеотидов. При мутации в гене *cytR* увеличивается уровень нуклеотидов, что является сигналом для планктонных клеток к формированию биопленки и синтезу экзополисахарида. Белок RpoS (альтернативный сигма фактор σ^s) участвует в адаптации бактерий к различным стрессам, контролируя экспрессию большого количества генов в экспоненциальной и стационарной фазах роста. В том числе RpoS негативно регулирует экспрессию VpsT, но позитивно HapR, что приводит к снижению синтеза экзополисахарида [24, 49]. Транскрипционный регулятор HapR является центральным белком-регулятором в системе «quorum sensing» (QS), в которой координированная экспрессия различных генов зависит от плотности клеточной популяции и синтеза особых сигнальных молекул – аутоиндукторов. Методом транспозонного мутагенеза было показано, что HapR негативно регулирует формирование ругозных вариантов эльтор вибрионов, репрессируя продукцию и секрецию экзополисахарида. Причем, HapR, с одной стороны, уменьшает экспрессию генов *vps*, непосредственно блокируя промотор генов *vpsI* и уменьшая экспрессию *vpsR* и *vpsT* (рис. 3), а с другой – увеличивает экспрессию негативного регулятора *cytR* [23, 33, 49, 52]. Недавно установлено, что HapR также является непосредственным негативным регулятором транскрипции гена *cdgA*, кодирующего белок с дигуанилат циклазной активностью. В *hapR* мутантах продукция белка CdgA увеличена, что приводит к повышению концентрации c-di-GMP и стимулирует

процесс формирования ругозных колоний [11, 43].

Предполагается, что смена морфологии колоний от гладких к ругозным и наоборот является следствием изменения регуляторных процессов под влиянием определенных сигналов внешней среды, в том числе голодания. В то же время изменения pH и осмолярности не оказывают влияние на данный процесс [9]. Методом транспозонного мутагенеза между гладкими и ругозными вариантами выявлена дифференциальная экспрессия 124 генов, из которых в ругозных вариантах индуцируется 77 и репрессируется 47. Все обнаруженные гены объединены в один регуляторный сет, обозначенный как *S/R-pvr* (от англ. smooth-to-rugose phase variation regulated gene). В связи с тем, что для формирования ругозных колоний необходима продукция экзополисахарида, у данных вариантов обнаружена повышенная экспрессия генов *vps* оперона. При этом важная роль принадлежит генам *vpsA* из первого кластера и *vpsL* из второго, кодирующих продукцию ферментов, участвующих в биосинтезе полисахаридов. При мутации в этих генах бактерии формируют гладкие колонии [48, 49]. Необходимо отметить, что *S/R-pvr* гены участвуют не только в фазовых вариациях «гладкие-ругозные», но и в выполнении других функций клетки – формировании биопленки, регулировании подвижности, изменении гидрофобности поверхности и т.д. [27, 49]. Так, например, в ругозных вариантах увеличена продукция белков, входящих в систему секреции II типа и кодируемых *eps* (от англ. extracellular protein secretion) опероном. Как известно, через систему секреции II типа транспортируются холерный токсин, растворимая гемагглютинин/протеаза, хитиназа, нейрамидаза, липаза, белки внешней мембраны и т.д. [39, 49]. Для формирования ругозных колоний особенно необходима экспрессия двух генов секреторной системы – *epsD* и *epsE*, кодирующих соответственно белок-порин, участвующий в формировании пор во внешней мембране, и АТФ-азу, ответственную за энергетические процессы [6].

Таким образом, механизмы адаптации эльтор вибрионов во внешней среде, связанные с повышенной продукцией экзополисахарида и способностью к формированию биопленки и ругозных вариантов, изучены достаточно подробно. Однако, несмотря на широкое распространение эльтор вибрионов, классические вибрионы не исчезли совсем. Они выделялись в Бангладеш в 1979–1981 гг., а в 1982 г. вызвали большую вспышку холеры в данном регионе. В 2006 г. классические вибрионы наряду с эльтор были выделены в Ираке из реки Куфа. В настоящее время в разных регионах мира обнаружены штаммы *V. cholerae* *eltor*, содержащие в геноме профага СТХ классического типа. Как известно, в состав данного профага входят гены *ctxAB*, кодирующие продукцию холерного токсина, который является одним из ключевых факторов вирулентности и отвечает за развитие диареи. Данные штаммы продуцируют холерный токсин первого типа (классического) и отличаются

повышенной вирулентностью, что выражается в увеличении числа спорадических случаев холеры и утяжелении клиники заболевания. Предполагается, что приобретение генома фага СТХ классического биовара могло произойти в процессе трансформации при нахождении эльтор вибрионов на хитиновом субстрате в составе биопленки во внешней среде [5, 10, 22, 30, 38]. Принято считать, что холерные вибрионы классического биовара образуют естественный резервуар генов вирулентности. Однако механизмы, способствующие выживанию *V. cholerae* классического биовара во внешней среде, почти не изучены. К тому же, учитывая, что процент выделения ругозных вариантов эльтор вибрионов из водоемов даже на эндемичной по холере территории (Бангладеш) довольно низкий (3,5 %) [17], можно предположить, что существуют и другие механизмы, способствующие адаптации *V. cholerae* во внешней среде.

Выявление и фенотипический анализ клонов *V. cholerae* классического биовара с координированной продукцией экзополисахарида и факторов патогенности

Нами при изучении популяционного состава 105 природных штаммов холерного вибриона классического биовара было обнаружено 25 штаммов (23,8 %), в популяции которых присутствовали мутные (опалесцирующие) колонии в S форме. Выявленные варианты согласно данным литературы были обозначены как О (от англ. opaque) в отличие от типичных Т (от англ. translucent) колоний. При дальнейшем изучении Т и О клонов классических вибрионов было обнаружено 12 штаммов, у которых варибельность морфологии колоний сопровождалась изменением продукции 2–3 факторов вирулентности. Наибольшее внимание привлекли 4 штамма (*V. cholerae* 9361, Дакка 35, В-1307, 49520), у которых два варианта колоний четко отличались друг от друга по трем фенотипическим признакам – продукции холерного токсина, растворимой гемагглютинин/протеазы, а также подвижности. О варианты были менее токсигенны, чем Т клоны, продуцировали большее количество растворимой гемагглютинин/протеазы и были более подвижными. Как известно, растворимая гемагглютинин/протеаза и подвижность необходимы как для патогенеза, так и для выживания холерного вибриона во внешней среде [16, 44]. Необходимо отметить, что О колонии в штаммах холерного вибриона исследователи обнаруживали и ранее. При этом было выявлено, что Т и О варианты эльтор вибрионов отличались по вирулентности и продукции гемолизина [3, 4, 18]. В то же время сведения о свойствах О вариантов классических вибрионов отсутствовали, не были установлены также поверхностные структуры, участвующие в изменении морфологии колоний О вариантов, не выявлены сигналы внешней среды, способствующие появлению О вариантов классических вибрионов, и не изучена их биологическая функция.

Для установления причины изменения морфологии колоний в штаммах холерного вибриона проведено электронно-микроскопическое и биохимическое изучение двух вариантов модельного штамма *V. cholerae* Дакка 35 классического биовара. В результате было установлено, что изменение морфологии колоний у О клонов связано с синтезом дополнительного экзополисахаридного слоя [1]. Изучение моносахаридного состава экзополисахарида методом тонкослойной хроматографии показало наличие в нем рамнозы, глюкозы, галактозы, гексозамина. Сравнение состава EPS классических вибрионов с эльтор выявило, что в составе EPS ругозных колоний штаммов *V. cholerae* биовара эльтор входят также глюкозамин и манноза [47], не обнаруженные в EPS классических вибрионов. Для выяснения функциональной роли экзополисахарида был проведен сравнительный анализ резистентности О и Т клонов к действию неблагоприятных факторов внешней среды, в качестве которых использовались высокие концентрации соли (2,5 М раствор NaCl) и перекиси водорода (20 мМ). В результате было обнаружено, что О варианты более устойчивы к действию осмотического и окислительного стрессов по сравнению с Т клонами. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы и подтверждают, что синтез экзополисахарида на поверхности клеток холерного вибриона способствует их устойчивости к действию этих факторов [8].

Поскольку у холерных вибрионов координированная экспрессия факторов вирулентности и персистенции контролируется несколькими глобальными регуляторными системами, то изменение активности данных генов может сопровождаться изменением уровня экспрессии генов, кодирующих белки с другими функциями. В этой связи проведен двумерный форе́з белковых экстрактов клеток двух фенотипически разных вариантов штамма *V. cholerae* Дакка 35. При сопоставлении протеомных профилей обнаружена дифференциальная экспрессия 57 различных белков, из которых в О клетках репрессировался синтез 26 белков и индуцировался синтез 31. При этом в продуцирующих экзополисахарид О вариантах выявлена повышенная экспрессия мембранных – OmpU и TolC и цитоплазматических – с метилтрансферазной и антиоксидантной активностью белков, обеспечивающих защиту клетки от воздействия неблагоприятных факторов внешней среды [2].

При выявлении сигналов внешней среды, способствующих повышению экспрессии экзополисахарида, а также изменению других свойств клеток в штаммах холерного вибриона классического биовара, было установлено, что только при культивировании на средах с pH 9,0 в популяции Т вариантов с частотой 80–85 % происходило появление клонов с координированным изменением уровня экспрессии генов, определяющих продукцию экзополисахарида, холерного токсина, растворимой гемагглютинин/протеазы, а также подвижности, что приводило к смене

их фенотипа. Из этого следует, что pH окружающей среды является одним из сигналов, вызывающих переключение активности данных генов. Необходимо отметить, что водоемы с подобной щелочной реакцией среды во множестве присутствуют на эндемичной по холере территории, где и обнаруживаются классические вибрионы [25].

При проведении модельных экспериментов по изучению популяционного состава Т клонов модельного штамма после их пребывания в неблагоприятных условиях внешней среды и О клонов после пребывания в организме крольчат-сосунков было установлено, что биологическая функция выявленного одновременного изменения нескольких свойств холерного вибриона классического биовара заключается, по-видимому, в том, что благодаря работе переключающего механизма популяция вибрионов получает возможность сохраняться при изменении окружающих ее условий. Поскольку О клетки штамма Дакка 35 продуцируют такие факторы персистенции, как экзополисахарид и белок OmpU, именно это тип клонов должен, по-видимому, доминировать в популяции Т вариантов при попадании их во внешнюю среду. В организме чувствительного животного селективное преимущество должны иметь клетки, продуцирующие основной фактор вирулентности – холерный токсин, т.е. Т варианты. Действительно, изучение популяционного состава Т клона, находившегося в течение 6 сут в 0,9 % растворе натрия хлорида при комнатной температуре, показало, что среди 96 проверенных изолированных колоний у 54 (или 56,3 %) одновременно снизился синтез холерного токсина в 2,5–10 раз, но возросла продукция растворимой гемагглютинин/протеазы и экзополисахарида, а также увеличилась подвижность. В то же время изучение популяционного состава О клонов после их пребывания в тонком и толстом кишечнике кроликов-сосунков в течение 24–48 ч показало, что среди 775 изолированных колоний, полученных после посева содержимого кишечника на плотные среды, 50,8 % колоний стали продуцировать холерный токсин, и у них снизилась подвижность. Кроме того, фенотип 47 колоний (что составляет 6,0 % от общего числа проверенных колоний) был сходен с таковым Т клонов. Эти данные показывают, что смена популяционного состава модельного штамма Дакка 35 действительно определяется различными факторами окружающей среды. Кроме того, обнаруженные нами в популяции холерных вибрионов клоны, не продуцирующие холерный токсин, но имеющие высокий уровень биосинтеза экзополисахарида и растворимой гемагглютинин/протеазы, содержат в хромосоме весь набор ключевых генов вирулентности, т.е. по своему генотипу они не отличались от эпидемически опасных штаммов. Обнаружение таких штаммов в окружающей среде может служить указанием на возможность эпидемических осложнений, поскольку при их попадании в организм человека состав

популяций может достаточно быстро измениться вследствие селективного отбора в макроорганизме клонов, продуцирующих основные факторы вирулентности.

Таким образом, можно предположить, что нами обнаружен новый механизм, способствующий повышению адаптационных свойств клеток холерного вибриона классического биовара при попадании из организма хозяина во внешнюю среду, заключающийся в координированном уменьшении под действием определенных сигналов продукции холерного токсина, но увеличении синтеза экзополисахарида и других факторов персистенции. Возможно, благодаря работе данного переключающего механизма, популяция штаммов *V. cholerae* классического биовара получает возможность сохраняться во внешней среде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заднова С.П., Топорков А.В., Исаев Н.Д. Фенотипический анализ штамма *Vibrio cholerae* Дакка 35 Огава, имеющего гетерогенную популяцию. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2004; 3:86–8.
2. Заднова С.П., Исаев Н.Д., Кутейкин-Тепляков К.Б., Тихонова О.В., Торопыгин И.Ю., Арчаков А.И., Смирнова Н.И. Протеомный анализ двух изолированных вариантов *Vibrio cholerae* классического биовара с альтернативной экспрессией генов вирулентности. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2006; 3:11–6.
3. Милютин В.Н., Дрозжевкина М.С., Ломов Ю.М., Ураева В.С., Либинзон А.Е., Подосинникова Л.С. Механизмы и диапазон изменчивости холерных вибрионов. Ростов н/Д: Ростовское книжное изд-во; 1981. 176 с.
4. Смирнова Н.И., Давыдова Н.И., Ливанова Л.Ф. Картирование генетического детерминанта, определяющего повышенный синтез холерного токсина штамма *Vibrio cholerae* Дакка 35. Мол. генет. микробиол. и вирусол. 1994; 2:25–28.
5. Смирнова Н.И., Челдышева Н.Б., Горьев А.А., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Эволюция генома *Vibrio cholerae*: пути формирования атипичных штаммов. Пробл. особо опасных инф. 2008; 3(97):3–12.
6. Ali A., Johnson J.A., Franco A.A., Metzger D.J., Connell T.D., Morris J.G., Sozhamannan S. Mutations in the extracellular protein secretion pathway genes (*eps*) interfere with rugose polysaccharide production in and motility of *Vibrio cholerae*. Infect. Immun. 2000a; 68:1967–74.
7. Ali A., Mahmud Z.H., Morris J.G., Sozhamannan S., Johnson J.A. Sequence analysis of *TnpA* insertion sites in *Vibrio cholerae* mutants defective in rugose polysaccharide production. Infect. Immun. 2000b; 68:6857–64.
8. Ali A., Rashid M.H., Karaolis D.K.R. High-frequency rugose exopolysaccharide production by *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol. 2002; 68:5773–8.
9. Ali A., Morris J.G., Johnson J.A. Sugars inhibit expression of the rugose phenotype of *Vibrio cholerae*. J. Clin. Microbiol. 2005; 43:1426–9.
10. Al-Radhi A.A., Neama J.K., Dosh N.A. Catch up of classical and El-Tor *Vibrio cholerae* from Kufa river during disappearance of cholera in middle Euphrates area, Iraq. The second conference on the Biology of Vibrios «Vibrio 2007», 28 November – 1 December 2007 Institut Pasteur, Paris, France. Abstract book. Organizing committee D.Mazel, D.Gevers., F.Thompson. France; 2007. P98. P. 136.
11. Beyhan S., Yildiz F.H. Smooth to rugose phase variation in *Vibrio cholerae* can be mediated by a single nucleotide change that targets c-di-GMP signaling pathway. Mol. Microbiol. 2007; 63:995–1007.
12. Beyhan S., Bilecen K., Salama S.R., Casper-Lindley C., Yildiz F.H. Regulation of rugosity and biofilm formation in *Vibrio cholerae*: comparison of *VpsT* and *VpsR* regulons and epistasis analysis of *vpsT*, *vpsR*, and *hapR*. J. Bacteriol. 2007; 189:388–402.
13. Bomchil N., Watnick P., Kolter R. Identification and characterization of a *Vibrio cholerae* gene, *mbaA*, involved in maintenance of biofilm architecture. J. Bacteriol. 2003; 185:1384–90.
14. Casper-Lindley C., Yildiz F.H. *VpsT* is a transcriptional regulator required for expression of *vps* biosynthesis genes and the development of rugose colonial morphology in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. J. Bacteriol. 2004; 186:1574–8.
15. Crutchley M.J. Rugose forms of an El Tor vibrio. J. Gen. Microbiol. 1968; 50(3):7.
16. Epstein P.R., Ford T.E., Colwell R.R. Marine ecosystems. Lancet. 1993; 342:1216–9.
17. Faruque S.M., Nair G.B. *Vibrio cholerae* genomics and molecular biology. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2008. P. 111–21.
18. Finkelstein R.A., Boesman-Finkelstein M., Chang Y., Häse C.C. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease, colonial variation, virulence and detachment. Infect. Immun. 1992; 60:472–8.
19. Fong J.C.N., Yildiz F.H. The *rbmBCDEF* gene cluster modulates development of rugose colony morphology and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol. 2007; 189:2319–30.
20. Grau B.L., Henk M.C., Garrison K.L., Oliver B.J., Schulz R.M., O'Reilly K.L., Pettis G.S. Further characterization of *Vibrio vulnificus* rugose variants and identification of a capsular and rugose exopolysaccharide gene cluster. Infect. Immun. 2008; 76:1485–97.
21. Fong J.C.N., Karplus K., Schoolnik G.K., Yildiz F.H. Identification and characterization of RbmA, a novel protein required for the development of rugose colony morphology and biofilm structure in *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol. 2006; 188:1049–59.
22. Halder K., Das B., Nair G.B., Bhadra R.K. Molecular evidence favouring step-wise evolution of Mozambique *Vibrio cholerae* O1 El Tor hybrid strain. Microbiology. 2010; 156:99–107.
23. Hammer B.K., Bassler B.L. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. Mol. Microbiol. 2003; 50:101–4.
24. Haugo A.J., Watnick P.I. *Vibrio cholerae* CytR is a repressor of biofilm development. Mol. Microbiol. 2002; 45:471–83.
25. Huq A., Sack R.B., Nizam A., Longini I.M., Nair G.B., Ali A. et al. Critical factors influencing the occurrence of *Vibrio cholerae* in the environment of Bangladesh. Appl. Environ. Microbiol. 2005; 56:2370–3.
26. Klose K.E., Novik V., Mekalanos J.J. Identification of multiple sigma54-dependent transcriptional activators in *Vibrio cholerae*. Bacteriol. 1998; 180:5256–9.
27. Liang W., Silva A.J., Benitez J.A. The cyclic AMP receptor protein modulates colonial morphology in *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol. 2007; 73:7482–7.
28. Lim B., Beyhan S., Meir J., Yildiz F.H. Cyclic-diGMP signal transduction systems in *Vibrio cholerae*: modulation of rugosity and biofilm formation. Mol. Microbiol. 2006; 60:331–48.
29. Lim B., Beyhan S., Yildiz F.H. Regulation of *Vibrio* polysaccharide synthesis and virulence factor production by CdgC, a GGDEF-EAL domain protein, in *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol. 2007; 189:717–29.
30. Nair G.B., Faruque Sh.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. J. Clin. Microbiol. 2002; 40:3296–9.
31. Matz C., McDougald D., Moreno A.M., Yung P.Y., Yildiz F.H., Kjelleberg S. Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae*. Proc Natl. Acad. Sci. USA. 2005; 102:16819–24.
32. McCarter L.L., OpaR, a homolog of *Vibrio harveyi* LuxR, controls opacity of *Vibrio parahaemolyticus*. J. Bacteriol. 1998; 180:3166–73.
33. Miller M.B., Skorupski K., Lenz D.H., Taylor R.K., Bassler B.L. Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. Cell. 2002; 110:303–14.
34. Mizunoe Y., Wai S.N., Takade A., Yoshida S.I. Isolation and characterization of rugose form of *Vibrio cholerae* O139 strain MO10. Infect. Immun. 1999; 67:958–63.
35. Morris J.G., Szein M.B., Rice E.W., Natano J.P., Losonsky G.A., Panigrahi P., Tacket C.O., Johnson J.A. *Vibrio cholerae* O1 can assume a chlorine-resistant rugose survival form that is virulent for humans. J. Infect. Dis. 1996; 174:1364–8.
36. Rashid M.H., Rajanna C., Ali A., Karaolis D.K. Identification of genes involved in the switch between the smooth and rugose phenotypes of *Vibrio cholerae*. FEMS Microbiol. Lett. 2003; 227:113–9.
37. Rice E.W., Johnson C.H., Clark R.M., Fox K.R., Reasoner D.J., Dunnigan M.E., Panigrahi P., Johnson J.A., Morris J.S. Chlorine and survival of “rugose” *Vibrio cholerae*. Lancet. 1992; 340:740.
38. Samadi A.R., Hug M.I., Shahid N., Khan M.U., Eusde A., Rahman A.S.M.M., Yunus M., Faruque A.S.G. Classical *Vibrio cholerae* biotype displaces El Tor in Bangladesh. Lancet. 1983:805–7.
39. Sandkvist M. Biology of type II secretion. Mol. Microbiol. 2001; 40:271–83.
40. Schauder S., Shokat K., Surette M.G., Bassler B.L. The LuxS family of bacterial autoinducers: biosynthesis of a novel quorum-sensing signal molecule. Mol. Microbiol. 2001; 41:463–76.
41. Tamayo R., Schild S., Pratt J.T., Camilli A. Role of cyclic di-GMP during El Tor biotype *Vibrio cholerae* infection: characterization of the in vivo-induced cyclic di-GMP phosphodiesterase CdpA. Infect. Immun. 2008; 76:1617–27.
42. Wai S.N., Mizunoe Y., Takade A., Kawabata S.I., Yoshida S.I. *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 produces the exopolysaccharide material that determine colony morphology, stress resistance, and biofilm formation. Appl. Environ. Microbiol. 1998; 64:3648–55.
43. Waters C.M., Lu W., Rabinowitz J.D., Bassler B.L. Quorum

S.P.Zadnova, N.I.Smirnova

The Role of Extracellular Exopolysaccharide in Cholera Agent Adaptation in the Environment

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

The review presents literary data as regards the role of extracellular exopolysaccharide in formation of morphologically altered rugose variants of cholera vibrio. These variants differ by greater resistance to unfavorable factors of the environment as well as genetic control of synthesis of rugose exopolysaccharide. Besides, presented are authors' experimental data on detection of the clones with altered colony morphology (opaque) in the population of *Vibrio cholerae* of classical biovar. They appeared as a result of production of extracellular exopolysaccharide and coordinated alteration of synthesis of some vital pathogenicity factors (cholera toxin, soluble hemagglutinin/protease, motility). The data received suggest that revealed is new mechanism of classical cholera vibrios adaptation at a change of environmental conditions.

Key words: *Vibrio cholerae*, rugose variants, exopolysaccharide, adaptation.

Об авторах:

Заднова С.П., Смирнова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Zadnova S.P., Smirnova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 31.03.10.

sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic di-GMP levels and repression of *vpsT*. J. Bacteriol. 2008; 190:2527–36.

44. Watnick P.I., Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. Mol. Microbiol. 1999; 34:586–95.

45. Watnick P.I., Lauriano C.M., Klose K.E., Croal L., Kolter R. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. Mol. Microbiol. 2001; 39:223–35.

46. Yang M., Frey E.M., Liu Z., Bishar R., Zhu J. The virulence transcriptional activator AphA enhances biofilm formation by *Vibrio cholerae* by activating expression of the biofilm regulator VpsT. Infect. Immun. 2010; 78:697–703.

47. Yildiz F.H., Schoolnik G.K. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999; 96:4028–33.

48. Yildiz F.H., Dolganov N.A., Schoolnik G.K. VpsR, a member of the response regulators of the two-component regulatory systems, is required for expression of *vps* biosynthesis genes and EPS (Etr)-associated phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. J. Bacteriol. 2001; 183:1716–26.

49. Yildiz F.H., Lie X.S., Heydorn A., Schoolnik G.K. Molecular analysis of rugosity in a *Vibrio cholerae* O1 El Tor phase variant. Mol. Microbiol. 2004; 53:497–515.

50. Yildiz F.H., Visick K.L. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. Trends Microbiol. 2009; 17:109–18.

51. Zhu J., Miller M.B., Vance R.E., Dziejman M., Bassler B.L., Mekalanos J.J. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002; 99:3129–34.

52. Zhu J., Mekalanos J.J. Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*. Dev. Cell. 2003; 5:647–56.

Ю.А.Попов, Н.И.Микшис

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ (ДНК) ВАКЦИНЫ

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

Развитие различных отраслей медицины и биологии изменяет традиционные представления о средствах профилактики инфекционных болезней. В настоящее время во многих странах мира интенсивно ведутся разработки в области генетических вакцин. Отличительной особенностью ДНК-вакцинации является длительная экспрессия в цитоплазме эукариотической клетки нуклеиновых кислот, кодирующих синтез иммуногенных белков. Генетические вакцины индуцируют как гуморальный, так и клеточный ответы с образованием большого пула клеток иммунологической памяти. В обзоре рассматриваются вопросы, касающиеся особенностей генно-инженерного конструирования и переноса ДНК-вакцин в клетки макроорганизма, структуры ДНК-вакцин, механизмов возникновения иммунного ответа, уделяется внимание проблемам безопасности геновакцинации и поиску путей повышения ее эффективности.

Ключевые слова: вакцины, ДНК-вакцины, геновакцинация, иммунный ответ.

В последнее десятилетие второго тысячелетия в области разработки и усовершенствования вакцин появилась неординарная идея, с реализацией которой связывают большие надежды на повышение эффективности профилактики не только инфекционных заболеваний бактериальной, вирусной и паразитарной этиологии, но и аллергических, аутоиммунных и даже онкологических болезней. Обнаружено, что развитие адаптивного иммунитета возможно не только в ответ на введение аттенуированных, инактивированных микроорганизмов или изолированных протективных антигенов, но и «голой» (naked) ДНК со встроенными генами, детерминирующими синтез иммуногенных молекул. J.Wolff и Ph.Felgner зарегистрировали экспрессию измеримых количеств белка при инъекции в ткани мыши, кодирующих его синтез нуклеотидных последовательностей, находящихся под сильным промотором цитомегаловируса [37]. Доставку ДНК в макроорганизм первоначально осуществляли в комплексе с катионными липидами, однако эффект от введения препарата чистой нуклеиновой кислоты оказался более выраженным.

Пионерскими исследованиями, определяющими точку отсчета ДНК-вакцинологии, следует считать работу D.Tang *et al.*, показавшую способность плазмидной ДНК, детерминирующей экспрессию гормона роста человека, индуцировать выработку антител, преимущественно IgG и IgE [30], а также исследование J.Ulmer *et al.*, продемонстрировавшее формирование приобретенного иммунитета, в частности образование цитотоксических лимфоцитов, после внутримышечного введения плазмид, кодирующих нуклеопротеин вируса гриппа [31].

Генетические вакцины представляют собой генно-инженерные конструкции, состоящие из молекул ДНК (или их фрагментов), содержащих детерминанты синтеза иммуногенных молекул (или их частей). При введении генетической вакцины в клетки и ткани эукариотических организмов осуществляется сопряженная транскрипция/трансляция струк-

турных генов и индукция иммунного ответа. Более широко используемый термин «ДНК-вакцина», на наш взгляд, менее точен, поскольку молекулой, вызывающей иммунный ответ является не нуклеиновая кислота, хотя она и обладает иммуногенными свойствами. К тому же, генетические вакцины можно получать и на основе РНК. В частности, РНК-вакцины разрабатывались для профилактики СПИДа [10]. Подобные препараты не имеют бластогенного эффекта, но лабильны, дороги и вызывают кратковременный иммунитет [2]. Несмотря на некоторую условность термина «ДНК-вакцина», он остается наиболее употребляемым.

Первая конференция по ДНК-вакцинам в 1995 г. прошла с большим энтузиазмом и надеждой на то, что новая методология революционизирует получение вакцин нового поколения [32]. В 1997 г. были разработаны рекомендации ВОЗ по созданию и контролю ДНК-вакцин. Содержащиеся в них положения получили развитие в различных методических пособиях, описывающих способы очистки сверхскрученной плазмидной ДНК, в том числе организованные в соответствии с требованиями GMP технологические линии, особенности лиофилизации препаратов и другие аспекты конструирования и использования генетических вакцин [7, 28].

В состав ДНК-вакцин входят: фрагмент векторной молекулы ДНК, содержащий участок инициации репликации в бактериальной клетке; интронная последовательность, стимулирующая транскрипцию гена в эукариотических клетках; линкер, содержащий сайты рестрикции для встраивания чужеродной информации; сигнал полиаденилирования; сильный промотор; встроенный ген, кодирующий целевой белок.

Средствами доставки ДНК-вакцин в ткани эукариот являются плазмидные векторы или вирусные геномы. Пример плазмидных векторов – производные серии рUC. Из числа вирусных векторов, обеспечивающих более высокий уровень экспрессии целевого антигена [20], чаще всего используются дефектный

по репликации аденовирус серотипа 5 и ортопоксвирусы, как правило, модифицированные вирусы осповакцины. Аденовирусный вектор обладает высокой эффективностью трансфекции – до 100 %, в него можно включать до 8 kb генетического материала. Отрицательный момент – синтез собственных белков, способных индуцировать иммунный ответ. Исправить этот недостаток можно, в частности, покрытием аденовирусных карпускул полиэтиленгликолем [26].

Самые используемые осповакцинные модификации – Ankara (MVA) и New York Vaccinia strain (NYVAC). Первая получена в результате 56-кратного пассирования вируса в куриных эмбриональных фибробластах. В этом производном утрачено около 30 kb, что составляет примерно 15 % всей ДНК. В геноме NYVAC делетировано 18 открытых рамок считывания, ассоциированных с диапазоном хозяев и вирулентностью. В каждый из перечисленных векторов можно встроить до 50 kb наследственной информации. Чужеродные белки подвергаются тем же посттрансляционным изменениям, что и в естественной системе. Однако для вирусов осповакцины характерна сильная собственная иммуногенность и, как следствие, снижение иммунного ответа к чужеродным экспрессируемым антигенам. Кроме того, сконструированные на их основе препараты имеют ограничения использования у лиц, страдающих аллергией или иммунодефицитом. В качестве средств доставки ДНК-вакцин могут служить и другие вирусы, например, вирус венесуэльского энцефаломиелита лошадей.

Существуют различные пути переноса генетических вакцин в клетки макроорганизма. Самыми распространенными являются внутримышечные инъекции. Однако следует учитывать, что мышечные клетки слабо экспрессируют продукты генов главных комплексов гистосовместимости (ГКГ) I и II класса, которые необходимы для представления антигена Т-клеткам. Инъекционный способ индуцирует, в основном, воспалительный ответ, поэтому прямая инъекция ДНК в скелетные мышцы малоэффективна. Более высокую иммунологическую эффективность обеспечивают методы электропорации и «генного ружья» [35]. Преимущество электропорации особенно выражено в случаях иммунизации ДНК вакцинами крупных биомоделей [28, 33].

Среди подкожных и внутрикожных способов доставки перспективно внедрение в эпидермальные клетки покрытых молекулами ДНК золотых микрокапсул. Важно, при этом, что для индукции клеточного и гуморального иммунного ответа требуется трансфекция небольшого количества клеток. Введенная таким образом вакцина непосредственно попадает в профессиональные антиген-презентирующие клетки и кератиноциты кожи [6]. С целью повышения эффективности иммунизации путем внутрикожной инъекции предложено использование покрытых поли-L-лизинем наночастиц [24]. Для инфекций дыхатель-

ного, кишечного и мочеполового трактов актуальна доставка ДНК на поверхность слизистых оболочек. Такая вакцинация индуцирует не только системный ответ, но и мукозальный, и приемлема для различных возрастных групп [23]. Введение ДНК-вакцин в воротную или печеночную вену приводит к высокому уровню экспрессии антигена даже у крупных биомоделей – собак и приматов [38].

Свои преимущества есть и у орального пути доставки генетических вакцин. Обычно в этих случаях плазмидную ДНК инкапсулируют в микрокапсулы или бактериальные клетки [14]. Показана способность аттенуированных штаммов сальмонелл, шигелл, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, инвазивных *Escherichia coli* переносить *in vivo* и *in vitro* экспрессирующиеся в эукариотах плазмиды в клетки млекопитающих. При введении препарата *per os* ДНК доставляется непосредственно к иммунитет-индуцирующим сайтам на слизистых оболочках, а в конечном итоге – к антиген-презентирующим клеткам [21, 39]. Получен аттенуированный штамм *Shigella flexneri*, с делецией в гене *asd*. Мутантные бактерии растут *in vitro*, на среде с диаминопимелиновой кислотой, они могут проникать в эукариотические клетки, не размножаясь в них, так как отсутствует упомянутая кислота, и продуцируют плазмид-кодированные антигены [26]. Перспективным вектором для ДНК-вакцин являются микобактерии, персистирующие в макрофагах и обладающие адьювантными свойствами [25].

Недавно предложена оригинальная система доставки ДНК с помощью «теней» – неживых клеток грамотрицательных бактерий, лишенных цитоплазматического содержимого, но сохраняющих морфологию и антигенные структуры, включая адгезивные свойства [34]. «Тени» обладают тропностью к антиген-презентирующим клеткам макроорганизма и адьювантными свойствами, усиливающими иммунный ответ. Кроме того, в лиофильно-высушенном состоянии препараты «теней» хранятся при комнатной температуре неопределенно долгое время и их производство дешево [22].

Механизмы иммунного ответа при генетической вакцинации еще не окончательно выяснены [3]. В трансфицированной эукариотической клетке ген, детерминирующий фактор иммуногенности, экспрессируется длительное время, от нескольких недель до нескольких месяцев, индуцируя развитие адаптивного иммунитета. Характеристики иммунного ответа на введенный обычным образом антиген и синтезирующийся с матрицы ДНК-вакцины отличаются. В частности, ДНК-вакцинация приводит к так называемому Т-хелперному ответу с секрецией интерферона. При обычной иммунизации Т-хелперы секретируют только интерлейкины, но не интерферон. Генетическая вакцина вызывает выработку нейтрализующих антител, Т-хелперный ответ и продукцию цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ). Одновременно генерируется CD4⁺ опосредованная продукция цитокинов

и CD8⁺ Т-клеточный ответ [15]. Предполагают, что ДНК распознается антиген-презентирующими клетками и, проникая внутрь, попадает в условия, способствующие образованию комплексов антигена с продуктами генов ГКГ и представления их Т-хелперам и цитотоксическим Т-лимфоцитам [2, 4].

Существует множество факторов, влияющих на тип иммунного ответа. Например, инъекция ДНК в мышечные ткани вызывает образование Th1 хелперных лимфокинов (ИФγ и ИЛ2) и комплементзависимых антител, а инокуляция в кожу или мышцы при помощи «генного ружья» преимущественно усиливает выработку Th2-хелперных лимфокинов и комплементнезависимых антител [4, 5, 6, 10]. Степень выраженности адаптивного иммунитета зависит не только от способа доставки ДНК-вакцин (внутримышечный, подкожный, внутривенный, интраназальный и т.д.), но и от кратности иммунизаций, доз вводимого препарата и внутриклеточной локализации детерминируемого антигена.

Предложены различные гипотезы возникновения иммунного ответа на введение ДНК-вакцин. Согласно одной из них миоциты, конститутивно экспрессирующие компоненты ГКГ I, индуцируют развитие иммунных реакций с участием CD8⁺ ЦТЛ. На матрице ДНК, проникшей в скелетные мышцы, синтезируются белки, которые процессируются протеосомами и презентуются клеткам иммунной системы. Таким образом, введение ДНК, содержащей гены иммуногенности, моделирует естественную инфекцию, когда белки продуцируются клетками патогенных микроорганизмов. Этот эндогенный белковый синтез приводит к развитию иммунного ответа с участием цитотоксических Т-лимфоцитов путем взаимодействия с молекулами ГКГ I. Параллельно белки высвобождаются во внеклеточное пространство и вызывают индукцию гуморального ответа, так как захватываются антиген-презентирующими клетками, участвующими в иммунном ответе посредством взаимодействия с хелперными Т-лимфоцитами. Но миоциты не вырабатывают важных костимулирующих молекул (CD8, CD4), которые нужны CD8⁺ ЦТЛ для цитотоксического эффекта. Поэтому маловероятно, что миоциты могут эффективно презентовать антиген Т-лимфоцитам.

Две другие гипотезы основаны на участии в иммунном процессе моноцитов/макрофагов или дендритных клеток. Они являются «профессиональными» антиген-презентирующими клетками, поскольку экспрессируют ГКГ I и ГКГ II, а также костимулирующие молекулы. Небольшое количество антиген-презентирующих клеток напрямую трансфицируется ДНК, затем они попадают в региональные лимфатические ткани, где могут активировать CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, а также В-клетки. Эта цепь событий более вероятна при подкожной иммунизации, так как кожа содержит большое число клеток Лангерганса. В мышечной ткани редко встречаются дендритные клетки и моноциты/макрофаги. Предполагают, что при вну-

тримышечном способе иммунизации антиген, синтезированный в миоцитах, попадает в профессиональные антиген-презентирующие клетки, являющиеся участниками воспалительного процесса, в момент инфильтрации мышечной ткани в месте инъекции. В пользу последних двух гипотез свидетельствует тот факт, что антиген-специфические антитела и цитотоксические лимфоциты длительно циркулируют в организме биомоделей.

Генетические вакцины обладают множеством достоинств. В отличие от химических средств специфической профилактики инфекционных заболеваний они индуцируют как гуморальный, так и клеточный ответы с образованием большого пула клеток иммунологической памяти. При использовании генетических вакцин отсутствует присущий живым вакцинам риск реверсии вирулентности. Важно, что технология конструирования ДНК-вакцин позволяет сочетать в одном поливалентном препарате детерминанты, кодирующие синтез различных гомо- и гетерологичных антигенов. Кроме того, существует возможность модификации генов путем сайт-специфического мутагенеза. Достоинством ДНК-вакцин является также рентабельность их производства. Дешевизна конечного продукта обусловлена относительной простотой конструирования рекомбинантной ДНК и технологичностью ее накопления. К преимуществам относится и устойчивость подобных препаратов к воздействию неблагоприятных факторов. Термостабильность ДНК-вакцин обеспечивает сохранение биологической активности в отсутствие «холодовой» цепи. Генетические вакцины эффективны при различных способах введения, в том числе в случае применения *per os*.

Наряду с перечисленными положительными моментами, ДНК-вакцинация вызывает небезосновательные сомнения в ее эффективности особенно при экстраполяции на крупных млекопитающих и человека [18]. Так, для получения напряженного иммунитета в ряде случаев требуется дополнительная одно- или двукратная иммунизация лабораторных животных препаратами белков, кодируемых ДНК-вакциной. До сих пор не решена проблема эффективной доставки ДНК-вакцин в антигенпрезентирующие клетки. Нельзя исключить атипичный процессинг бактериальных антигенов в клетках эукариот. Недостатком вакцинации с применением вирусных систем доставки является также ослабление иммунного ответа на целевой антиген за счет активности обладающих иммуногенностью вирусных белков.

Тот факт, что ДНК-препараты уступают в эффективности живым вакцинам [8, 26], поддерживает интерес ученых к поиску путей усиления иммунного ответа на геновакцинацию. Один из перспективных подходов – разработка оптимальных систем доставки ДНК и подбор адъювантов. Как правило, с этой целью используют эмульсии, липосомы, липоспермин и микрочастицы других веществ, нейтрализующих заряд и стимулирующих трансмембранный перенос.

Возможен выбор из иммуностимуляторов – липополисахарид, монофосфорилипиды, мурамилпептиды, флагеллины, хитозан. Хорошо зарекомендовали себя такие вещества, как левамизол, интерферон-гамма, локальный анестетик бапивакаин, а также коинъектируемый с ДНК поливинилпирролидон [27]. Показано усиление эффекта геновакцинации за счет применения микрочастиц полилактид-ко-гликолипида, увеличивающих поглощение антигена и его процессинг [13]. Недавно установлено, что CpG-участки молекул ДНК могут до 500 раз ускорять и усиливать выработку антиген-специфических антител [17, 19]. Неметилованные CpG-мотивы, названные иммуностимулирующими последовательностями, способствуют продукции Т1-хелперов и провоспалительных цитокинов, а также индуцируют созревание и активацию профессиональных антиген-презентирующих клеток. Предлагается искусственно обогащать векторные плазмидные ДНК CpG-мотивами [36].

Для усиления иммуногенного действия используют совместное введение ДНК-вакцин и плазмид, экспрессирующих цитокины, хемокины и другие иммуностимуляторные молекулы, например, ИЛ-12 и ИЛ-15 [11]. Предложен специальный термин «генетические адъюванты», то есть векторы, экспрессирующие гены цитокинов или хемокинов [9]. В последние годы большое внимание уделяется усилению вакцинирующего эффекта при помощи прайминг-бустерных систем. В одних случаях для первичной иммунизации и бустирования используются гетерологичные векторы, кодирующие одни и те же целевые антигены, в других – ДНК-вакцинацию «поддерживают» иммунизацией белковым препаратом [5, 16]. Оригинальный подход к повышению эффективности геновакцинации – направленные модификации кодонов для усиления транскрипции/трансляции.

Необходимо отметить, что разработка и внедрение ДНК-вакцин сталкиваются с серьезной проблемой обеспечения безопасности. До сих пор остаются неизученными те последствия, к которым приводит длительная экспрессия в макроорганизме чужеродной генетической информации. Не получено однозначного ответа на вопрос, может ли введенная ДНК встраиваться в геном клетки человека и вызывать развитие онкологических заболеваний. Несмотря на оптимистичную точку зрения некоторых авторов, считающих риск инсерционного мутагенеза при геновакцинации минимальным ввиду малого количества экзогенной ДНК [10, 29], теоретически не исключена вероятность возникновения нежелательных перестроек и изменений наследственной информации [12]. Кроме того, вследствие пролонгированной экспрессии антигена в макроорганизме возможны неожиданные иммунологические реакции в виде хронических воспалительных процессов или генерализованной иммуносупрессии. В некоторых случаях синтез антител против инъектированной чужеродной ДНК приводит к аутоиммунным реакциям [1]. Дополнительный риск возникает при использовании

генов, кодирующих цитокины или костимулирующие молекулы. Показано, в частности, что избыток цитокинов (IFN- γ , IL-4) стимулирует ответ одних Т-хелперных клеток при явной супрессии других, что провоцирует развитие воспаления. Геновакцинация иногда сопровождается изменениями метаболизма. Например, в крови мышей, иммунизированных экспериментальной ДНК-вакциной против гепатита В, обнаруживались молекулы-биомаркеры, свидетельствующие о стимуляции синтеза в печени сфинголипидов. Доказана способность этих веществ менять структуру циркулирующих липопротеинов и вызывать атерогенез [40].

Несмотря на некоторые недостатки ДНК-вакцин и сомнения по поводу безопасности, потенциальные преимущества их использования очевидны и весьма значительны. Разработки в области генетических вакцин проводятся широко во многих странах мира. В настоящее время сконструированы экспериментальные ДНК-вакцины для профилактики инфекционных заболеваний паразитарной, бактериальной и вирусной природы. В этом перечне присутствуют: туберкулез, хламидиоз, токсоплазмоз, шистосомоз, лейшманиоз, клостридиоз, чума, сибирская язва, а также инфекции, вызванные микоплазмами, боррелиями, стрептококками и пиогенными стафилококками. На разных стадиях доклинических и клинических испытаний находятся генетические вакцины против вирусов гриппа, гепатитов А и В, герпеса, кори, геморрагических лихорадок (в том числе, ГЛПС), ВИЧ, ТОРС, оспы, бешенства, лихорадок Западного Нила, Эбола, Сендай; собачьей чумы, ящура, папилломавирусов, цитомегаловирусов, вируса Коксаки, вирусов, вызывающих небактериальный гастроэнтерит, лимфоцитарный хориоменингит, болезнь Ньюкастла. Столь интенсивное развитие данной отрасли вакцинологии, вероятно, уже в ближайшей перспективе обеспечит реальный выход в виде эффективных и безопасных вакцинных препаратов, рекомендованных для применения в здравоохранении и ветеринарии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гендон Ю.З. Полинуклеотидные (ДНК) вирусные вакцины и проблемы их безопасности. Журн. микробиол. 1997; 1:78–81.
2. Медунцын Н.В. Вакцинология. М.: Медицина; 1999.
3. Савилова А.М., Трофимов Д.Ю., Алексеев Л.П., Хаитов Р.М. ДНК-вакцины: современное состояние и перспективы. Иммунология. 2007; 2:114–23.
4. Ada G. Ramshaw I. DNA vaccination. Expert. Opin. Emerg. Drugs. 2005; 8:27–35.
5. Chen J., Zhang F., Fang F. et al. Vaccination with haemagglutinin or neuraminidase DNA protects BALB/c mice against influenza virus infection in the presence of maternal antibody. BMC Infect. Dis. 2007; 7:118.
6. Dean H. Epidermal delivery of protein and DNA vaccines. Expert. Opin. Drug Deliv. 2005; 2:227–36.
7. DNA Vaccines. Methods and Protocols. In: W. Salzman, H. Shen, J. Brandsma (ed.). Humana Press Inc; 2006.
8. Dzierzbicka K., Kolodziejczyk A. Adjuvants – essential components of new generation vaccines. Postepy Biochem. 2006; 52:204–11.
9. Ertl H., Pasquini S., He Z. et al. Genetic adjuvants. Methods Mol. Med. 1999; 29:251–60.
10. Giri M., Ugen K., Weiner D. DNA Vaccines against human immunodeficiency virus type 1 in the past decade. Clin. Microb. Reviews. 2004. 17(2):370–89.

11. Halwany R., Boyer J., Yassine-Diab B. et al. Therapeutical vaccination with simian immunodeficiency virus DNA + IL 12 or IL 15 induces distinct CD8 memory subsets in SIV-infected macaques. *J. Immunol.* 2008; 180:7969–79.
12. Hanke T. On DNA vaccines and prolonged expression of immunogens. *Eur. J. Immunol.* 2006; 36:806–9.
13. Helson R., Olszewska W., Singh M. Polylactide-co-glycolipid microparticles modify the immune response to DNA vaccination. *Vaccine.* 2008; 26:753–61.
14. Hermann J.E. DNA vaccines against enteric infections. *Vaccine.* 2005; 24:3705–8.
15. Howarth M., Elliott T. The processing of antigens delivered as DNA vaccines. *Immunol. Reviews.* 2004; 199:27–39.
16. Hsieh M., Wu C., Lin T. Priming with DNA vaccine and boosting with killed vaccine conferring protection of chickens against infections bursal disease. *Vaccine.* 2007; 25:5417–27.
17. Ihata A., Watabe S., Okuda K. DNA vaccination. *Nippon Rinsho.* 2006; 64:1865–9.
18. Kjeker R., Bogen B., Mathiesen I. DNA – the future in vaccine technology? *Tidsskr. Nor. Laegeforen.* 2006; 126:2964–8.
19. Klinman D. Adjuvant activity of CpG oligodeoxynucleotides. *Int. Rev. Immunol.* 2006; 25(3–4):135–54.
20. Liu M., Acres B., Balloul J. et al. Gene-based vaccines and immunotherapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(2):14567–71.
21. Loessner H., Weiss S. Bacterial-mediated DNA transfer in gene therapy and vaccination. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2004; 4(2):157–68.
22. Mayr U., Walcher P., Azimpour C. et al. Bacterial ghosts as antigen delivery vehicles. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2005; 59(9):1381–91.
23. McCluskie M., Davis H.L. Mucosal Immunization with DNA Vaccines. *Methods Mol. Med.* 1999; 29.
24. Minigo G., Scholzen A., Tang C. et al. Poly-L-lysine coated nanoparticles - a potent delivery system to enhance DNA vaccine efficacy. *Vaccine.* 2007; 25:1316–27.
25. Mo Y., Quanquin N., Vecino W. et al. Genetic alteration of *Mycobacterium smegmatis* to improve mycobacterium-mediated transfer of plasmid DNA into mammalian cells and DNA immunization. *Infect. Immun.* 2007; 75(10):4804–16.
26. Nabel J. The development of gene-based vectors for immunization. In: Plotkin S., Orenstein W., Offit P., editors. *Vaccines.* Saunders-Elsevier; 2008. P. 1748.
27. Norman J., Hartikka J., Strauch P. et al. Adjuvants for plasmid DNA vaccines. *Methods Mol. Med.* 1999; 29:185–96.
28. Raviprakash K., Porter K. Needle-free injection of DNA vaccine: a brief overview and methodology. *Methods Mol. Med.* 2006; 127:83–9.
29. Robertson J., Griffiths E. Assuring the quality, safety and efficacy of DNA vaccines. *Mol. Biotechnol.* 2001; 17:143–9.
30. Tang D., DeVit M., Johnston S. et al. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature.* 1992; 356:152–4.
31. Ulmer J., Donnelly J., Parker S. et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science.* 1993; 259:1745–9.
32. Vaccines. A new Era in Vaccinology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1995; 772:1–294.
33. Van Drunen L., Hurk S., Babiuk S. et al. Needle-free delivery of veterinary vaccines. *Methods Mol. Med.* 2006; 127:91–105.
34. Walcher P., Mayr U., Azimpour-Tabrizi C. et al. Antigen discovery and delivery of subunit vaccines by nonliving bacterial ghost vectors. *Expert. Rev. Vaccines.* 2004; 3:681–91.
35. Wang S., Zhang C., Zhang L. et al. The relative immunogenicity of DNA vaccines delivered by the intramuscular needle injection, electroporation and gene gun method. *Vaccine.* 2008; 26:2100–10.
36. Weiss R., Schneibhofer S., Thalhammer J. DNA vaccines for allergy treatment. *Methods Mol. Med.* 2006; 127:253–67.
37. Wolff J., Malone R., Williams P. et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* 1990; 247:1465–8.
38. Wolff J., Budker V. The mechanism of naked DNA uptake and expression. *Adv. Genet.* 2005; 54:3–20.
39. Xu F., Ulmer J. Attenuated *Salmonella* and *Shigella* as carriers for DNA vaccines. *J. Drug. Target.* 2003; 11:481–8.
40. Yang F., Yan S., Wang S. et al. DNA immunization perturbs lipid metabolites and increases risk of atherogenesis. *J. Proteome Res.* 2008; 7(2):741–8.

Yu.A. Popov, N.I. Mikshis

Genetic (DNA) Vaccines

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

With the development of various branches of medicine and biology the classical ideas about means to prevent infectious diseases have changed. Nowadays in different countries of the world, investigations are carried out intensively in the sphere of genetic vaccines. Distinctive feature of DNA-vaccination is long lasted expression in eukaryotic cell cytoplasm of nucleic acids encoding synthesis of immunogenic proteins. Genetic vaccines induce both humoral and cellular responses accompanied by production of large pool of immunological memory cells. A number of questions regarding features of gene-engineered construction and transfer of DNA-vaccines into the cells of macroorganism, structure of DNA-vaccines and mechanisms of immune response generation are considered in the review. Attention is paid on the safety of gene vaccination and ways to improve its efficiency.

Key words: vaccines, DNA-vaccines, gene vaccination, immune response.

Об авторах:

Попов Ю.А., Микиш Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Popov Yu.A., Mikshis N.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Получила 02.12.10.

Е.В.Куклев¹, Л.М.Пичугина², А.И.Кологоров¹, А.Н.Данилов³, О.И.Кожанова³

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОСТРОГО ГЕПАТИТА В В САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ

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

²Фонд обязательного медицинского страхования в Саратовской области,

³Управление Роспотребнадзора по Саратовской области

Представлены результаты многолетних исследований, позволившие установить основные закономерности эпидемического процесса острого гепатита В (ГВ) в современных социально-экономических условиях в Саратовской области, причины значительного снижения заболеваемости, особенности путей передачи инфекции, дифференцировать область по гепатиту В и определить первоочередные меры профилактики данного заболевания.

Ключевые слова: заболеваемость, острый гепатит В, пути передачи инфекции, эпидемиологические особенности.

Вирусные гепатиты продолжают оставаться одной из главных проблем здравоохранения как в нашей стране, так и в большинстве стран мира. Это определяется высокой заболеваемостью и летальностью, развитием хронического гепатита, цирроза печени и первичного рака печени; социальными проблемами, связанными с вирусными гепатитами; с гигантскими экономическими затратами, которые необходимы для полноценной борьбы с этими инфекциями [2, 5]. Для Саратовской области проблема парентеральных гепатитов также весьма актуальна, что обусловлено не только их регистрацией на всех административных территориях области, но и высоким уровнем заболеваемости людей. [1].

Цель работы – выяснение закономерностей эпидемического процесса при остром гепатите В в Саратовской области в современных условиях.

Материалы и методы

Эпидемиологическому анализу были подвергнуты данные Министерства здравоохранения и Управления Роспотребнадзора по Саратовской области за 1977–2008 гг., 9781 заболевший гепатитом В, и материалы о заболеваемости острым ГВ в России и Саратовской области за это время.

Основные методы исследования – эпидемиологический и статистический. В 2000–2008 гг. наблюдался 721 больной острым ГВ, в том числе 469 мужчин (65 %) и 252 женщины (35 %). Анкетирование населения проведено в соответствии с разработанным нами «Листом исследования случая гепатита В». Анкетировано 437 человек, в том числе 258 больных острым ГВ, 179 – контрольная группа. Статистический анализ полученных при анкетировании больных данных проведен с использованием тетрахорического показателя связи и критерия χ^2 (хи-квадрат) [4].

Эпидемиологическое районирование Саратов-

ской области по ГВ проведено в соответствии с разработанными нами методическими рекомендациями [3].

Результаты и обсуждение

Анализ многолетней динамики эпидемического процесса при остром ГВ в Саратовской области (1977–2008 гг.) позволил установить наличие двух статистически достоверно ($P < 0,05$) отличающихся периодов – до 2001 г. неуклонный рост заболеваемости, после 2000 г. – снижение заболеваемости (рис. 1). В настоящий период уровень заболеваемости острым ГВ в Саратовской области не отличается от аналогичного показателя в Российской Федерации.

Основными причинами значительного снижения заболеваемости острым ГВ в Саратовской области в 2001–2008 гг. были: стабилизация экономической обстановки в стране, резкое усиление профилактических мероприятий – внедрение в широкую медицинскую практику одноразовых шприцев и других медицинских инструментов одноразового использования, возрастающие масштабы вакцинации контингентов

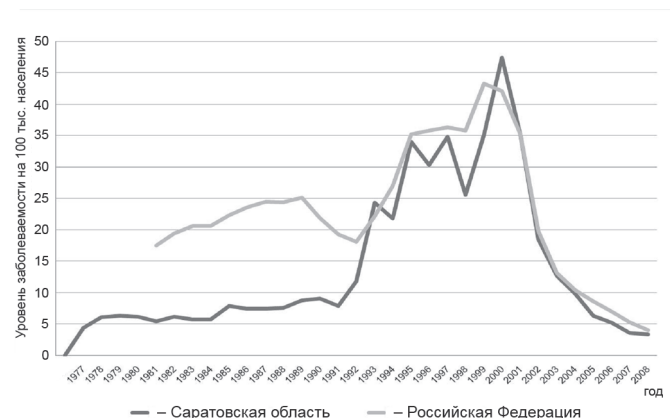


Рис. 1. Динамика заболеваемости острым ГВ в Саратовской области и Российской Федерации в 1977–2008 гг.

риска населения против гепатита В, улучшение дезинфекционных мероприятий в медицинских учреждениях, усиление информационно-разъяснительной работы среди населения.

Анализ структуры заболеваемости выявил следующее. Бессимптомные формы острого ГВ встречаются значительно чаще по сравнению с манифестной формой болезни (средний многолетний показатель носительства HBsAg составляет 54,7 на 100 тыс. населения, а показатель уровня заболеваемости за 1992–2000 гг. – 27,3 на 100 тыс. населения. Разница статистически значима с высокой степенью достоверности ($P < 0,01$).

В 2001–2008 гг. произошло значительное снижение уровня выявляемости носительства HBsAg по сравнению с 1992–2000 гг. – на 31,7 %, что свидетельствует о значительном недоучете носителей HBsAg в Саратовской области.

В последние годы максимальный показатель уровня заболеваемости острым ГВ регистрируется в возрастной группе 20–29 и 15–19 лет (соответственно 53,0 и 41,8 на 100 тыс. населения), что статистически достоверно выше по сравнению с другими возрастными группами ($P < 0,05$).

Снижение уровня заболеваемости острым ГВ в Саратовской области обусловлено ее падением в возрастных группах населения 15–19, 20–29 и 30–39 лет.

Как в период подъема, так и в период спада заболеваемости острым ГВ в Саратовской области наибольший удельный вес в общей структуре заболеваемости падает на две группы населения – рабо-

чих, служащих и неработающих. В сумме на эти две группы населения приходится соответственно 77,1 и 77,5 % от общего числа больных

Установлено отсутствие сезонности эпидемического процесса при остром ГВ в Саратовской области ($P > 0,05$).

При изучении основных путей передачи острого ГВ в Саратовской области установлено: значительное улучшение расшифровки способов инфицирования, резкое снижение удельного веса заражений, связанных с лечебными и диагностическими вмешательствами, значительный рост инфицирования вирусом ГВ при половых контактах и внутривенным введением психоактивных препаратов, на долю которых в период 1991–2008 гг. приходится 79,3 % всех установленных случаев инфицирования.

Анкетирование и опрос больных острым ГВ (258 – больные острым ГВ, 179 – контрольная группа) в 2000–2008 гг. с использованием специально разработанного листа исследования случаев ГВ и статистическая обработка полученных данных полностью подтвердили сделанные заключения. В высшей степени достоверная связь ($P < 0,001$) заболевания острым ГВ была отмечена при наличии в анамнезе больного переливания крови ($\chi^2 = 30,9$), контакта с больными ГВ за 45–120 дней до заболевания ($\chi^2 = 16,9$), проведении лечебно-диагностических вмешательств ($\chi^2 = 77,9$), внутривенном введении наркотиков ($\chi^2 = 18,8$), наличии бытового ($\chi^2 = 16,5$) и сексуального контакта ($\chi^2 = 28,9$). Отсутствие достоверной связи ($P > 0,999$) заболевания острым ГВ было установлено

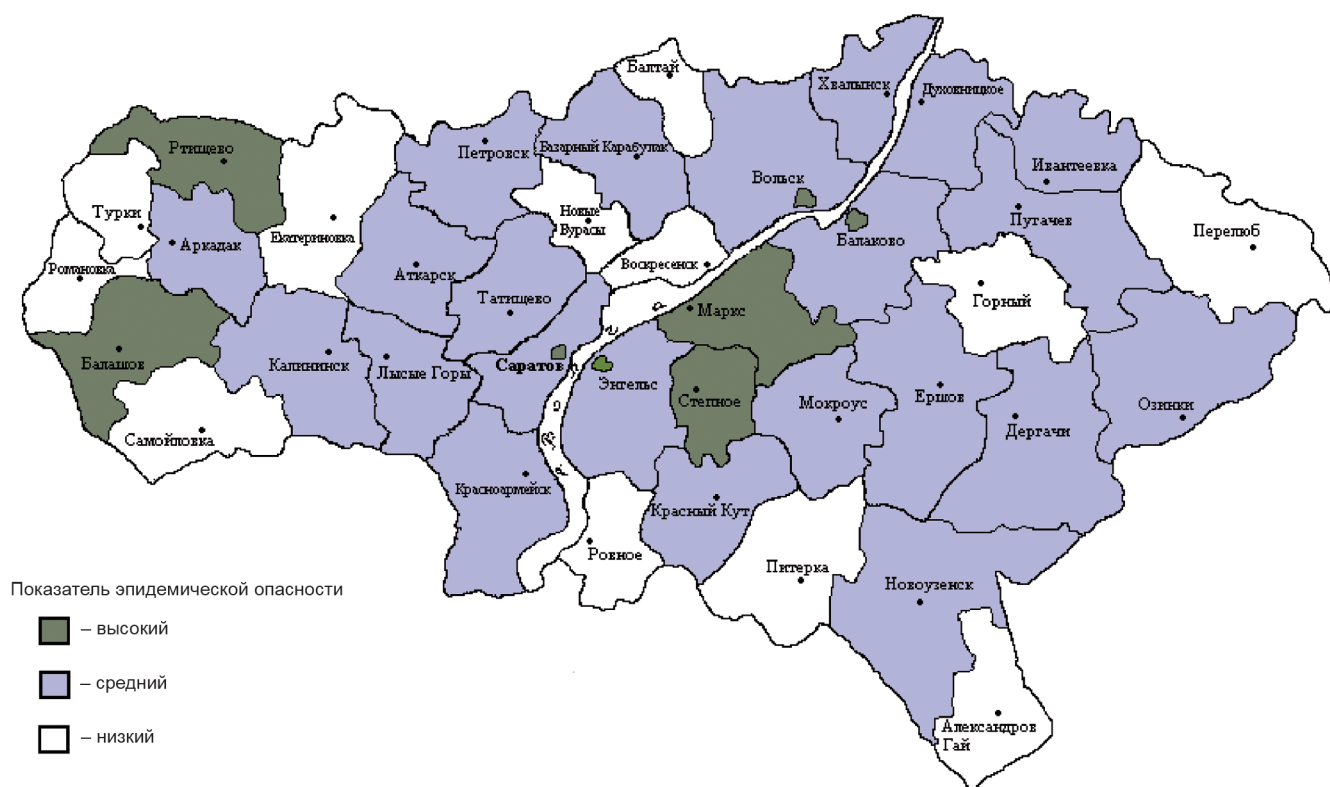


Рис. 2. Эпидемиологическое районирование территории Саратовской области по ГВ

при выезде больных за пределы Саратовской области ($\chi^2 = 0,04$) и вакцинации против ГВ ($\chi^2 = 0$).

Заключительным этапом настоящих исследований стало эпидемиологическое районирование Саратовской области по острому ГВ, проведенное с использованием следующих показателей: число лет регистрации болезни за анализируемый период, доля (%) от общего числа заболеваний, приходящаяся на конкретный административный район, количество населения (тыс. человек), частота выявления HBsAg у доноров, частота обнаружения HBsAg у населения, доля (%) больных наркоманиями от общего числа наркоманов, приходящаяся на конкретный административный район (рис. 2).

Как в период роста, так и в период снижения заболеваемости показатель эпидемической опасности был наиболее высок в городах Саратове, Энгельсе, Балаково и Вольске, а также в Балашовском, Марксовском, Ртищевском и Советском районах. В остальных районах области он средний (22 района) или низкий (12 районов).

Таким образом, в результате проведенных исследований установлены основные закономерности эпидемического процесса острого ГВ в современных социально-экономических условиях в Саратовской области, причины значительного снижения заболеваемости, особенности путей передачи острого ГВ, проведено эпидемиологическое районирование Саратовской области по гепатиту В, что позволило определить адекватные для региона первоочередные меры профилактики данного заболевания, о чем убедительно свидетельствуют официальные данные о заболеваемости острым ГВ в Саратовской области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Саратовской области в 2006 году». Саратов; 2007. 274 с.
2. Михайлов М.И., Шахгильдян И.В. Актуальные проблемы

эпидемиологии вирусных гепатитов. Вирусные гепатиты – эпидемиология, диагностика, лечение и профилактика: Матер. VII Рос. науч.-практ. конф. с междунар. участием; 29–31 мая 2007 г. М.; 2007. С. 122–3.

3. Миронова Н.И., Пичугина Л.М., Куренкова Е.Б. и др. Методические рекомендации по эпидемиологическому районированию Саратовской области по вирусным гепатитам В и С. Саратов; 2003. 23 с.

4. Плохинский Н.А. Биометрия. М.: Изд-во Моск. ун-та; 1970. 366 с.

5. Шахгильдян И.В., Михайлов М.И., Онищенко Г.Г. Парентеральные вирусные гепатиты: эпидемиология, диагностика, профилактика. Серия Вопросы практической эпидемиологии. М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ; 2003. 384с.

E.V.Kouklev, L.M.Pichugina, A.I.Kologorov,
A.N.Danilov, O.I.Kozhanova

The Epidemiologic Features of Acute Hepatitis B in the Saratov Region in Modern Conditions

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov; Compulsory Medical Insurance Fund in the Saratov Region; Rospotrebnadzor Administration of the Saratov Region

Presented are the results of long-term investigations which enabled to identify the principal regularities of epidemiologic process of acute hepatitis B in modern social and economical conditions in the Saratov region. The reasons of significant morbidity decrease and the routes of infection transmission are shown. The region is differentiated as regards hepatitis B and the high priority measures on prevention of this disease are identified.

Key words: morbidity, acute hepatitis B, routes of infection transmission, epidemiologic features.

Об авторах:

Куклев Е.В., Кологоров А.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Пичугина Л.М. Фонд обязательного медицинского страхования в Саратовской области. Саратов.

Данилов А.Н., Кожанова О.И. Управление Роспотребнадзора по Саратовской области. Саратов.

Authors:

Kouklev E.V., Kologorov A.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Pichugina L.M. Compulsory Medical Insurance Fund in the Saratov Region. Saratov.

Danilov A.N., Kozhanova O.I. Rospotrebnadzor Administration of the Saratov Region. Saratov.

Поступила 07.12.09.

А.А.Лопатин, В.А.Сафронов, А.С.Раздорский, Е.В.Куклев

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

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

Приведен краткий систематизированный обзор методов моделирования в медицине и эпидемиологии, в частности, – описание отдельных отечественных и зарубежных примеров использования математического моделирования и прогнозирования эпидемического процесса.

Ключевые слова: математические модели, математическое и компьютерное моделирование эпидемий.

С начала 20 века в эпидемиологии получили широкое распространение математические модели, построенные на феноменологии эпидемического процесса типа SIR и различных его модификациях, которые можно в известной мере отнести к детерминированным моделям. [1] Начиная с работ О.А.Барояна, Л.А.Рвачева и Ю.Г.Иванникова [2, 3, 6], в практику отечественной эпидемиологии вошли математические модели, построенные на основе феноменологии эпидемического процесса типа SEIRF (S – восприимчивые, E – индивидуумы, находящиеся в инкубации, – индивидуумы с клиническими проявлениями инфекционной болезни, R – выздоровевшие, F – умершие). Данный подход был успешно применен для моделирования эпидемии и пандемии гриппа на территории СССР и современной России [2, 3, 4, 6]. Современные математические модели на основе указанного феноменологического подхода претерпели ряд изменений математического аппарата и были адаптированы для других видов инфекционных болезней.

Известно, что назначение систем математического моделирования и прогнозирования с феноменологией типа SEIRF состоит в получении количественного прогноза развития эпидемического процесса, что обеспечивает:

- оценку эффективности различных комплексов мер противодействия развитию эпидемического процесса при ЧС в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения, включая террористические акты с применением патогенных биологических агентов, по различным сценариям;

- научно-обоснованную оперативную оценку возможного экономического ущерба при возникновении эпидемии особо опасных болезней с учетом мер противодействия эпидемическому процессу при различных начальных условиях;

- оценку готовности медицинских служб к ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения, включая расчет необходимого количества средств индивидуальной защиты, лекарственных препаратов, средств экстренной профилактики, лабораторной базы и др.

В РосНИПЧИ «Микроб» совместно с ГУ НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН были разработаны математи-

ческие модели эпидемии с феноменологией эпидемического процесса типа SEIRF, вызванной возбудителем чумы в условиях крупного города с учетом мер противодействия развитию эпидемического процесса [5]. Математические модели реализованы в комплексе компьютерных программ. Опираясь на анализ архивных и литературных данных, разработаны наиболее вероятные сценарии развития эпидемического процесса в условиях крупного города. Расчеты, проводимые по этим программам, позволяют оперативно, опираясь на минимальные исходные данные, дать количественный прогноз развития эпидемической ситуации, оценку возможному экономическому ущербу, возможности ликвидации эпидемии силами и средствами местного здравоохранения. Например, рассматривая возможность применения возбудителя чумы в качестве биологического агента при террористическом акте в крупном городе, можно оперативно провести расчеты динамики количества заболевших людей с учетом таких мер противодействия эпидемическому процессу, как изоляция и экстренная профилактика, а также расчеты количества необходимых препаратов для экстренной профилактики населения (рис. 1).

Математические модели с феноменологией эпидемического процесса типа SIR и SEIR с учетом пространственной взаимосвязи были использованы в разработке программного обеспечения STEM (Spatiotemporal Epidemiological Modeler) корпорацией IBM (рис. 2). Пространственные и временные взаимосвязи реализованы при помощи математического аппарата и теории графов [7]. С учетом численности населения на каждой из территорий, географических и макроэкономических данных, дорожных карт, расположения аэропортов, транспортной системы, маршрутов миграции птиц программа составляет графическую презентацию возможных путей и динамики распространения инфекции. Основным преимуществом является возможность интеграции в разработанную IBM стандартизованную инфраструктуру Public Health Affinity Domain (PHAD).

Программа STEM разработана IBM в рамках международной инициативы по борьбе с возникновением эпидемий вроде птичьего гриппа, в которой участвуют более двадцати организаций здравоохранения по всему миру. STEM подходит для работы с

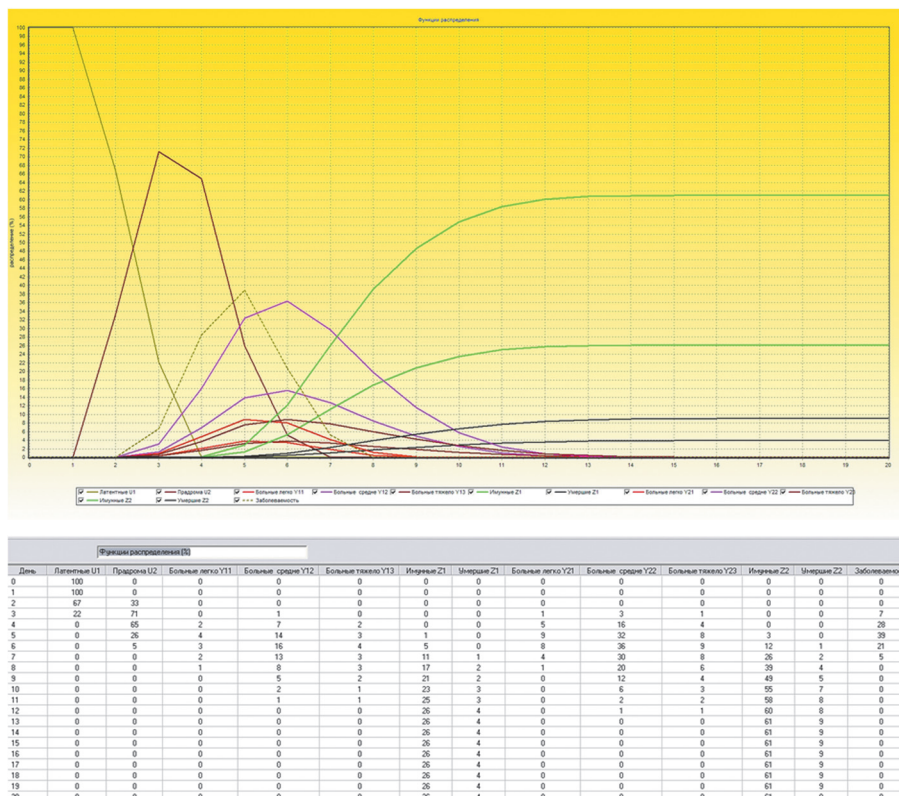


Рис. 1. Результаты вычислений в программном комплексе, визуализированных при помощи графиков и таблиц

любой операционной системой и построена на открытом исходном коде, поэтому программу можно «подгонять» для работы с распространением самых разных вирусов, а результаты расчетов визуализировать при помощи, например Google Earth [9].

Развитие информационных технологий в последние годы, использование в научных исследованиях технологий распределенных вычислений, использование «суперкомпьютеров» позволили пересмотреть подходы к моделированию эпидемий. Один из таких подходов в моделировании и прогнозировании эпи-

демического процесса использовался в эпидемиологической модели EpiSims [8].

EpiSims в качестве основы использует разработанную ранее TRANSIMS – модель оценки последствий реорганизации транспортной инфраструктуры города Портленд штат Орегон. Анализируя официальные данные, на карте выделили 180 тыс. узловых точек и составили картину повседневной жизни 1,6 млн виртуальных жителей Портленда. Это позволило создать адекватную картину физических контактов между людьми в больших населенных пунктах (рис 3).

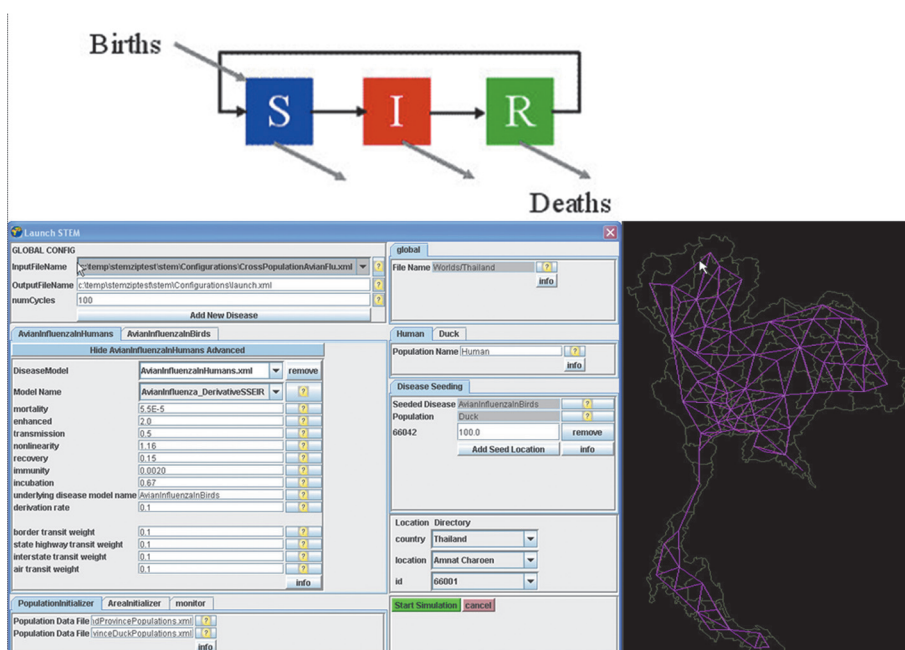


Рис. 2. Структура модели типа SIR. Интерфейс программы. Визуализация пространственных связей

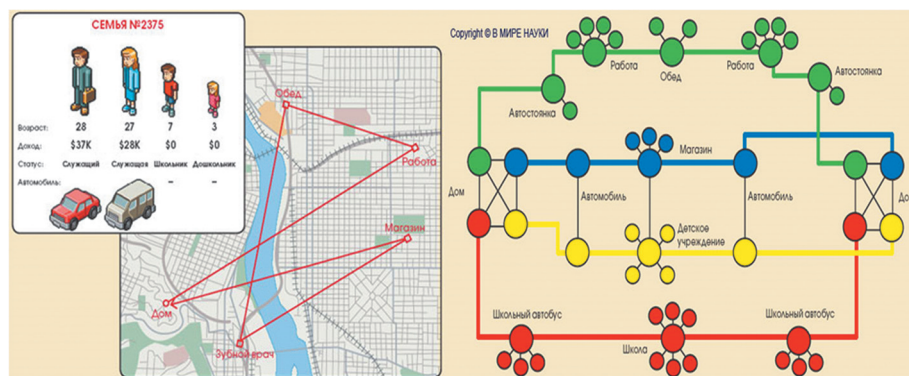


Рис. 3. Иллюстрация построения социальной сети в EpiSims

В созданной модели, на протяжении 100 дней, была промоделирована вспышка оспы по нескольким сценариям с учетом мер противодействия и без. Результаты моделирования показали, что определяющим фактором противодействия распространению инфекции является время начала мероприятий. Также результаты расчетов показали, что массовая вакцинация населения в данном случае нецелесообразна. Гораздо более эффективна избирательная вакцинация при условии ранней регистрации эпидемии. Важно также и введение карантина.

Чтобы оценить стоимость и результативность различных мероприятий, авторы смоделировали преднамеренное распространение легочной чумы в Чикаго. Оказалось, что отслеживание контактов инфицированных, прекращение занятий в учебных заведениях, введение в городе закрытого режима сопряжено с миллиардными убытками и дает мало преимуществ по сравнению с таким относительно недорогим мероприятием, как массовый прием антибиотиков [10].

Таким образом, анализ доступных литературных источников показал, что в эпидемиологии используются самые различные методы математического моделирования. В зависимости от целей можно использовать достаточно простые детерминистические или стохастические модели и сложные имитационные компьютерные. Современное развитие информационных технологий позволило использовать чрезвычайно сложный математический аппарат для моделирования эпидемического процесса. Тем не менее, имеющиеся модели либо находятся в стадии разработки, либо требуют серьезной адаптации и доработки для решения вопросов практической эпидемиологии. На данный момент из отечественных разработок для решения задач, поставленных в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)», наиболее применимы математические модели с феноменологией эпидемического процесса типа SENImRF, разработанные в ГУ НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН совместно с учреждениями Роспотребнадзора по ряду инфекционных заболеваний.

Работа выполнена по Государственному кон-

тракту № 116-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. Андерсон Р, Мэй Р. Инфекционные болезни человека. Динамика и контроль: пер. с англ. М.: Мир, Научный мир; 2004. С. 784.
2. Бароян О.В., Рвачев Л.А. Иванников Ю.Г. Моделирование и прогнозирование эпидемий гриппа для территории СССР. М.; 1977. С. 546.
3. Бароян О.В., Рвачев Л.А. Математика и эпидемиология М.: Знание; 1977. С. 63.
4. Боев Б.В. Новые информационные технологии в эпидемиологии: системное моделирование процессов инфекционной патологии [автореф. дис. ... д-ра тех. наук]. М.; 1992. 43 с.
5. Кутырев В.В., Куклев Е.В. Храмов В.Н., Лопатин А.А. Математическое моделирование и прогнозирование эпидемий (вспышек) чумы в чрезвычайных ситуациях природного и техногенного характера. В кн.: Противочумные учреждения России и их роль в обеспечении эпидемиологического благополучия населения страны. М.; 2004. С. 24–6.
7. Рвачев Л.А. Моделирование медико-биологических процессов в обществе как раздел механики сплошных сред. Докл. АН СССР. 1972; 203(3):540–2.
8. Tamm V. Теория графов. Пер. с англ. М.: Мир; 1988. 424 с.
9. <http://www.ccs.lanl.gov/ccs5/apps/epid.shtml>.
10. http://www.ij-healthgeographics.com/content/5/1/4#IDA_XGFC.
11. <http://www.sciam.ru/2005/6/inform.shtml>.

A.A.Lopatin, V.A.Safronov, A.S.Razdorskiy, E.V.Kouklev

Current State of Problem of Mathematical Modeling and Prognosis of the Epidemic Process

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Short systematic review on the modeling methods in medicine and epidemiology is presented. In particular, special native and foreign examples of application of mathematical modeling and prognosis of epidemic process are described.

Key words: mathematical models, mathematical and computer modeling of the epidemics.

Об авторах:

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

Authors:

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

Поступила 02.11.09.

Г.И.Лямкин, Н.И.Тихенко, Е.А.Манин, С.В.Вилинская, С.И.Головнева, Д.В.Русанова

ЭПИЗООТОЛОГО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ОБСТАНОВКА ПО БРУЦЕЛЛЕЗУ В ЮЖНОМ ФЕДЕРАЛЬНОМ ОКРУГЕ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2006–2009 гг.

ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»

Представлен анализ динамики заболеваемости людей и животных бруцеллезом, дана оценка эпизоотолого-эпидемической ситуации по бруцеллезу в Южном федеральном округе Российской Федерации за 2006–2009 гг. Показано, что в ряде регионов ЮФО сложилась неблагоприятная эпидемическая ситуация по бруцеллезу, что дает основание прогнозировать сохранение заболеваемости на высоком уровне.

Ключевые слова: бруцеллез, заболеваемость, эпидемиологическая обстановка.

В период с 2006 по 2009 год в Российской Федерации ежегодно регистрировалось от 300 до 500 больных бруцеллезом преимущественно на административных территориях с развитым животноводством. Этому способствовало ослабление контроля за проведением противобруцеллезных мероприятий на животноводческих объектах вследствие социально-экономических преобразований, происходящих с 90-х годов и приведших к существенному превалярованию частного сектора животноводства [1, 3].

Наибольший уровень заболеваемости людей бруцеллезом (73,8 %), превышающий общероссийские показатели более чем в 5 раз, постоянно регистрируется на территории Южного федерального округа (ЮФО) Российской Федерации [2, 4].

Указанные обстоятельства, а также наличие неблагоприятных по бруцеллезу хозяйств крупного и мелкого рогатого скота, не всегда эффективно контролируемое перемещение скота с сопредельных территорий, приводит к увеличению возможности контакта людей с больными животными, что, в свою очередь, требует оценки риска возникновения эпидемических проявлений бруцеллеза на различных административных территориях ЮФО и внесения корректив в существующую систему эпидемиологического надзора за бруцеллезом.

Целью работы была оценка состояния эпидемиологического надзора за бруцеллезом в ЮФО на основе анализа сведений о заболеваемости людей бруцеллезом, влияния социально-экономических факторов на эпидемический и эпизоотический потенциал очагов бруцеллезной инфекции.

Материалы и методы

В качестве источников информации использовались статистические данные официальной регистрации заболеваемости бруцеллезом в 13 административных регионах ЮФО за 2006–2009 гг. Эпидемиологические проявления бруцеллеза оценивали на основе общепринятых методов ретроспективного эпидемиологического анализа с позиции системного подхода [5].

Результаты и обсуждение

Административные территории ЮФО характеризуются разнообразием климато-географических условий, национального и экономического уклада, однако общим для всех является интенсивное развитие животноводства, преимущественно мелкого и крупного рогатого скота.

Факторами, способствующими высокой заболеваемости бруцеллезом людей и животных в Южном Федеральном округе, являются: наличие высокоразвитого животноводства крупного и мелкого рогатого скота; длительно сохраняющееся эпизоотологическое неблагополучие по бруцеллезу; бесконтрольная миграция сельскохозяйственных животных между административными территориями без надлежащего санитарно-ветеринарного контроля; преобладающее количество скота в индивидуальных и фермерских хозяйствах, в которых затруднен учет поголовья и проведение противобруцеллезных мероприятий.

Анализ заболеваемости бруцеллезом с впервые установленным диагнозом в административных территориях Южного федерального округа показал неравномерность ее распределения по отдельным регионам (табл. 1).

Более половины всех зарегистрированных больных приходится на Республику Дагестан (56,3 %, интенсивный показатель на 100 тыс. населения – 6,0) и Ставропольский край (17,8 %, интенсивный показатель на 100 тыс. населения – 1,8). В 2009 г. в Республике Дагестан было изолировано от больных бруцеллезом людей 5 культур *B. melitensis*.

Заболеваемость бруцеллезом в Республике Калмыкия составляет 8,3 % от общей заболеваемости в ЮФО, однако интенсивный показатель заболеваемости на 100 тыс. населения (7,97) самый высокий в регионе. В 2008 г. от больных бруцеллезом людей было изолировано 4 культуры *B. melitensis*. Эпидемиологическая обстановка по бруцеллезу в других регионах ЮФО характеризуется преимущественно спорадической заболеваемостью, интенсивные показатели которых на протяжении изучаемого периода колебались от 0,07 до 3,28 на 100 тыс. населения.

Заболеваемость людей бруцеллезом в Южном Федеральном округе по административным территориям (2006–2009 гг.)

Административные территории	Зарегистрировано заболеваний по годам							
	2006		2007		2008		2009	
	Всего/показ. на 100 тыс. нас.	Дети до 14 лет/показ. на 100 тыс. нас.	Всего/показ. на 100 тыс. нас.	Дети до 14 лет/показ. на 100 тыс. нас.	Всего/показ. на 100 тыс. нас.	Дети до 14 лет/показ. на 100 тыс. нас.	Всего/показ. на 100 тыс. нас.	Дети до 14 лет/показ. на 100 тыс. нас.
Южный Федеральный округ	332/1,46	25/0,48	240/1,05	17/0,33	256/1,13	19/0,38	290/1,26	20/0,38
Республика Дагестан	181/6,87	18/2,10	124/4,71	12/1,43	145/5,51	15/1,83	180/6,8	15/1,83
Кабардино-Балкарская Республика	20/2,22	1/0,44	19/2,11	-	10/1,11	-	7/0,44	-
Республика Калмыкия	25/8,60	-	22/7,56	-	19/6,53	1/1,39	27/9,2	1/1,39
Карачаево-Черкесская Республика	1/0,23	-	-	-	-	-	1/0,23	-
Республика Северная Осетия – Алания	18/2,53	2/1,23	23/3,24	1/0,74	7/0,98	-	8/1,13	-
Ставропольский край	61/2,23	2/0,36	35/1,28	4/0,74	47/1,74	2/0,38	56/2,07	4/0,72
Астраханская обл.	4/0,4	-	2/0,2	-	9/0,9	1/0,48	4/0,4	-
Волгоградская обл.	7/0,26	1/0,2	5/0,19	-	16/0,61	-	4/0,15	-
Ростовская обл.	15/0,34	1/0,12	10/0,23	-	3/0,06	-	3/0,06	-
Чеченская Республика	-	-	-	-	-	-	-	-
Республика Ингушетия	-	-	-	-	-	-	-	-
Республика Адыгея	-	-	-	-	-	-	-	-
Краснодарский край	-	-	-	-	-	-	-	-

Особенное беспокойство вызывает высокая заболеваемость бруцеллезом в ЮФО среди детей, которая составляет 58,6 % от случаев заболевания детей в Российской Федерации. Из всех регионов ЮФО наиболее неблагоприятная обстановка сложилась в Республике Дагестан. За анализируемый период заразились 60 детей, что составляет 74 % от заболевших детей на территории ЮФО. В остальных административных территориях ЮФО регистрируются единичные (1–4) случаи заражения детей бруцеллезом. Высокая заболеваемость детей бруцеллезом в Республике Дагестан обусловлена широко практикующимся вовлечением детей в процесс ухода за животными (особенно мелким рогатым скотом) в индивидуальных хозяйствах и употреблением в пищу кисло-молочных продуктов без термической обработки.

Заболеваемость людей бруцеллезом в Ставропольском крае не имеет стойкой тенденции к снижению. Так, в 2006 г. был зарегистрирован 61 больной бруцеллезом, интенсивный показатель на 100 тыс. населения – 2,27. В 2007 г. произошло значительное снижение заболеваемости – до 35 человек, интенсивный показатель на 100 тыс. населения – 1,29. Однако в 2008 г. заболеваемость увеличилась на 25,5 % по сравнению с 2007 г. и составила 1,7 на 100 тыс. населения. В 2009 г. заболело 56 человек, показатель на 100 тыс. населения составил 2,07. Наиболее высокие показатели заболеваемости среди населения регистрировались в районах, прилегающих к Республикам Дагестан и Калмыкия (Арзгирский, Курский, Нефтекумский, Левокумский, Апанасенковский, Туркменский райо-

ны). Это объясняется усилением интенсивности миграции населения на постоянное и особенно временное место жительства в юго-восточные районы края из соседних неблагоприятных по бруцеллезу регионов. Мигрантами завозится личный скот без соблюдения санитарно-ветеринарных правил, что в значительной степени способствует ухудшению эпизоотической, а в последующем и эпидемической обстановки по бруцеллезу.

Анализ динамики удельного веса мелкого и крупного рогатого скота как источника заражения людей бруцеллезом в ЮФО позволил установить, что в регионе наблюдается увеличение роли мелкого рогатого скота в инфицировании людей. Это связано с бесконтрольным перемещением животных из неблагоприятных по бруцеллезу районов. В результате резко растет заболеваемость людей бруцеллезом при непосредственных контактах с животными (табл. 2).

Основным источником заражения людей бруцеллезом является мелкий рогатый скот – около 34 % случаев, в 27 % случаев заражение происходило при контакте с крупным рогатым скотом. У 24 % заболевших бруцеллезом источник заражения не установлен, что свидетельствует о серьезных недостатках в работе по эпидемиологическому расследованию случаев заболевания людей бруцеллезом на местах.

В Краснодарском крае в 2008 г. выявлено 3 неблагоприятных пункта по бруцеллезу мелкого рогатого скота. Это первый случай выявления зараженных бруцеллезом овец за последние 50 лет.

В Ростовской области в 2009 г. также выявлены неблагоприятные пункты по бруцеллезу МРС,

Таблица 2

Источники инфицирования людей бруцеллезом в ЮФО (2006–2009 гг.)

Административные территории	Источники инфицирования			
	КРС	МРС	Пищевые продукты животного-водства	Не установлен
Республика Дагестан	127	299	102	102
Кабардино-Балкарская Республика	27	2	18	9
Республика Калмыкия	40	32	2	19
Республика Северная Осетия – Алания	37	1	15	-
Ставропольский край	23	24	39	113
Астраханская обл.	12	-	-	7
Волгоградская обл.	18	-	2	10
Ростовская обл.	17	15	-	-
Республика Адыгея	-	-	-	-
Карачаево-Черкесская Республика	1	-	1	-
Республика Ингушетия	-	-	-	-
Чеченская Республика	-	-	-	-
Краснодарский край	-	-	-	-
Всего по ЮФО (%)	301 (26,9)	373 (33,36)	179 (15,2)	265 (23,7)

что связано с увеличением поголовья овец в частном секторе и бесконтрольным их перемещением из пограничных районов Республики Калмыкия и Ставропольского края.

Большую часть больных с впервые выявленным бруцеллезом в ЮФО составляли мужчины (69,7 %). Больные чаще инфицировались контактным (25,4 %) и алиментарным (16,9 %) путем. У 27,5 % больных путь передачи инфекции установить не удалось.

При анализе профессионального состава самая высокая заболеваемость бруцеллезом регистрировалась среди работников, обслуживающих мелкий рогатый скот (чабаны, сакманщики и др. – 67,6 %) и ветеринарных работников (17,1 %), табл. 3.

В связи с отмеченным, актуальными являются оценка эпидемического потенциала очагов разных типов и прогнозирование эпизоотологической и эпидемиологической ситуации на отдельных территориях. Особого внимания требует совершенствование системы эпиднадзора за бруцеллезом, основным принципом которого является комплексный медико-ветеринарный подход к его организации, поскольку источником инфекции являются, в основном, сельскохозяйственные животные, а заражение человека связано с работой в животноводстве и производством животноводческой продукции.

Анализ показал, что основной причиной заболеваемости людей бруцеллезом в ЮФО явилось широкое распространение бруцеллезной инфекции среди крупного и мелкого рогатого скота. Создание животноводческих хозяйств различных форм собственности (акционерные, фермерские, индивидуальные) значительно ослабили ветеринарный надзор за животными. Кроме того, ежегодные перегоны значительной части овец на отгонные пастбища, а также осуществление миграции животных из одного региона в другой по экономическим соображениям, без

Таблица 3

Профессиональный состав лиц, заболевших бруцеллезом в ЮФО в 2006–2009 гг.

Административные территории	Категория заболевших бруцеллезом работников сельского хозяйства			
	Работники МТФ	Чабаны, сакманщики и др.	Ветеринары, зоотехники	Рабочие перерабатывающих предприятий
Республика Дагестан	17	87	10	-
Кабардино-Балкарская Республика	1	1	1	-
Республика Калмыкия	2	38	16	-
Республика Северная Осетия – Алания	1	-	2	2
Ставропольский край	7	18	23	1
Астраханская обл.	3	-	2	-
Волгоградская обл.	15	1	8	1
Республика Адыгея	-	-	-	-
Республика Ингушетия	1	-	-	-
Карачаево-Черкесская Республика	1	-	-	-
Чеченская Республика	-	-	-	-
Ростовская область	-	9	2	6
Краснодарский край	-	-	-	-
Всего по ЮФО	48	253	64	10

карантинизации и предварительного комплексного обследования на бруцеллез, отсутствие биркования животных в индивидуальных хозяйствах создают благоприятные условия для распространения бруцеллеза среди сельскохозяйственных животных.

Таким образом, в современных условиях для обеспечения и поддержания эпидемиологического благополучия населения по бруцеллезу необходимы объективная оценка сложившейся эпизоотической и эпидемической ситуации и принятие действенных мер по своевременному проведению санитарно-ветеринарных, санитарно-профилактических и противоэпидемических мероприятий в соответствии с действующими инструктивно-методическими документами.

С учетом анализа динамики заболеваемости бруцеллезом людей и животных в ЮФО за последние годы можно прогнозировать на 2010 год увеличение ее на 5–10 % от средних многолетних величин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Желудков М.М., Цирельсон Л.Е., Хадарцев О.С. и др. Состояние заболеваемости бруцеллезом в Российской Федерации. Дез. дело. 2009; 2:38–40.
2. Лямкин Г.И., Тихенко Н.И., Манин Е.А. и др. Эпидемиологическая обстановка по бруцеллезу в Южном федеральном округе. В кн.: Проблемы современной эпидемиологии. Перспективные средства и методы лабораторной диагностики и профилактики актуальных инфекций. Тр. Всерос. науч. конф.; 19–20 ноября 2009 г. СПб; 2009. С. 242.
3. Онищенко Г.Г. Об эпидемиологической обстановке по особо опасным, природно-очаговым инфекциям на территории Южного Федерального округа. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2004; 3:23–30.
4. Русанова Д.В., Лямкин Г.И. Эпидемиологические осо-

бенности бруцеллеза в Ставропольском крае. Пробл. особо опасных инф. 2009; 3(101):27–30.

5. Шаханина И.А., Кучеровская Т.В., Черкова Т.П. Применение различных статистических методов эпидемиологического анализа при оценке сезонности итерриториального распространения инфекционных болезней. Журн. микробиол., эпидемиол. и микробиол. 1990; 5:43–7.

G.I.Lyamkin, N.I.Tikhenko, E.A.Manin, S.V.Vilinskaya, S.I.Golovneva,
D.V.Rusanova

**The Epizootiological and Epidemiologic Situation on Brucellosis
in the Southern Federal District of the Russian Federation
in 2006–2009**

Stavropol Research Anti-Plague Institute

Presented is the analysis of dynamics of brucellosis morbidity in people and animals. Evaluation of epizootiological and epidemiological situation

on brucellosis in the Southern federal district of the Russian Federation for 2006–2009 is given. It is shown that unfavorable epidemic situation on brucellosis persists in the number of regions of the Southern federal district of RF that gives the basis to predict the preservation of morbidity at a high level.

Key words: brucellosis, morbidity, epidemiological situation.

Об авторах:

Лямкин Г.И., Тихенко Н.И., Манин Е.А., Вилинская С.В., Головнева С.И., Русанова Д.В. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Authors:

Lyamkin G.I., Tikhenko N.I., Manin E.A., Vilinskaya S.V., Golovneva S.I., Rusanova D.V. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 355035, Stavropol, Sovetskaya St., 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 11.05.10.

В.А.Сафронов¹, А.С.Раздорский¹, С.Ю.Скаленко¹, А.А.Лопатин¹, А.И.Ковтунов²,
Н.В.Пискунова², А.И.Кологоров¹, Е.В.Куклев¹, В.П.Топорков¹

ГЕОГРАФИЧЕСКАЯ ИНФОРМАЦИОННАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫМИ ИНФЕКЦИОННЫМИ БОЛЕЗНЯМИ В СОЧЕТАННЫХ ОЧАГАХ НА ТЕРРИТОРИИ АСТРАХАНСКОЙ ОБЛАСТИ

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

²Управление Роспотребнадзора по Астраханской области

При помощи географической информационной системы проведен пространственный анализ многолетних сочетанных эпидемических проявлений некоторых природно-очаговых инфекционных болезней на территории Астраханской области. Предложен метод выявления участков территории устойчивой сочетанности и показана его высокая эффективность и прогностическая ценность. На основе полученных данных предложены меры по повышению эффективности эпидемиологического надзора за природно-очаговыми инфекционными болезнями.

Ключевые слова: ГИС-технологии, пространственный анализ, эпидемиологический надзор, сочетанные природные очаги, природно-очаговые инфекционные болезни.

На территории Астраханской области имеются активные в эпидемическом и эпизоотическом отношении сочетанные природные очаги Крымской геморрагической лихорадки (КГЛ), лихорадки Западного Нила (ЛЗН) и Астраханской пятнистой лихорадки (АПЛ). За 1999–2008 гг. в области зарегистрировано 2044 больных АПЛ, 118 – КГЛ и 238 – ЛЗН. В отдельные годы спорадическая заболеваемость перерастала в эпидемические вспышки (ЛЗН – 1999 г., КГЛ – 2005–2008 гг.) с превышением средних показателей заболеваемости по Российской Федерации [2]. Данные о территории риска, факторах риска, времени и контингентах риска получены при выделении возбудителей природно-очаговых инфекционных болезней от грызунов, членистоногих, из объектов окружающей среды, а также по результатам серологических исследований крови больных [3]. Интегрированным выражением категорий эпидемиологического риска является инфекционная заболеваемость.

Изложенные данные свидетельствуют о том, что современная эпидемиологическая конъюнктура определяет необходимость постоянного интенсивного эпидемиологического надзора за природно-очаговыми инфекционными болезнями на территории Астраханской области.

Эпидемиологический надзор за указанными инфекционными болезнями ориентирован на категории риска, обусловленные конкретной нозологической формой [1]. Вместе с тем в современных условиях требуется проведение эпидемиологического районирования территории и оптимизация эпидемиологического надзора, санитарно-профилактических и противоэпидемических мероприятий с учетом сочетанности категорий риска. Таким образом, эпидемиологический статус будет учтен в полной мере при дифференциации территорий на основе интегрированных показателей сочетанности эпидемических проявлений, что позволит сконцентрировать силы и

средства на сравнительно небольших территориях, характеризующихся высоким риском заболевания людей.

Цель работы – совершенствование эпидемиологического надзора за природно-очаговыми инфекционными болезнями на основе использования методов пространственного анализа сочетанности эпидемических проявлений средствами географических информационных систем (ГИС).

Материалы и методы

В качестве материалов для исследования использованы данные, из первичных учетных документов (форма 058/у и форма № 060/у за 10-летний период), представленные Управлением Роспотребнадзора по Астраханской области. За топографическую основу взята электронная карта Астраханской области в масштабе 1:1 млн, дополненная информация о точной численности населения во всех официально зарегистрированных населенных пунктах.

На этапе планирования исследования был определен порядок оцифровки данных путем ручного внесения обезличенных персонализированных значений из первичных документов в электронные таблицы с заранее обозначенными полями и допустимыми значениями. Всего обработана и внесена в исходную таблицу в виде отдельных строк информация по 2147 больным.

Для обеспечения достоверности анализа были использованы критерии внесения случаев регистрации инфекционных больных в рабочую выборку. Информация о больном исключалась из дальнейшей обработки, если для соответствующей записи выполнялось любое из 3 перечисленных условий: отсутствует адрес проживания больного и/или название населенного пункта и района для жителей области; не указана дата заболевания; нет информации о лабораторном подтверждении и/или окончательном

диагнозе. По указанным критериям отсеяно 4,9 % (n=103) записей исходной таблицы, что отражает уровень случайных ошибок при ведении журнала учета по форме 060/у.

Геокодирование (определение географических координат всех точек, соответствующих зарегистрированным больным, на основании адреса постоянного места жительства, указанного в учетном документе) проводилось на основе атрибутивной информации электронных карт Астраханской области и поисково-информационных картографических служб «Google. maps» и «Яндекс.Карты». Создание базы географических данных и пространственный анализ проводился при помощи компьютерной программы ArcGIS 9.3. Перед проведением пространственного анализа вся выборка была поделена на рабочую (90 % случаев) и тестовую (10 % случаев) части. Рабочая часть была подвергнута дальнейшей обработке, а тестовая использована на последнем этапе исследования для проверки прогностической ценности.

Результаты и обсуждение

Картирование случаев регистрации больных КГЛ, ЛЗН и АПЛ при помощи ГИС выявило их неравномерное пространственное распределение. Пространственный анализ эпидемических проявлений перечисленных инфекционных болезней позволил уточнить географическое положение очагов, а также установить пространственную динамику распространения данных инфекционных болезней на территории Астраханской области.

Для выявления территорий приуроченности эпидемических проявлений КГЛ, ЛЗН и АПЛ по точкам, обозначающим места проживания зарегистрированных больных, были построены буферные



Рис. 1. Диаграмма территориальной сочетанности эпидемических проявлений ЛЗН (Лихорадка Западного Нила), АПЛ (Астраханской Пятнистой лихорадки) и Крымской геморрагической лихорадки (КГЛ)

зонам радиусом 3 км, размер которых выбран, исходя из средней протяженности населенного пункта Астраханской области.

Рабочая гипотеза исследования состояла в том, что на территории Астраханской области существуют сравнительно небольшие участки (менее 5 % от общей площади), в пределах которых регистрируется повышенная заболеваемость тремя природно-очаговыми инфекционными болезнями (КГЛ, ЛЗН и АПЛ), имеющими близкие эпидемиологические характеристики. Выделение таких зон устойчивости, многолетних сочетанных эпидемических проявлений, выявленных при помощи ГИС, является научным основанием для оптимизации эпидемиологического районирования и контроля за природно-очаговыми инфекционными болезнями.

Для проверки указанной рабочей гипотезы средствами ГИС было проведено пространственное сопоставление территорий повышенного риска инфицирования КГЛ, ЛЗН и АПЛ (рис. 1).

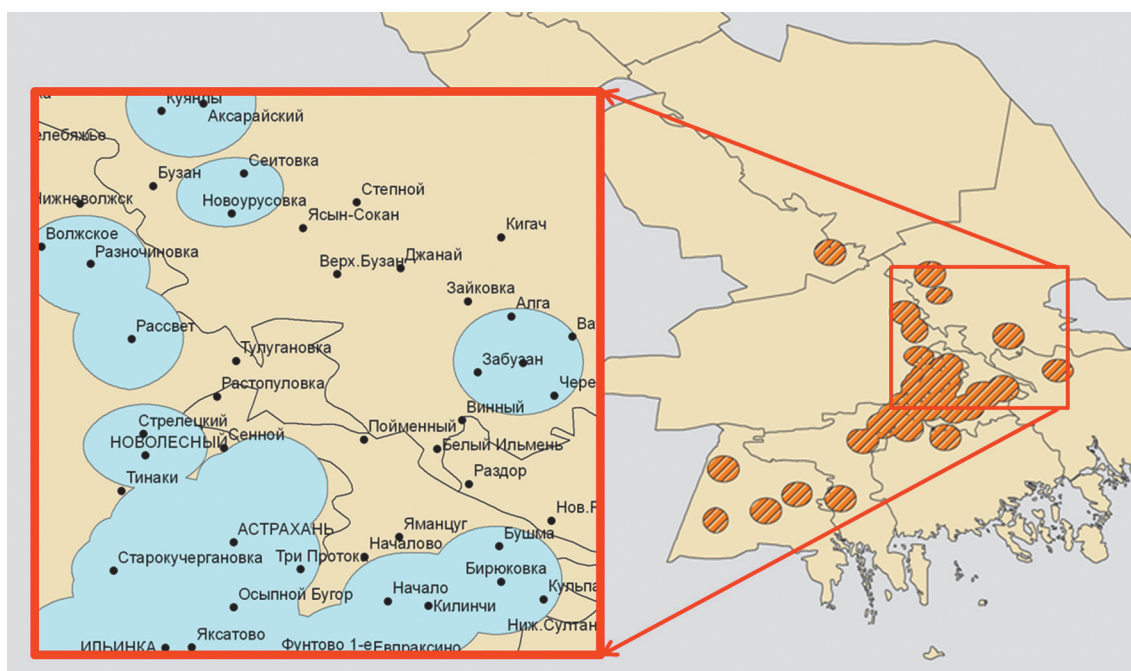


Рис. 2. Фрагмент территории Астраханской области с обозначенными участками сочетанных эпидемических проявлений и нанесенными названиями населенных пунктов

Сравнительная характеристика эффективности методов определения эпидемиологического риска для населения Астраханской области в отношении трех сочетанных природно-очаговых инфекционных болезней

Характеристики метода выявления сочетанности	Метод табличного поиска	ГИС-анализ
	Сочетанно пораженные населенные пункты	Населенные пункты в зоне сочетанности
Число населенных пунктов	15	101
Число жителей (без г. Астрахань)	50783	161826
Доля выявления больных	АПЛ, %	64 (n=932)
	ЛЗН, %	87 (n=187)
	КГЛ, %	56 (n=66)

*В скобках n = абсолютное число больных.

Пространственный анализ выявил наличие 13 участков устойчивых сочетанных эпидемических проявлений трех перечисленных природно-очаговых инфекционных болезней (рис. 2). Общая площадь выявленной территории устойчивой сочетанности эпидемических проявлений составила 2028 км², что составляет 4,6 % от территории Астраханской области. В пределах данной зоны располагается 101 населенный пункт с постоянно проживающим населением 161826 человек.

Для оценки эффективности полученной пространственной модели сочетанности в отношении возможности прогноза географического распределения случаев КГЛ, АПЛ и ЛЗН было проведено сравнение с традиционным способом определения сочетанной пораженности населенных пунктов. Результаты сравнительного анализа представлены в таблице, из которой следует, что табличный поиск выявляет только 15 наиболее крупных населенных пунктов Астраханской области, население которых (50783 чел.) подвергается высокому риску в отношении трех инфекционных болезней. Пространственный анализ в ГИС, помимо 15 наиболее крупных, выявляет еще 86 населенных пунктов, население которых (111043 чел.) проживает в равных условиях повышенного риска инфицирования.

Выявление сочетанности эпидемических проявлений инфекционных болезней без использования ГИС основано на обнаружении населенных пунктов, в которых проживают больные различными нозологическими формами. Такой подход к оценке риска инфицирования имеет естественное ограничение, связанное с тем, что не учитывается наличие населенных пунктов, расположенных в непосредственной близости (3 км зона) с теми, в которых вероятность инфицирования уже реализовалась в виде заболеваний среди людей. Кроме того, табличный поиск выявляет наиболее крупные населенные пункты (в среднем в 2,1 раза крупнее) по сравнению с пространственным анализом, что увеличивает вероятность ошибки ассоциирования мест инфицирования и проживания зарегистрированного больного.

Как показано в таблице, в зоне сочетанных эпи-

демических проявлений регистрируются 56 % всех случаев КГЛ, 87 % ЛЗН и 64 % АПЛ на основании чего можно сделать вывод об определенной обобщающей ценности данной модели пространственного распределения в отношении указанных нозологических форм. Эффективность пространственного анализа в сравнении с методом табличного поиска определяется тем, что на территории участков сочетанности выявляется на 9 % больше больных ЛЗН, на 21 % – АПЛ и на 20 % – КГЛ.

Прогностическая ценность пространственной модели была определена на основе контроля попадания больных из тестовой выборки (10 % случайно отобранных больных, не участвовавших в построении буфера) в полученную зону сочетанности. Для АПЛ прогностическая ценность пространственной модели по результатам проверки составила 53 %, для ЛЗН – 86 % и для КГЛ – 58 %, что может быть использовано для прогнозирования уровня выявляемости указанных инфекционных болезней для Астраханской области в среднесрочной перспективе.

Учитывая высокую эффективность полученной пространственной модели, можно сделать вывод о том, что данный подход может служить основанием для сосредоточения мероприятий в рамках эпидемиологического надзора за природно-очаговыми инфекционными болезнями. При этом увеличение обследовательской работы не потребует значительного финансирования, поскольку вновь выявленные населенные пункты расположены в непосредственной близости от уже известных.

Таким образом, эпидемиологическое благополучие на территориях с высоким риском заболевания людей риккетсиозными и вирусными инфекционными болезнями может быть обеспечено за счет выявления зон сочетанных эпидемических проявлений на основе ГИС-анализа и концентрацией лабораторных исследований и комплексного анализа полевого материала с одновременным адресным проведением профилактических мероприятий, направленных на снижение численности основных носителей и переносчиков возбудителей.

Работа выполнена по Государственному контракту № 64-Д от 29.06.2010 г. в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Павловский Е.Н. Основные положения учения о природной очаговости болезней. В кн.: Многотомное руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней. М.; 1965. Т. 5.
2. Путинцева Е.В., Смелянский В.П., Антонов В.А. и др. Прогноз эпидемиологической ситуации по лихорадке Западного Нила на территории Российской Федерации на 2010 год. Пробл. особо опасных инф. 2010; 2(104):14–7.
3. Сафронов В.А., Пискунова Н.В., Ковтунов А.И. и др. Новые информационные технологии в ретроспективном эпидемиологическом анализе на уровне субъекта Российской Федерации на примере Астраханской области. Пробл. особо опасных инф. 2010; 2(104):43–8.

V.A.Safronov, A.S.Razdorskiy, S.Yu.Skalenko,
A.A.Lopatin, A.I.Kovtunov, N.V.Piskunova, A.I.Kologorov,
E.V.Kouklev, V.P.Toporkov

**Geographical Information System for Epidemiological
Surveillance of Natural Focal Infectious Diseases in Combined
Foci in the Territory of the Astrakhan Region**

*Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov;
Rospotrebnadzor Administration in the Astrakhan Region*

Spatial analysis of long-term combined epidemic manifestations of some natural focal infectious diseases in the territory of the Astrakhan region was carried out using geographical information system. Suggested is the method to detect territories where these combined epidemic manifestations are stable and its high effectiveness and predictive value are demonstrated. On the basis of received data suggested are the measures to increase the effectiveness of epidemiologic surveillance for natural focal infectious diseases.

Key words: GIS technologies, spatial analysis, epidemiologic surveillance, combined natural foci, natural focal infectious diseases.

Об авторах:

Сафронов В.А., Раздорский А.С., Скаленко С.Ю., Лопатин А.А., Кологоров А.И., Куклева Е.В., Топорков В.П. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru
Ковтунов А.И., Пискунова Н.В. Управление Роспотребнадзора по Астраханской области. 414050, Астрахань, ул. Н.Островского, 138.

Authors:

Safronov V.A., Razdorskiy A.S., Skalenko S.Yu., Lopatin A.A., Kologorov A.I., Kouklev E.V., Toporkov V.P. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru
Kovtunov A.I., Piskunova N.V. Rospotrebnadzor Administration in the Astrakhan Region. 414050, Astrakhan, N.Ostrovsky St., 138.

Поступила 24.06.10.

Н.М.Устун

СОВРЕМЕННЫЕ ОСОБЕННОСТИ ЭПИДЕМИОЛОГИИ КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА В АЗЕРБАЙДЖАНЕ

Азербайджанская Республиканская Противочумная станция им. С.Имамалиева, Баку

Полученные данные показали, что на процесс распространения возбудителя кампилобактериоза среди сельскохозяйственных птиц влияют комплекс факторов, в их число входят условия содержания птиц и занос возбудителя извне (с кормом и т.п.). Неудовлетворительные санитарно-гигиенические условия в птицефермах и высокий уровень инфицированности кур, приводит к интенсивному загрязнению разных объектов внешней среды кампилобактерами. Поэтому, первоочередной задачей явился отбор тех объектов, которые действительно могут подвергаться загрязнению кампилобактерами по своим функциональным характеристикам обеспечивать циркуляцию инфекции среди людей, животных и птиц.

Ключевые слова: кампилобактериоз, эпидемиологические особенности, распространенность.

В последние десятилетия в связи с развитием торговых связей отмечается увеличение инфицированности возбудителями кампилобактериоза сельскохозяйственных животных, птиц, в особенности кур [1, 2, 4]. Наиболее существенными, по мнению специалистов зарубежных стран, природными резервуарами возбудителей кампилобактериоза являются домашние сельскохозяйственные животные и птицы [3, 5, 6]. Описаны как спорадические случаи кампилобактериозной инфекции, так и вспышки, связанные с употреблением инфицированных пищевых продуктов и воды [7]. Все это требует изучения особенностей эпидемиологии кампилобактериоза в различных регионах и оценки местных условий, влияющих на распространенность инфекции.

Целью наших исследований являлось изучение современных особенностей эпидемиологии кампилобактериозов в Азербайджане.

Материалы и методы

Решение поставленных в работе задач осуществлялось комплексно, с применением эпидемиологических, микробиологических, статистических методов исследования. Собственные исследования проводили с использованием стандартных, общепринятых методов. Выделение возбудителей из разных объектов и их бактериологический диагноз осуществляли в соответствии с методическими указаниями «Лабораторная диагностика кампилобактериоза человека и животных, обнаружение кампилобактеров в кормах, продуктах питания и объектах внешней среды» (Москва, 1991). Бактериологические посеы исследуемого материала производили на полужидкий агар и плотную селективную среду с добавлением 5 % ферментативного гидролизина. Если исследуемый материал не представлялось возможным сразу засеять на селективную среду, его помещали в среду сохранения: тиаглицоловый бульон или щелочную пептонную воду с редуцирующими веществами (тиаглицолат натрия и цистеин). Нативный материал

сохраняли в консерванте при температуре 40 °С. При выращивании кампилобактеров на селективных средах использовали анаэроустаты, позволяющие поддерживать низкое содержание кислорода (5–10 %) в среде инкубации. Серологические свойства изолятов *Campylobacter* изучали в реакции агглютинации (РА) и реакции коагглютинации (РКОА).

Статистическая обработка полученных результатов исследования проводилась общепринятыми методами вариационной статистики.

Результаты и обсуждение

Несомненно, что группу повышенного риска в отношении кампилобактериоза составляют дети, у которых это заболевание регистрируется наиболее часто. Особенно восприимчивы к инфицированию кампилобактерами дети в возрасте до 2 лет. Частота регистрации инфекции у детей от 0 до 3 лет превосходит в 3–4 раза соответствующие показатели для взрослых [2, 3].

Полученные данные свидетельствуют о том, что в современный период кампилобактериозы являются болезнью преимущественно раннего детского возраста (табл. 1).

Обследование различных контингентов позволило выявить частоту инфицирования кампилобактерами различных групп населения (табл. 2).

Как следует из полученных данных, наиболее часто выявлялось бессимптомное носительство кампи-

Таблица 1

Распределение заболевших кампилобактериозом по возрастным группам

Возрастные группы, лет	Число обследованных	Число выявленных	Удельный вес больных кампилобактериозом, %
1–7	136	24	17,6±3,4
8–16	117	15	12,8±3,1
17–30	121	8	6,6±2,3
31–55	84	5	5,9±2,5
Всего	458	52	11,3±1,5

Таблица 2

Частота выявления бессимптомного носительства кампилобактеров при обследовании различных контингентов

Контингенты здоровых лиц	Всего обследовано	Выявлены кампилобактеры	
		Абс.	%
Новорожденные	53	3	6,5±3,3
Дети детских учреждений	68	5	7,2±3,1
Школьники	45	3	6,4±3,6
Обслуживающий персонал детских дошкольных учреждений	36	0	0
Работники пищеблоков	48	2	4,4±2,9
Работники животноводства	51	5	8,8±3,9
Лица переболевшие кампилобактериозом	24	3	12,1±6,6
<i>Итого</i>	325	21	6,4±3

лобактеров среди лиц, переболевших кампилобактериозом и работников животноводства, соответственно (12,1±6,6) и (8,8±3,9) %. Высокий удельный вес бактерионосительства кампилобактеров отмечается у детей, в ДДУ – (7,2±3,1) %, в школах – (6,4±3,6) %, среди новорожденных – (6,5±3,3) %.

Кампилобактериозы относятся к инфекциям с фекально-оральным механизмом передачи, поэтому в эпидемиологическом процессе роль различных объектов внешней среды исключительно важна. Важное значение имеет постоянный контроль состояния загрязненности внешней среды кампилобактерами.

Нами проводились исследования состояния загрязненности внешней среды кампилобактерами. В передаче кампилобактериозов участвует огромное число объектов окружающей среды (ООС), и исследование каждого из них в объемах, достаточных для выявления закономерностей этиологической структуры, практически невозможно. В связи с этим мы все объекты сгруппировали в 3 группы, и с каждой группы исследовали те объекты, которые как по данным литературы, так и в соответствии с текущей эпидемиологической ситуацией представляют наибольшую значимость. В основном, исследовались пробы воды, смывы с различных предметов и пищевых продуктов. За истекшее время было исследовано соответственно 340, 254 и 120 проб (табл. 3).

Так, кампилобактеры были обнаружены в 11 пробах воды – (3,14±0,9) %, в 5 смывах с различных предметов (1,8±0,6) %, $t=12,00$, $p<0,001$, и 5 смывах

Таблица 4

Инфицированность кампилобактерами синантропных птиц и грызунов

Виды синантропных птиц и грызунов	Число обследованных	Число инфицированных	
		Абс.	%
Крысы	180	42	23,8±3,1
Куры	120	51	42,5±4,5
Гуси	25	5	18,4±6,7
Утки	36	11	31,0±7,7
<i>Всего</i>	361	109	30,2±2,4

Таблица 3

Частота выявления кампилобактеров при обследовании различных объектов окружающей среды

ООС	Всего обследовано	Всего выявлено	Удельный вес, %
Пробы воды	340	11	3,14±0,9
Смывы с предметов	254	5	1,8±0,6
Пищевые продукты	120	5	4,2±0,8
<i>Всего</i>	714	21	2,9±0,5

с пищевых продуктов (4,2±0,8) %, $t=10,60$, $p<0,001$. Повсеместное распространение кампилобактериоза, многообразие эпидемических проявлений обусловлено широким диапазоном толерантности возбудителя к факторам среды, и позволяет ему, в свою очередь, обитать в организме широкого круга хозяев – позвоночных и беспозвоночных животных, птиц, рыб, некоторых растений. Снижение заболеваемости кампилобактериозами людей неотъемлемо связано с профилактикой этих инфекций среди животных и птиц – основных источников заболеваний. Большинство исследователей проблемы эпидемиологии кампилобактериоза считают, что основным источником возбудителя инфекции при кампилобактериозе являются животные и птицы, причем ведущая роль принадлежит птицам и, прежде всего, курам. Как показали проведенные исследования, именно куры, разделка которых осуществляется на кухнях, являются основным источником возбудителя кампилобактериоза в республике, обусловив заболевания в 45,5 % всех изученных очагов этой инфекции. Наши исследования птиц и грызунов в республике выявили их высокую инфицированность кампилобактерами. Данные по инфицированности синантропных птиц и грызунов представлены в табл. 4.

Менее всего оказались инфицированными гуси – (18,4±6,7) %. Мало отличалась и инфицированность крыс – (23,8±3,1) %, $t=0,86$, $p>0,05$. Инфицированность уток составила (31,0±7,7) %, $t=3,12$, $p<0,001$, наивысшего показателя инфицированности достигается у кур – (42,5±4,5) %, $t=2,32$, $p<0,01$. Установлена инфицированность кампилобактерами животных в республике (табл. 5).

Инфицированность животных кампилобактерами варьирует от (35,0±6,5) до (52,4±6,2) %, $t=3,14$, $p>0,05$. Зараженность кампилобактерами животных и птиц разного возраста также значительно отличается. Так, инфицированность телят значительно выше,

Таблица 5

Инфицированность животных кампилобактериозом

Животные	Число обследованных животных	Число инфицированных животных	
		Абс.	%
Коровы	80	38	48,0±5,6
Овцы	48	28	35,0±6,5
Телята	64	42	52,4±6,2
<i>Всего</i>	192	108	56,2±3,4

Таблица 6

Инфицированность кур кампилобактерами в зависимости от возраста

Возраст кур	Число исследованных проб	Число инфицированных проб	
		Абс.	%
Цыплята 1 день	18	2	15,6±7,7
Куры 1 мес.	32	8	25,6±7,7
Куры 3–4 мес	46	15	33,4±6,9
Куры 7–8 мес	38	25	67,0±7,0
Куры 14–15 мес	26	20	76,4±8,3
Смывы с яиц	25	3	13,8±6,8
Всего	185	73	39,4±3,6

чем коров. Частота выделения кампилобактеров у кур была прослежена нами, начиная с яйца до возраста 15 мес. (табл. 6).

Как видно, наиболее инфицированы кампилобактерами куры 14–15 мес. – (76,4±8,3) %, сильно инфицированы и куры 7–8 мес. – (67,0±7,0) %, $t=1,15$, $P>0,05$. Инфицированию подвергаются, хотя и в меньшей степени, куры 3–4 мес. – (33,4±6,9) %, $t=3,32$, $p<0,001$, смывы с яиц, цыплята 1 день и куры 1 мес. – от (13,8±6,8) до (15,6±7,7) %, $t=0,26$, $p>0,05$.

При изучении инфицированности кампилобактерами лиц, находящихся в постоянном контакте с животными и птицами, возбудитель был обнаружен у 1 из 16 работников зоопарка (6,5 %), только у тех, которые ухаживали за больными животными (табл. 7).

Наиболее инфицированы кампилобактерами работники птицефермы (16,1±4,8) %, у работников молочной фермы инфицированность несколько снижается (14,8±4,8) %, $t=0,55$, $p>0,05$. Еще больше уменьшается степень инфицированных лиц, общавшихся с больным в очаге кампилобактериоза – (4,0±2,2) %, $t=1,16$, $p>0,05$.

Учитывая сказанное выше можно утверждать, что передача возбудителей инфекции при кампилобактериозе возможна как от больного человека, так и от больного животного только в случае тесного контакта в процессе ухода за ним. Широкая циркуляция кампилобактеров у крупного рогатого скота и других животных, птиц сопровождается значительной контаминацией кампилобактерами объектов внешней среды. Несомненно, что при постоянном загрязнении фекалиями, содержащими кампилобактеры, объектов внешней среды, последние играют роль факторов передачи возбудителей инфекции.

Таким образом, на процесс распространения возбудителя кампилобактериоза среди сельскохозяйственных птиц влияет комплекс факторов, в их число входят условия содержания птиц и занос возбудителя извне (с кормом и т.п.). Неудовлетворительные санитарно-гигиенические условия в птицефермах и высокий уровень инфицированности кур приводит к интенсивному загрязнению разных объектов внешней среды кампилобактерами. Поэтому первоочередной задачей явился отбор тех объектов, которые

Таблица 7

Выявление кампилобактерий у лиц, общавшихся с источником инфекции

Социально-хозяйственные группы жителей	Число обследованных	Число инфицированных	
		Абс.	%
Работники птицефермы	62	10	16,1±4,8
Работники молочной фермы	54	8	14,8±4,8
Работники зоопарка	16	1	6,5
Контактные с больными лица	75	3	4,0±2,2
Всего	207	22	10,6±2,1

действительно могут подвергаться загрязнению кампилобактерами, по своим функциональным характеристикам обеспечивать циркуляцию инфекции среди людей, животных и птиц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воробьев А.А., Сичинский Л.А., Дратвин С.А. Возможности лабораторной диагностики инфекций, вызванных бактериями рода *Campylobacter*. Журн. микробиол. 2000; 1:95–103.
2. Подколзин А.Т., Мухина А.А., Шумилин Г.А. и др. Изучение этиологии острых кишечных инфекций у детей, госпитализированных в инфекционные отделения стационаров Москвы. Инф. бол. 2004; 2(4):85–91.
3. Eastwood K., Schuster H., Gascoyne-Binzi D. Comparison of real-time PCR and direct culture for the detection of *Campylobacter* spp. from human faecal samples. In: 17-th European Congress of Clinical ICC; 2007 Mar. 31 – Apr. 4; Germany. 2007. Vol. 13. P. S1–S727.
4. LaGier M.J., Joseph L.A., Passaretti T.V. et al. A real-time multiplexed PCR assay for rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Mol. Cell. Prob. 2004; 18(4):275–82.
5. Nachamkin I. Chronic effects of *Campylobacter* infection. Microbes Infect. 2002; 4(4):399–403.
6. Takahashi M., Koga M., Yokoyama K., Yuki N. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Guillain-Barre and Fisher syndromes in Japan. J. Clin. Microbiol. 2005; 43(1):335–9.
7. Tam C.C., Rodrigues L.C., O'Brien S.J. Guillain-Barre syndrome associated with *Campylobacter jejuni* infection in England, 2000–2001. Clin. Infect. Dis. 2003; 37:307–10.

N.M.Ustun

Modern Particularities of Campylobacteriosis Epidemiology in Azerbaijan

S.Immamaliyev Azerbaidjan Republican Anti-Plague Station, Baku

The process of campylobacteriosis agent distribution among agricultural poultry was shown to depend upon a number of factors including conditions of maintenance and importation of the agent (with feed and etc.). Unsatisfactory sanitary conditions of poultry farms and high level of infection among hens lead to intensive contamination of different environmental objects with campylobacters. Therefore, the first priority is to select those objects which can really be exposed to contamination with campylobacters and provide circulation of infection among people, animals and poultry due to their functional characteristics.

Key words: campylobacteriosis, epidemiological features, prevalence.

Об авторах:

Устун Н.М. Азербайджанская Республиканская Противочумная станция им. С.Иммалиева. Азербайджанская Республика, Баку. E-mail: ustunnermin@yahoo.com

Authors:

Ustun N.M. S.Immamaliyev Azerbaidjan Republican Anti-Plague Station. Azerbaidjan Republic, Baku. E-mail: ustunnermin@yahoo.com

Поступила 28.05.10.

А.М.Барков, И.А.Баркова, В.В.Алексеев, А.В.Липницкий, М.Я.Кулаков

ОБНАРУЖЕНИЕ АНТИТЕЛ К ПРОТЕКТИВНОМУ АНТИГЕНУ *BACILLUS ANTHRACIS* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕАКЦИИ НЕПРЯМОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ И ТВЕРДОФАЗНОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО МЕТОДА

ФГУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт»

Протективный антиген, выделенный гель-хроматографией с помощью сефакрила S-300 из КФ штамма *B. anthracis* СТИ, использован для обнаружения антител. Чувствительность РНГА и ТИФМ с гипериммунной сывороткой к ПА соответствовала титрам 1:128000 – 1:256000. Специфическая активность РНГА с сыворотками 22 морских свинок, выживших после заражения *B. anthracis* 81/1, была в титре 1:40 – 1:81920, ТИФМ – 1:160 – 1:81920. В сыворотках больных сибирской язвой титры антител обнаружены в РНГА в титрах 1:20 – 1:20480, в ТИФМ – 1:800 – 1:12800. Отмечено нарастание титра антител в парных сыворотках в зависимости от срока заболевания. Специфичность РНГА подтверждена РТНГА с ПА. Оба метода равнозначны для диагностики заболевания, однако преимущество РНГА в простоте, скорости постановки и учета результатов.

Ключевые слова: протективный антиген (ПА), эритроцитарный диагностикум, реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), реакция торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА), твердофазный иммуноферментный метод (ТИФМ).

Протективный антиген (ПА) один из основных компонентов сибиреязвенного токсина, который играет ведущую роль в патогенезе заболевания.

Твердофазный иммуноферментный метод (ТИФМ) с ПА широко использовался для определения антител в сыворотках животных, людей при изучении химических и живых вакцин, а также для диагностики сибирской язвы при эпидемических вспышках и биотеррористическом акте в США 2001 г. [13, 14, 16]. Эритроцитарные диагностикумы, полученные на основе ПА, выделенного из культурального фильтрата различными способами, отличались по специфичности и чувствительности [1, 7, 12].

При обнаружении антител к ПА в сыворотках экспериментальных животных, вакцинированных и больных сибирской язвой лиц одни авторы указывают на более высокую чувствительность ТИФМ, по данным других – реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) и ТИФМ равноценны, однако отмечена нестабильность эритроцитарных диагностикумов, полученных с использованием не обработанных формалином эритроцитов [1, 12].

В предыдущих работах мы сообщали о выделении из культурального фильтрата токсинпродуцирующего штамма *B. anthracis* СТИ гель-хроматографией на сефакриле S-300 доминирующего белка, который элюировался в объеме фракции 5 и идентифицирован как протективный антиген (ПА) [2, 3, 8].

В настоящее время в РФ не зарегистрировано сертифицированных эритроцитарных диагностикумов и иммуноферментных тест-систем для обнаружения антител к протективному антигену [10].

Цель работы – определить возможность использования протективного антигена, выделенного гель-хроматографией из культурального фильтрата

токсинпродуцирующего штамма, для обнаружения антител к возбудителю сибирской язвы в РНГА и ТИФМ.

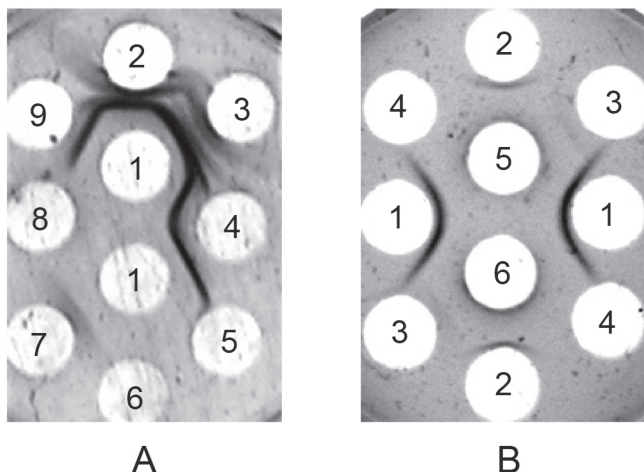
Материалы и методы

Антитела к возбудителю сибирской язвы определяли в 22 сыворотках морских свинок, выживших после заражения *B. anthracis* 81/1, а также в парных сыворотках 5 больных кожной формой сибирской язвы. Сыворотки от выживших животных взяты на 21–35-й день после заражения. В качестве отрицательного контроля использованы сыворотки 10 интактных животных и 32 сыворотки практически здоровых людей. В качестве контрольного положительного образца служила гипериммунная кроличья сыворотка (кролик № 903) к фракции 5, которая выделена гель-хроматографией из культурального фильтрата *B. anthracis* СТИ и охарактеризована как ПА [2]. К сывороткам добавляли мертиолат 1:10000, инактивировали при 56 °С в течение 30 мин, хранили при 4 °С.

Специфическую активность сывороток морских свинок и больных людей изучали в реакции иммунодиффузии в геле (РИД) [11] с культуральными фильтратами штаммов: токсинпродуцирующего – *B. anthracis* СТИ (pXO1⁺, pXO2⁻); капсулообразующего – *B. anthracis* Davies (pXO1⁻, pXO2⁺); бесплазмидного – *B. anthracis* 81/1TR (pXO1⁻, pXO2⁻), коллекция патогенных бактерий Волгоград НИПЧИ.

Антигенный эритроцитарный диагностикум получали с использованием формализованных эритроцитов барана, которые перед сенсibilизацией обрабатывали алкилсульфатом натрия (АСН) [9].

РНГА и РТНГА ставили в микроварианте по



Реакция иммунодиффузии в геле с сыворотками:

А – больных кожной формой сибирской язвы:

1 – культуральный фильтрат *B. anthracis* СТИ в разведении 1:4;

2 и 3 – кроличья сыворотка к фракции 5 культурального фильтрата

B. anthracis СТИ целая и в разведении 1:2; 4 и 5 – сыворотки больного Ф., взятые на 5-е и 14-е сутки заболевания; 6 и 7 – сыворотки больного Г., взятые на 6-е и 15-е сутки заболевания; 8 и 9 – сыворотки больного Л., взятые на 2-е и 16-е сутки заболевания.

В – морских свинок, выживших после заражения сибирской язвой:

1 – фракция 5 (ПА) культурального фильтрата *B. anthracis* СТИ;

2 – культуральный фильтрат *B. anthracis* СТИ; 3 – культуральный фильтрат *B. anthracis* 81/1 TR; 4 – культуральный фильтрат *B. anthracis* Davies; 5 и 6 – сыворотки морских свинок, получивших НАФ и выживших после заражения *B. anthracis* 81/1

общепринятой методике в объеме 100 мкл с 1 % эритроцитарным диагностикумом [11].

В качестве разводящей жидкости (РЖ) использовали фосфатно-солевой буферный раствор, pH 7,2±0,2, (ФБР) с 0,05 мл твин-20 «Serva» (ФБРТ), 5 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (БСА), ТУ 644-2-278-79, с 1 % формалина.

При постановке РНГА сыворотки титровали в разводящей жидкости в равном объеме (по 50 мл), к которому добавляли 25 мкл разводящей жидкости и 25 мкл 1 % эритроцитарного диагностикума. В РТНГА сыворотки титровали как в РНГА, во все лунки добавляли 25 мкл ПА с концентрацией 10 мкг/мл, после 30 мин инкубации вносили диагностикум.

Для выявления иммуноглобулинов в ТИФМ использованы антивидовые иммунопероксидазные конъюгаты «Медгамал», тетраметилбензидин (ТМБ) «Serva» и полистироловые планшеты фирмы «Costar». Результат учитывали на микропланшетном фотометре для иммуноферментного анализа Stat Fax 2100 Awareness Technology ОП_{проб} > 0,4, ОП_{контролей} < 0,2.

Результаты и обсуждение

При изучении в РИД с культуральным фильтратом токсинпродуцирующего штамма парные сыворотки больных кожной формой сибирской язвы, полученные на 4–6-е сутки заболевания, иммунопреципитаты не образовывали, а сыворотки, взятые на 14–16-е сутки заболевания, и контрольная положительная сыворотка выявляли идентичный антиген (рисунок, А).

Сыворотки морских свинок, которым вводили неполный адъювант Фрейнда (НАФ) по схеме иммунизации и выжившие после заражения спорами *B. anthracis* 81/1, реагировали с антигенами фракции 5 культурального фильтрата токсинпродуцирующего штамма и не выявляли антигены культуральных фильтратов бесплазмидного и капсулообразующего штаммов, что свидетельствовало о наличии в сыворотках антител к протективному антигену сибиреязвенного микроба (рисунок, В).

Сыворотки экспериментальных животных и больных сибирской язвой людей исследованы в РНГА и ТИФМ.

При получении антигенного эритроцитарного диагностикума 10 % формализованные эритроциты инкубированы при 45 °С в течение 15 мин с алкилсульфатом натрия в конечной концентрации 0,3 %, затем сенсibilизированы различными дозами ПА.

Оптимальная сенсibilизирующая доза для 10 % взвеси эритроцитов установлена в концентрации ПА 300 мкг/мл белка, для планшет «Costar» – 10 мкг/мл.

Чувствительность ТИФМ и РНГА с контрольной положительной сывороткой к ПА оказалась практически одинаковой и соответствовала титрам 1:128000 – 1:256000.

При проверке специфичности РНГА и ТИФМ с 6 сыворотками интактных морских свинок и 4 сыворотками морских свинок, получивших НАФ, ложноположительные результаты получены в титрах: РНГА ≤ 1:5, ТИФМ ≤ 1:80 (ОП < 0,4). С 32 сыворотками практически здоровых людей ложноположительные результаты были в титрах РНГА ≤ 1:10, ТИФМ ≤ 1:200 (ОП < 0,4).

Диагностический титр для сывороток морских свинок и людей установлен соответственно в РНГА 1:10 и 1:20, в ТИФМ 1:160 и 1:400 (ОП > 0,4).

Как следует из обобщенных результатов по изучению специфической активности (табл. 1), с 22 сыворотками не иммунизированных и иммунизированных морских свинок, выживших на 21-й и 35-й день после заражения различными дозами возбудителя сибирской язвы, получены положительные результаты в РНГА и ТИФМ соответственно в титрах 1:40 – 1:81920 и 1:160 – 1:81920.

С сыворотками людей, больных кожной формой сибирской язвы, положительные результаты РНГА были в титрах 1:20 – 1:20480, в ТИФМ – 1:800 – 1:12800. Отмечено нарастание титра антител в сыворотках больных в зависимости от срока заболевания (табл. 2).

Специфичность РНГА подтверждена РТНГА с ПА в концентрации 10 мкг/мл, в которой отмечено снижение титров: с 1:128000 до 1:2000, с 1:40960 до 1:320, с 1:5120 до 1:40.

Результаты РТНГА свидетельствовали, что на сенсibilизированных эритроцитах адсорбирован антиген, антитела к которому содержатся в контрольной положительной сыворотке к ПА, в сыворотках зараженных морских свинок и больных сибирской

Таблица 1

Специфичность и специфическая активность РНГА и ТИФМ при обнаружении антител к ПА в сыворотках морских свинок, зараженных и не зараженных спорами сибирской язвы				
Иммунизация	Заражающая доза (СП)	Количество выживших/зараженных	Обратные титры	
			РНГА	ТИФМ
<i>B. anthracis</i> 81/1R (pXO1 ⁺ , pXO2 ⁻)	6·10 ¹	3/5	40960	10240
			640	1280
			1280	2560
	6·10 ²	3/5	10240	81920
1-й фракцией* <i>B. anthracis</i> 81/1TR (pXO1 ⁺ , pXO2 ⁻)	2·10 ³	4/5	20480	10240
			1280	5120
			1280	>1280
	2·10 ³	4/5	10	320
7-й фракцией* <i>B. anthracis</i> СТИ (pXO1 ⁺ , pXO2 ⁻)	2·10 ³	4/5	81920	81920
			1280	2560
			40960	81920
	2·10 ³	4/5	2560	81920
5-й фракцией* <i>B. anthracis</i> СТИ (pXO1 ⁺ , pXO2 ⁻)	2·10 ⁴	3/5	81920	81920
			81920	81920
			20480	81920
	2·10 ⁴	3/5	81920	81920
Введение НАФ по схеме иммунизации	5·10 ¹	2/5	10	<80
			1280	640
			160	320
	2·10 ²	2/5	40	320
Интактные животные	Не заражали	4	≤5	≤80
			≤5	≤80
Сыворотка к ПА, кролик № 903		1	128000	256000

Примечание: НАФ – неполный адъювант Фрейнда, СП – споры, * – препараты вводили с НАФ.

язвой людей.

В результате проведенных нами исследований показано, что ПА, содержащийся во фракции 5, может использоваться в РНГА и ТИФМ для обнаружения сибиреязвенных антител. Сыворотка к фракции 5 содержала антитела к белку молекулярной массы 84 кДа, соответствующей ПА, который был доминирующим в культуральном фильтрате токсинпродуцирующего штамма и обладал протективными свойствами [2, 3, 8]. Принадлежность к ПА белков фракции 5 также подтверждают данные РИД, где сыворотки морских свинок, выживших после заражения *B. anthracis* 81/1, содержали антитела к антигену фракции 5 и не реагировали с антигенами культуральных фильтратов бессплозидного и капсулообразующего штаммов, не продуцирующих ПА.

Наличие антител в сыворотках выживших морских свинок, которым вводили неполный адъювант Фрейнда до заражения, может свидетельствовать о последовательном развитии факторов неспецифической и специфической резистентности. Повидимому, предшествующее заражению введение НАФ стиму-

Таблица 2

Специфичность и специфическая активность РНГА и ТИФМ при обнаружении антител к ПА в сыворотках людей, больных кожной формой сибирской язвы				
Сыворотки больных	Дата заболевания	Дата получения сывороток	Обратные титры	
			РНГА	ТИФМ
Ф	4.09.03	16.09.03	10240	12800
		18.09.03	20480	12800
Л	16.09.03	18.09.03	20	800
		2.10.03	2560	6400
Г	3.09.03	9.09.03	20	800
		18.09.03	1280	3200
Лт*	14.09.09	22.09.08	20	800
		13.10.08	40	800
Лн*	14.09.09	22.09.08	20	800
		13.10.08	160	1600
32 сыворотки лиц контрольной группы		04.2005	29 сыв – 5; 11 сыв – 200; 3 сыв – 10	21 сыв ≤200
Сыворотка к ПА, кролик № 903		06.2002	128000	256000

*Более низкие титры антител к ПА в сыворотках больных Лт и Лн обусловлены антибиотикотерапией, начатой в ранние сроки заболевания.

лировало фагоцитарную активность, которая на начальных этапах заболевания сибирской язвой играет немаловажную роль [6, 8]. Специфическая резистентность морских свинок подтверждена наличием сибиреязвенных антител в сыворотках животных, выживших после заражения.

Следовательно, путем активации факторов неспецифической резистентности, возможно моделирование сибиреязвенной инфекции с изучением динамики антител к антигенам *B. anthracis* при остром течении заболевания и в процессе выздоровления животных. Использование данного метода позволило получить сыворотки морских свинок, зараженных до 2·10² спор *B. anthracis* 81/1 [4].

Специфическая активность обоих тестов при исследовании сывороток людей, больных кожной формой сибирской язвы, и морских свинок, выживших после заражения, оказалась практически одинаковой. Сыворотки людей, больных кожной формой сибирской язвы, содержали антитела, определяемые в РНГА в титрах 1:20 – 1:20480, в ТИФМ 1:800 – 1:12800. С сыворотками морских свинок, выживших после заражения, титры РНГА и ТИФМ составили соответственно 1:40 – 1:81920 и 1:160 – 1:81920.

Таким образом, ТИФМ с ПА и РНГА с эритроцитарным диагностикумом, полученным на основе стабилизированных формалином эритроцитов, сенсibilизированных протективным антигеном с использованием алкилсульфата натрия в качестве конъюгирующего компонента, характеризуются высокой чувствительностью и специфической активностью и могут использоваться для диагностики сибирской язвы.

Учитывая практически одинаковую диагностическую чувствительность и специфичность диагностик эритроцитарного сибирезавенного антигенного и иммуноферментной тест-системы для обнаружения антител к ПА, технологичность изготовления, стоимость производства эритроцитарного диагностик, простоту, небольшое время постановки и учета результатов РНГА и РТНГА, предпочтительней использование эритроцитарного диагностик.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абалакин В.А., Сергеева Л.В., Черкасский Б.Л. Выявление специфических антигенов при экспериментальной сибирской язве. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1989; 12:63–7.
2. Баркова И.А., Липницкий А.В., Барков А.М., Евтеева Е.В. Использование иммуноглобулинов к отдельным внеклеточным антигенам *Bacillus anthracis* СТИ для идентификации сибирезавенного микроба. Биотехнология. 2005; 2: 91–5.
3. Баркова И.А., Алексеев В.В., Липницкий А.В., Барков А.М., Буханцова Л.В. Продукция белков S-слоя разными штаммами *Bacillus anthracis*. Пробл. особо опасных инф. 2008; 4(98):29–32.
4. Баркова И.А., Липницкий А.В., Барков А.М. Способ получения иммунной сыворотки к антигенам вирулентного штамма *Bacillus anthracis*. Патент № 2252031, опубл. 20.05.2005. Бюл. № 14.
5. Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Кравченко Т.Б. и др. Сибирская язва: ранние этапы внутриклеточной стадии развития инфекции. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2005; 4:3–8.
6. Дубровина В.И., Голубинский Е.П., Колесникова О.Б. Показатели неспецифической резистентности морских свинок, иммунизированных *Bacillus anthracis* СТИ-1 и комплексом его антигенов. Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2004; 1(2):73–6.
7. Леви М.И., Езепчук Ю.В., Немецова М.А. Применение протективного антигена для реакции пассивной гемагглютинации при сибирской язве. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1968; 10:132–4.
8. Ермакова И.А., Липницкий А.В., Барков А.М. Способ выделения высокомолекулярного соматического сибирезавенного антигена. Патент № 2230570, опубл. 20.06.2004. Бюл. № 17.
9. Меньшов П.И., Шмугер М.Ф. Подбор оптимальных методов формализации эритроцитов для приготовления стойких диагностиков для чумы и бруцеллеза. Пробл. особо опасных инф. 1969; 6:231–2.
10. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. М.: Медицина; 2009. 472 с.
11. Фримель Г., редактор. Иммунологические методы. М.: Медицина; 1987. 472 с.

12. Buchanan T.M., Feeley J.C., Haues P.S., Brachman P.S. Anthrax in direct hemagglutination test. J. Immunol. 1971; 107:1631–6.
13. Ivins B.E., Ezzell J.W., Jemski J. et al. Immunization Studies with Attenuated Strains of *Bacillus anthracis*. Infect. Immun. 1986; 52:454–8.
14. Jernigan D.B., Raghunathan P.L., Bell B.P. et al. Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: epidemiologic findings. J. Emer. Infect. Dis. 2002; 8(10):1019–29.
15. Johnson-Winegar A. Comparison of enzyme-linked immunosorbent and indirect hemagglutination assays for determining anthrax antibodies. J. Clin. Microbiol. 1984; 20(3):357–61.
16. Little S.F., Knudson G.B. Comparative Efficacy of *Bacillus anthracis* Live Spore Vaccine and Protective Antigen Vaccine against Anthrax in the Guinea Pig. Infect. Immun. 1986; 52:509–12.

А.М.Барков, И.А.Баркова, В.В.Алексеев, А.В.Липницкий, М.Я.Кулаков

Detection of Antibodies to Protective Antigen of *Bacillus anthracis* Using Indirect Hemagglutination Test and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

Volgograd Research Anti-Plague Institute

Protective antigen, isolated by gel chromatography with the help of sephacril S-300 from the cultural filtrate of *B. anthracis* strain STI, was used to detect antibodies. Sensitivity of IHA and ELISA with hyperimmune serum to PA corresponded to the titers 1:128000 – 1:256000. Specific activity of IHA with sera of 22 guinea-pigs survived after challenging with *B. anthracis* 81/1, was in titers 1:40 – 1:81920, that of the ELISA – 1:160 – 1:81920. In the sera of anthrax patients antibodies were detected in IHA in titers of 1:20 – 1:20480, in ELISA – 1:800 – 1:12800. The titers of antibodies in paired sera were demonstrated to increase depending on the period of the disease. Specificity of IHA was confirmed by IHIA with PA. Both methods are equally applicable for anthrax diagnosis, however IHA possesses some benefits, i.e. simplicity, rapid performance and registration of the results.

Key words: protective antigen (PA), erythrocyte diagnosticum, indirect hemagglutination assay (IHA), indirect hemagglutination inhibition assay (IHIA), solid phase enzyme-linked immunoassay (SPELIA).

Об авторах:

Барков А.М., Баркова И.А., Алексеев В.В., Липницкий А.В., Кулаков М.Я. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Authors:

Barkov A.M., Barkova I.A., Alekseev V.V., Lipnitskiy A.V., Kulakov M.Ya. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 400131, Volgograd, Golubinskaya St., 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Поступила 02.02.10.

А.Ю.Гончарова, Н.И.Микшис, О.М.Кудрявцева, М.Ф.Болотникова, Л.В.Новикова,
Г.Г.Красичков, Т.В.Аленкина, Ю.А.Попов

ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К БЕЛКАМ S-СЛОЯ *B. ANTHRACIS* И ИЗУЧЕНИЕ ИХ СПЕЦИФИЧНОСТИ В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ

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

Получены очищенные препараты белков S-слоя возбудителя сибирской язвы – Sap и EA1. Разработана схема иммунизации лабораторных животных, позволившая получить поликлональные кроличьи антитела к белкам Sap и EA1 в высоком титре. В твердофазном иммуноферментном анализе и дот-иммуноанализе с использованием поликлональных анти-Sap и анти-EA1 антител протестировано 12 штаммов сибиреязвенного микроба, 53 штамма близкородственных бацилл и 4 штамма других гетерогенных бактерий. При изучении специфичности полученных антител выявлены перекрестные взаимодействия с отдельными штаммами *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. mycoides* и *B. megaterium*. Специфичность поликлональных анти-EA1 и анти-Sap антител составила 75 и 83 % соответственно. Чувствительность реакции при использовании поликлональных антител к белкам S-слоя *B. anthracis* составила 10^5 – 10^6 м.кл.

Ключевые слова: *B. anthracis*, поликлональные антитела, S-слой, белки Sap и EA1, иммуноферментный анализ.

Сибирская язва – острое зооантропонозное заболевание, широко распространенное во многих странах мира, в том числе на территории России. Способность возбудителя этой инфекции – *Bacillus anthracis* – к спорообразованию позволяет ему длительное время сохраняться в жизнеспособном состоянии в окружающей среде, создавая постоянную угрозу возникновения эпизоотий и эпидемий сибирской язвы. Кроме того, не исключена вероятность использования спор *B. anthracis* для биотеррористических актов. Рассылка в США в 2001 г. контаминированной спорами *B. anthracis* корреспонденции привела к заболеванию одиннадцати и гибели пяти человек от легочной формы сибирской язвы. Все это определяет актуальность исследований, направленных на совершенствование диагностики сибиреязвенной инфекции.

Основой экспериментальных иммунодиагностических тест-систем, предназначенных для выявления возбудителя сибирской язвы, чаще всего служат антитела к споровым антигенам или к компонентам сибиреязвенного токсина [1, 6, 9]. Использование протеомного анализа позволило установить, что наряду с классическими антигенами, у возбудителя сибирской язвы серологической активностью обладают около 50 белков [5]. Среди них присутствуют и белки поверхностного S-слоя *B. anthracis* – Sap и EA1. Синтез компонентов S-слоя детерминруется генами, расположенными на хромосоме *B. anthracis*, в отличие от сибиреязвенного токсина, кодируемого плазмидными генами. Установлено, что Sap и EA1 последовательно присутствуют на клеточной поверхности. В процессе роста возбудителя сибирской язвы происходит саморегулируемое переключение от Sap-S-слоя к EA1-S-слою [7, 8].

Целью исследования было получение белков S-слоя, а также поликлональных антител к ним и оценка возможности их использования в конструировании диагностических препаратов.

Материалы и методы

Штаммы. В работе использовали 12 штаммов сибиреязвенного микроба, 53 штамма близкородственных бацилл (*B. cereus* – 9 штаммов, *B. subtilis* – 15, *B. thuringiensis* – 15, *B. mycoides* – 2, *B. megaterium* – 6, *B. mesentericus* – 4 и *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus* – по 1) и по 1 штамму *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella typhi* и *Francisella tularensis*. Все штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» (Саратов) и Государственного института стандартизации и контроля им. Л.А.Тарасевича (Москва).

Питательные среды. В качестве питательных сред для выращивания бактериальных штаммов использовали L-бульон и агар, (Difco, США). Для выделения белков S-слоя штаммы *B. anthracis* выращивали на оригинальной среде (S-бульоне), предложенной J.Farchaus *et al.* [4] и содержащей (г/л): триптон – 33,0; дрожжевой экстракт – 20,0; L-гистидин – 2,0; натрия хлорид – 7,4; Na_2HPO_4 – 8,0; KH_2PO_4 – 4,0; глюкозу – 2,0 (pH 7,4).

Лабораторные животные. В работе использовали кроликов массой от 2 до 2,5 кг.

Получение антигенов S-слоя сибиреязвенного микроба. Выделение и очистку Sap проводили согласно процедуре, описанной J.Farchaus *et al.* [4].

Выделение EA1 проводили по модифицированной методике J.Ezzell и G.Abshire [3]. Штаммы *B. anthracis* выращивали 16 ч с аэрацией при температуре 37 °C в S-бульоне. Бульонные культуры центрифугировали в течение 30 мин при 10000 об/мин и температуре 5 °C. Клеточную массу ресуспендировали до 0,1 г/мл в экстрагирующем SDS-буфере, содержащем 5 ммоль трис-гидрохлорида, 5 ммоль 2-меркаптоэтанола и 1 % SDS (pH 9,8) и прогревали на водяной бане 30 мин при температуре 70 °C. После центрифугирования супернатант фильтровали

через мембранные фильтры (Millipore, США) с диаметром пор 0,22 мкм. Очистку экстракта проводили хроматографически с использованием в качестве носителя гидроксиапатита (Sigma, США). Элюцию белка EA1 проводили градиентом концентрации фосфата фосфатно-солевого буфера. На последнем этапе препарат диализовали против бидистиллированной воды в течение ночи при температуре 4 °С.

Получение поликлональных антител. Иммунизацию кроликов для получения иммунных сывороток к белкам S-слоя сибиреязвенного микроба проводили по трем схемам. Схема 1 [4]: антигены S-слоя вводили кроликам внутримышечно в дозе 100 мкг с полным адъювантом Фрейнда (в объемном соотношении 1:1) трехкратно. Интервал между первой и второй иммунизацией составил 4 недели, между второй и третьей – 5 сут. Схема 2: антигены вводили кроликам дважды внутримышечно с полным адъювантом Фрейнда и трижды внутривенно в количестве 100 мкг на одну инъекцию с недельными интервалами. Схема 3: очищенные белки в возрастающих дозах (40–60–80–100–120 мкг) вводили кроликам дважды внутримышечно с полным адъювантом Фрейнда и 5 раз внутривенно с недельными интервалами. Титр специфических антител определяли в твердофазном иммуноферментном анализе (ТИФА). Выделение специфических антител из иммунных сывороток осуществляли путем трехкратного осаждения насыщенным раствором сульфата аммония. Полученные иммуноглобулины освобождали от солевых примесей диализом против 0,9 % раствора натрия хлорида в течение ночи при температуре 4 °С.

Постановка иммуноферментных реакций. Для получения супернатантов штаммы выращивали в L-бульоне в течение 16 ч с аэрацией при температуре 37 °С (до концентрации $1 \cdot 10^8$ м.кл./мл). Клетки осаждали центрифугированием в течение 30 мин при скорости вращения ротора 10000 об/мин и температуре 4 °С, а супернатанты стерилизовали через мембранные фильтры (Millipore, США) с диаметром пор 0,22 мкм. Для проведения дот-иммуноанализа препараты супернатантов или микробных взвесей в концентрации $1 \cdot 10^8$ м.кл./мл (по стандарту мутности) наносили по 3 мкл в десяти- или двукратных разведениях на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C (Amersham, США) и инкубировали в растворе 1 % бычьего сывороточного альбумина (БСА). Затем мембрану последовательно инкубировали с кроличьими антителами к соответствующему антигену в разведении 1:200, с мечеными пероксидазой антителами диагностическими против кроличьих иммуноглобулинов (Медгамал, Россия) в разведении 1:1000. Окрашивали мембрану раствором диаминобензидина в течение 30 мин, после чего проводили учет реакции.

Для постановки ТИФА в каждый ряд 96-луночного планшета вносили по 100 мкл исследуемых супернатантов или бактериальных взвесей. После периода инкубации проводили блокировку свободных

сайтов 1 % раствором БСА. Затем в лунки последовательно вносили двукратные разведения кроличьих антител к соответствующим антигенам и меченные пероксидазой антитела диагностические против кроличьих иммуноглобулинов (Медгамал, Россия) в разведении 1:1000. В качестве хромогенного субстрата применяли ортофенилендиамин. Результаты регистрировали с помощью спектрофотометра Multiskan Plus Version 2.01 при длине волны 492 нм.

Результаты и обсуждение

Паракристаллический S-слой сибиреязвенного микроба состоит из двух протеинов – Sap и EA1. Белок Sap синтезируется на начальных стадиях роста микроорганизма, затем в паракристаллической решетке происходит его замещение на EA1, сопровождающееся выделением Sap в супернатант. Белок EA1, напротив, прочно связан с клеточной стенкой и в культуральном фильтрате не обнаруживается [8]. Различия в механизме продукции компонентов S-слоя обусловило различные подходы к выбору штаммов-продуцентов и выделению интересующих нас протеинов.

Ранее нами было установлено, что бесплазмидные производные штаммов *B. anthracis* различаются по способности к продукции белка Sap [2]. Из девяти тестированных бесплазмидных культур сибиреязвенного микроба активными продуцентами белка Sap являются только четыре, в том числе производные штаммов *B. anthracis* Sterne 34F2, *B. anthracis* 71/12. Ввиду подверженности протеинов S-слоя сибиреязвенного микроба протеолитической деградации, в их популяциях селектированы протеазодефицитные варианты – *B. anthracis* 71/12pfPrt[–] и *B. anthracis* Sterne ΔTPrt[–]. Данные штаммы по результатам электрофоретических исследований являются эффективными источниками белка Sap, они не синтезируют капсулу и токсин, характеризуются низкой активностью протеолитических ферментов.

Для выделения белка Sap S-слоя сибиреязвенного микроба культуру *B. anthracis* 71/12pfPrt[–] засеивали в S-бульон и инкубировали при температуре 37 °С с аэрацией в течение 18 ч. Клеточную массу осаждали центрифугированием, супернатанты фильтровали. Хроматографическую очистку проводили с использованием различных носителей – сефарозы CL-4B, Macro Prep 50Q и гидроксиапатита. Выход белкового продукта составил 60–80 мг Sap на 1 л исходной культуры.

Для выделения белка EA1 использовали штамм *B. anthracis* СТИΔТ, обладающий сниженной активностью протеаз. Его культуру выращивали в S-бульоне при температуре 37 °С с аэрацией в течение 16 ч. Микробную взвесь центрифугировали, клеточную массу ресуспендировали в экстрагирующем SDS-буфере и прогревали при температуре 70 °С. Образовавшийся экстракт клеточных стенок фильтровали и диализовали. Очищенный препарат EA1

получали при помощи ионообменной хроматографии на гидроксипатите. Выход составил около 80 мг протеина EA1 на 1 л исходной культуры.

Протеины, выделенные из штаммов *B. anthracis* 71/12pfPr⁺ и *B. anthracis* СТИАТ, были охарактеризованы по молекулярной массе, формируемым паракристаллическим ультраструктурам, аминокислотному составу и расположению на клеточной поверхности и идентифицированы как компоненты S-слоя сибиреязвенного микроба – Sap и EA1.

На следующем этапе оптимизировали схему иммунизации лабораторных животных для получения поликлональных антител к белкам S-слоя. Первоначально антигены S-слоя вводили кроликам внутримышечно в дозе 100 мкг с полным адъювантом Фрейнда трехкратно с интервалами 4 недели и 5 сут, как было предложено J.Farchaus *et al.* [4] (рисунок, схема 1). Титры антител к протеинам S-слоя в ТИФА составили 1:256 – 1:512. Изменение графика иммунизаций за счет дополнительных внутривенных инъекций препаратов и сокращение интервалов между ними до 1 недели позволило увеличить титр сывороток до 1:2000 (рисунок, схема 2). Наилучшей же оказалась следующая схема: семикратная иммунизация кроликов с интервалом в одну неделю возрастающими дозами белковых препаратов (от 40 до 120 мкг). Первые две инъекции осуществлялись внутримышечно, остальные – внутривенно. Разработанная методика позволила получить кроличьи антитела к белкам Sap и EA1 с титрами – 1:4000 – 1:8000 (рисунок, схема 3).

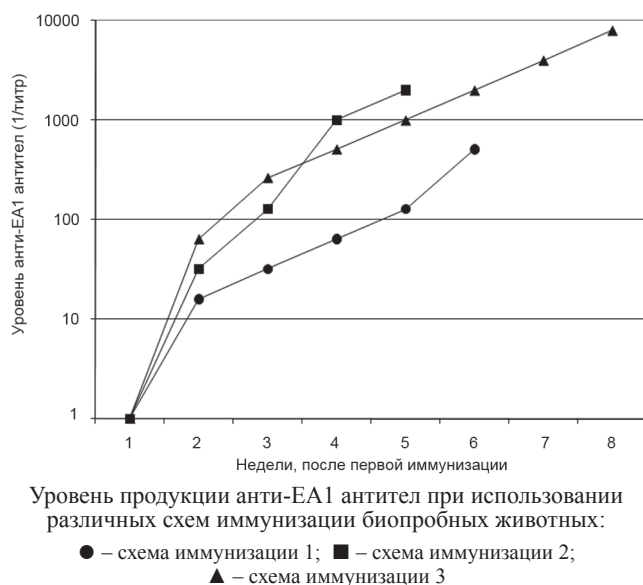
Специфичность поликлональных антител к белкам S-слоя изучали в ИФА с культурами *B. anthracis* и близкородственных бактериальных видов: *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. megaterium*, *B. mesentericus*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, а также гетерологичных микроорганизмов: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *F. tularensis* и *S. typhi*. Для постановки реакций использовали бактериальные взвеси, начиная от максимальной концентрации $1 \cdot 10^8$ м.кл./мл. Учитывая то обстоятельство, что бе-

лок Sap выделяется в процессе роста сибиреязвенного микроба в среду культивирования, тестировали не только взвеси, но и супернатанты исследуемых штаммов, выращенных до той же концентрации микробных клеток.

При проведении дот-анализа отмечали положительную реакцию взаимодействия поликлональных анти-EA1 антител возбудителя сибирской язвы со штаммами *B. anthracis* и отрицательную – со штаммами *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *F. tularensis* и *S. typhi*. Тестирование бактериальных взвесей близкородственных видов (таблица) в трех случаях выявило выраженные перекрестные реакции. Штаммы *B. cereus* 96, *B. subtilis* 35, *B. mesentericus* 5 реагировали с антителами к EA1 до концентраций, определенных для культур сибиреязвенного микроба – $1 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^6$ м.кл./мл. Неспецифические взаимодействия до концентрации $1 \cdot 10^7$ м.кл./мл обнаруживали еще у 4 штаммов *B. cereus*. Отдельные штаммы *B. subtilis* – 2, *B. mycoides* – 1 и *B. megaterium* – 2 давали положительную реакцию только в концентрации $1 \cdot 10^8$ м.кл./мл. При использовании взвесей бациллярных штаммов специфичность полученных поликлональных кроличьих антител к белку EA1 по данным ИФА составила около 75 %. В случаях постановки дот анализа с поликлональными анти-Sap антителами показатель специфичности оказался несколько выше – 83 %. Взаимодействие белков S-слоя сибиреязвенного микроба как с анти-Sap, так и с анти-EA1 антителами объясняется наличием у них высокомолекулярных участков аминокислотных последовательностей [7]. Чувствительность реакций находилась в пределах $1 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^6$ м.кл./мл.

Тестирование полученных поликлональных антител в ИФА (ТИФА, дот-анализ) с использованием супернатантов бактериальных штаммов выявило перекрестные взаимодействия лишь у 4 штаммов *B. cereus* и 1 *B. subtilis*, что составляет около 10 % от общего числа штаммов близкородственных бактериальных видов, взятых в эксперимент (таблица).

Таким образом, из штаммов-продуцентов белков S-слоя – *B. anthracis* 71/12pfPr⁺ и *B. anthracis* СТИАТ выделены и очищены препараты белков Sap и EA1. С помощью разработанной схемы иммунизации получены поликлональные кроличьи антитела к белкам Sap и EA1 в высоком титре. В ИФА с поликлональными анти-Sap и анти-EA1 антителами протестировано 69 штаммов различных бактериальных видов, преимущественно бациллярных. Перекрестные реакции выявлены для отдельных штаммов *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. mycoides* и *B. megaterium*. Специфичность поликлональных антител к белкам S-слоя возбудителя сибирской язвы в дот-анализе с различными микробными взвесями составила от 75 до 83 %, в зависимости от используемых антител. При исследовании супернатантов у 10 % всех тестированных бациллярных штаммов отмечены перекрестные взаимодействия антигенов с анти-Sap и анти-EA1 антителами.



Результаты исследования в дот-анализе штаммов близкородственных бактериальных видов с поликлональными антителами к белкам S-слоя

Штаммы близкородственных бактериальных видов	Антитела к белку EA1		Антитела к белку Sap		Штаммы близкородственных бактериальных видов	Антитела к белку EA1		Антитела к белку Sap	
	супернатант	взвесь	супернатант	взвесь		супернатант	взвесь	супернатант	взвесь
<i>B. cereus</i>					<i>B. thuringiensis</i>				
569	-	+	-	-	482/3	-	-	-	-
др-7	-	-	-	-	8a	-	-	-	-
336	-	-	-	-	15a	-	-	-	-
8	+	+	-	+	351	-	-	-	-
96	+	+	+	+	2090	-	-	-	-
104	+	+	+	+	19/31	-	-	-	-
108	+	+	+	+	482/7	-	-	-	-
1	-	-	-	-	35 v.galeriae	-	-	-	-
687 var.alb.	-	-	-	-	17/5	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>					48	-	-	-	-
35	+	+	+	+	toumanoffi	-	-	-	-
36	-	-	-	-	13M v.galeriae	-	-	-	-
38	-	-	-	-	10M v.finitimus	-	-	-	-
37	-	+	-	+	10B v.finitimus	-	-	-	-
168	-	-	-	-	tompsoni 11M	-	-	-	-
430	-	-	-	-	<i>B. megaterium</i>				
350	-	-	-	-	5	-	+	-	+
33	-	-	-	-	2	-	-	-	-
IE-20	-	-	-	-	3	-	+	-	-
IE-21	-	+	-	-	6	-	+	-	+
IE-26	-	-	-	-	654	-	-	-	-
IE-4	-	-	-	-	1	-	-	-	-
BD366	-	-	-	-	<i>B. mesentericus</i>				
BD407	-	-	-	-	5	-	+	-	+
WB600	-	-	-	-	6	-	-	-	-
<i>B. mycoides</i>					66	-	-	-	-
2	-	-	-	-	1277	-	-	-	-
10	-	+	-	-	<i>B. licheniformis</i>	-	-	-	+
<i>B. stearothermophilus</i>	-	-	-	-					

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бондарев В.П., Филиппов А.В., Дармов И.В. и др. Разработка иммуноферментной моноклональной тест-системы для обнаружения протективного антигена *Bacillus anthracis*. Пробл. особо опасных инф. 2007; 1 (93):66–69.
- Микуш Н.И., Корсакова А.Ю., Болотникова М.Ф. и др. Продукция белков S-слоя штаммами *Bacillus anthracis*. Биотехнология. 2004; 5:22–33.
- Ezzell J., Abshire T. Immunological analysis of cell-associated antigens of *Bacillus anthracis*. Infect. Immun. 1988; 56(2):349–356.
- 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):2481–2489.
- Gat O., Grosfeld H., Ariel N. Search for *Bacillus anthracis* potential vaccine candidates by a functional genomic-serologic screen. Infect. Immun. 2006; 74 (7):3987–4001.
- Mabry R., Brasky K., Geiger R. et al. Detection of anthrax toxin in the serum of animals infected with *Bacillus anthracis* by using engineered immunoassays. Clin. Vaccine Immunol. 2006; 13(6):671–677.
- Mesnage S., Tosi-Couture E., Mock M. et al. Molecular characterization of the *Bacillus anthracis* main S-layer component: evidence that it is the major cell-associated antigen. Mol. Microbiol. 1997; 23:1147–1155.
- Mock M., Fouet A. Anthrax. Microbiol. Rev. 2001; 55:647–671.
- Sastry K., Tuteja U., Batra H. Generation and characterization of monoclonal antibodies to protective antigen of *Bacillus anthracis*. Indian. J. Exp. Biol. 2003; 41:123–128.

A.Yu.Goncharova, N.I.Mikshis, O.M.Kudryavtseva, M.F.Bolotnikova, L.V.Novikova, G.G.Krasichkov, T.V.Alenkina, Yu.A.Popov

Obtaining of Polyclonal Antibodies against *B. anthracis* S-layer Proteins and Study of their Specificity in Enzyme Immunoassay

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Purified preparations of *B. anthracis* S-layer proteins – Sap and EA1 were obtained. Developed was the scheme of laboratory animals' immunization, that enabled to receive rabbits' polyclonal antibodies against Sap and EA1 proteins in high titer. 12 strains of *B. anthracis*, 53 strains of closely-related bacilli and 4 strains of other heterogeneous bacteria were tested in enzyme-linked immunosorbent assay and DOT-immunoassay with the use of polyclonal anti-Sap and anti-EA1 antibodies. Analysis of specificity of the obtained antibodies revealed cross-reactions with *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. mycoides* and *B. megaterium*. The specificity of polyclonal anti-EA1 and anti-Sap antibodies was 75 and 83 % respectively. Sensitivity of reaction was 10^5 and 10^6 m.c. in applying polyclonal antibodies against *B. anthracis* S-layer proteins.

Key words: *B. anthracis*, polyclonal antibodies, S-layer, Sap and EA1 proteins, enzyme immunoassay.

Об авторах:

Гончарова А.Ю., Микуш Н.И., Кудрявцева О.М., Болотникова М.Ф., Новикова Л.В., Красичков Г.Г., Аленкина Т.В., Попов Ю.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Goncharova A.Yu., Mikshis N.I., Kudryavtseva O.M., Bolotnikova M.F., Novikova L.V., Krasichkov G.G., Alenkina T.V., Popov Yu.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 18.11.09.

Т.П.Морозова, Л.В.Домотенко, М.В.Храмов

ОЦЕНКА ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРОЗРАЧНОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ВЫДЕЛЕНИЯ ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА (Ft-АГАРА)

ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии»,
Оболensk

Приведены результаты тестирования прозрачной питательной среды для культивирования и выделения туляремиального микроба сухой (Ft-агар) при выделении *Francisella tularensis* в модельных опытах и полевых испытаниях. Показано, что Ft-агар обладает хорошими ростовыми и селективными свойствами и может с успехом применяться при работе как с чистыми культурами возбудителя туляремии, так и с полевым материалом. Среда сертифицирована (Регистрационный № ФСП 2007/00899).

Ключевые слова: туляремиальный микроб, питательные среды, полевые испытания.

Напряженная эпидемическая обстановка, сложившаяся в последнее время в РФ по ряду инфекционных заболеваний, включая туляремию, и неблагоприятный прогноз ее развития на ближайшие годы диктуют необходимость совершенствования средств их диагностики. Одним из основных направлений совершенствования лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней является повышение чувствительности, специфичности и экспрессности анализов, проводимых с использованием существующих методов.

Несмотря на широкое распространение современных средств диагностики особо опасных инфекций, «золотым стандартом» в медицинской бактериологии до сих пор остается выделение культуры возбудителя заболевания на питательных средах.

Туляремия – зоонозное природно-очаговое инфекционное заболевание, известное с давних времен, характеризующееся различными механизмами и путями передачи [9]. Возбудитель этого заболевания – бактерия *Francisella tularensis*, впервые описанная в 1912 г. американскими исследователями G.W.McCoy и C.W.Chapin [15]. *F. tularensis* – грамотрицательная, неподвижная, не образующая спор, очень мелкая коккобактерия с гладкоконтурной оболочкой, размножающаяся, как правило, почкованием [9]. Это факультативный аэроб, не способный расти на простых питательных средах. В процессе эволюции он приспособился к существованию в организме теплокровных животных, где полностью удовлетворяет свои пищевые потребности [9]. Характерной особенностью возбудителя туляремии является высокая потребность в цистине и тиамине [12].

Для культивирования и выделения возбудителя туляремии первоначально были предложены яичные питательные среды, представляющие собой смесь куриного желтка с 0,9 % раствором натрия хлорида или молоком и коагулированные при 80 °C [15]. Яичные среды довольно чувствительны, но непрозрачны, ненадежны в стерилизации и не подлежат хранению. Эти отрицательные моменты и явились одной из причин попыток замены яичных сред на агаризованные питательные среды. Так, М.М.Анциферов разра-

ботал питательную среду на основе агара Хоттингера с добавлением куриного желтка [1]. Основываясь на том, что возбудитель туляремии прекрасно размножается во внутренних органах животных и человека, богатых кровью (селезенка, печень), E.Francis [12] предложил использовать агаризованные питательные среды с кровью: глюкозокровяной агар, глюкозосывороточный агар и, наконец, глюкозокровяной агар и глюкозосывороточный агар с добавлением цистина, получивший название «шоколадный» агар Francis. C.M.Downs [11] несколько модифицировала компонентный состав среды, заменив цистин на цистеин. Среда получила название Glukose Cystein Blood Agar.

В настоящее время Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) [16] рекомендует использовать для лабораторной диагностики туляремии следующие питательные среды: Cystine heart agar (CHA); Cystine heart agar with blood (CHAB); Cystine heart agar base with 9% chocolateized sheep blood; Mueller-Hinton agar with 1% IsoVitaleX; Thioglycollate-glucose blood agar (TGBA); GCII agar base with 1% hemoglobin and 1% IsoVitalex; Buffered charcoal yeast extract (BCYE).

В нашей стране для работы с туляремиальным микробом чаще других использовали предложенный О.С.Емельяновой кровяной рыбно-дрожжевой-глюкозо-цистиновый агар [3].

Использование сред, содержащих нативную кровь, вызывает определенные трудности, в частности, в полевых условиях. Рядом авторов предложено в составе питательных сред заменить кровь гемоглобином [14], плазмой крови [13] и «черным альбумином» (сухой кровью животных) [6, 8], а также экстрактами и гидролизатами крови, гемоглобина, черного альбумина [5, 6, 7, 13]. Питательные среды, состоящие из экстрактов и гидролизатов гемосодержащих продуктов, оказались наиболее удобными в работе, т.к. они прозрачны и автоклавируемы.

Одной из таких сред является разработанная Т.П.Морозовой, Л.В.Логачевой прозрачная агаризованная питательная среда для культивирования и выделения туляремиального микроба [7]. Она состоит из

кислотного гидролизата рыбной муки, экстракта пекарных дрожжей, цистеина гидрохлорида, стимулятора роста гемофильных микроорганизмов, тиамина гидрохлорида, сернокислых солей магния и натрия, пантотената кальция и по своим качествам не уступает кровяным средам.

В ФГУН ГНЦ ПМБ налажен промышленный выпуск среды в сухом виде. Она зарегистрирована как питательная среда для культивирования и выделения туляремиального микроба и имеет коммерческое название «Ft-агар» (Пер. № ФСП 2007/00899). Ft-агар выпускается в виде комплекта, состоящего из сухой питательной агаризованной основы, ростовой глюкозавитаминовой добавки (ГВД) и селективной добавки (СД). В состав СД входят кефзол в концентрации 20 мкг/мл и амфотеррицин – 10 мкг/мл. Этот состав отличается от комбинации антибиотиков в средах для выделения туляремиального микроба, традиционно используемой в РФ (пенициллин – 100–500 мкг/мл, ампициллин – 50 мкг/мл и полимиксин В – 100 ЕД/мл [6, 10]) и от рекомендуемой ВОЗ (колистин – 7,5 мг/л, амфотеррицин – 2,5 мг/л, линкомицин – 0,5 мг/л, триметоприм – 4 мг/л, ампициллин – 10 мг/л [16]).

В литературе описано успешное использование Ft-агара для культивирования музейных штаммов *F. tularensis* [10]. Среда введена в раздел подготовки культуры туляремиального микроба для проведения контроля диагностических питательных сред для возбудителей туляремии в Методических указаниях «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза» [4]. Вместе с тем отсутствуют данные об использовании Ft-агара при выделении *F. tularensis* из клинического материала и объектов окружающей среды.

Целью настоящей работы является оценка диагностических свойств Ft-агара при выделении туляремиального микроба в модельных опытах и полевых испытаниях.

Материалы и методы

Лабораторные испытания проводили на базе Российского научно-исследовательского противочумного Института «Микроб» (РосНИПЧИ «Микроб») с участием сотрудников ГИСК им. Л.А.Тарасевича и РосНИПЧИ «Микроб», а также в Ростовском-на-Дону научно-исследовательском противочумном институте.

Ft-агар готовили в соответствии с методикой, указанной на этикетке. В качестве контрольных сред использовали среду АДЭТ на основе пептона Д с добавлением факторов элективности (ВФС 42-405-ВС-93) и среду, приготовленную из сухой основы питательной среды для культивирования туляремиального микроба (ФС 42-127 ВС-88) производства Иркутского НИПЧИ с добавлением желтков яиц.

Специфическую активность сред оценивали по

биологическим показателям: чувствительности, скорости роста, прорастанию, стабильности основных биологических свойств микроорганизмов и ингибции [2].

В испытаниях использовали музейные штаммы различных подвидов *F. tularensis* (503/840, 503/862, 543, Schu, A.Cole, 48, Miura, 24, A-166), авирулентные штаммы *F. tularensis* 38 и *F. tularensis* 15 Гайского, восстановленные из лиофилизированного состояния путем двух пассажей на среде Мак Коя [15], а также штаммы культур-контаминантов (*Proteus vulgaris* X-14, *Escherichia coli* 1015, *Bacillus cereus*). Все штаммы были типичными по культурально-морфологическим, биохимическим и серологическим свойствам.

Полевые испытания проводили при эпизоотологическом обследовании территорий Западно-Казахстанской области на базе Уральской противочумной станции в 1991–1993 гг. (весна–лето) и на базе Харабалинского противочумного отделения Астраханской ПЧС весной 1989 г.

На Уральской противочумной станции испытания Ft-агара проводили на протяжении трех рабочих сезонов. Материалом для исследования служили суспензии клещей в физиологическом растворе. Как правило, пробы были групповые – по 10–15 клещей растирали в фарфоровой ступке, добавляли 1 мл 0,9 % раствора хлорида натрия и по 0,1 мл полученной суспензии высевали на Ft-агар и на контрольную среду, в качестве которой использовали среду на основе эритроцит-агара. Оставшуюся суспензию вводили биопробным животным – белым мышам. В случае гибели биопробных животных делали отпечатки органов (печень, селезенка, лимфатические узлы, легкие и кровь) на испытываемую и контрольную среды.

На базе Харабалинского противочумного отделения в ходе испытаний производили прямой посев органов отловленных грызунов и суспензии эктопаразитов на Ft-агар и на среду Мак Коя. Всего сделано 40 групповых посевов эктопаразитов и органов отловленных животных на питательные среды параллельно с постановкой биопробы.

Результаты и обсуждение

Лабораторные испытания Ft-агара проводили в три этапа. На первом этапе при оценке специфической активности среды с использованием чистых культур туляремиального микроба 3 рас и микробов-контаминантов получены следующие показатели: чувствительность среды – 10 м.кл.; показатель прорастания исследованных штаммов туляремиального микроба на Ft-агаре – 52–72 %; начальный рост культур *F. tularensis* отмечен через 60 ч культивирования в виде типичных колоний в S-форме размером 0,4–0,5 мм. Средний показатель прорастания для испытываемой среды в 2,6 раза превышал таковой на контрольной среде производства Иркутского НИПЧИ. Ингибирующие свойства среды проявлялись в пода-

Результаты проведения полевых испытаний на Уральской противочумной станции

Период исследований	Количество исследованных клещей	Сделано посевов	Выделено шт. <i>F. tularensis</i>							
			Время появления видимого роста, сут	Прямой посев суспензии		Сроки гибели биопроб, сут	Через биопробу		Всего выделено культур	
				Контрольная среда	Ft-агар		Контрольная среда	Ft-агар	Контрольная среда	Ft-агар
1991, весна–лето	12361	292	3–5	19	19	5–6	3	3	22	22
1992, весна–лето	21954	507	2–3	60	61	7–10	10	10	70	71
1993, весна–лето	16040	383	2–4	34	35	3–8	8	8	42	43
Итого	50355	1182	2–4	113	115	5–8	21	21	134	136

влении роста микробов-контаминантов в концентрации до $1 \cdot 10^5$ м.к./мл при посеве их в смеси с возбудителями туляремии. Подобная картина наблюдалась и на среде АДЭТ.

На втором этапе на Ft-агар осуществляли посев органов и тканей (селезенки, печени, лимфоузлов, легких, крови) лабораторных животных (беспородных мышей), зараженных музейными штаммами *F. tularensis*. Бактериологическое исследование органов зараженных животных проводили по мере их падежа (в течение 15 дней с момента их заражения). В результате испытаний установлено, что испытываемая среда пригодна для выделения возбудителя туляремии из всех видов органов и тканей павших животных. Культуры туляремии микроба, выделенные на Ft-агаре, обладали типичными культурально-морфологическими, биохимическими и серологическими свойствами.

Третий этап заключался в анализе среды при имитированном посеве смывов из носоглотки людей и объектов окружающей среды, инфицированных высоковирулентным штаммом *F. tularensis* 503/840. Всего исследовано 45 проб. Из них на Ft-агаре культура туляремии микроба выделена из 42 проб, на среде АДЭТ – из 37. Показатель ингибиции сопутствующей микрофлоры на Ft-агаре при исследовании смывов из носоглотки составил 99,8–100 %, при анализе смывов с поверхностей предметов внешней среды – 30–50 %.

При проведении полевых испытаний на базе Харабинского противочумного отделения сделано 40 групповых посевов суспензии эктопаразитов и органов отловленных животных на Ft-агар и контрольную среду Мак Коя. В результате на Ft-агаре выделена одна культура туляремии микроба. На среде Мак Коя роста возбудителя туляремии не наблюдалось. При посеве отпечатками из селезенки, печени двух павших биопроб получен рост туляремии микроба от одной биопробы как на Ft-агаре, так и на среде Мак Коя. Выделенная культура обладала типичными для *F. tularensis* культурально-морфологическими, биохимическими и серологическими свойствами.

При проведении испытаний на Уральской ПЧС

исследовано 2114 животных и 50355 клещей и сделано 1182 посева на Ft-агар и контрольную среду на основе эритроцит-агара.

Посев суспензий клещей позволил выявить одинаковое число эпизоотических точек. При этом на Ft-агаре выделено на две культуры больше. Всего на Ft-агаре выделено 136 культур *F. tularensis*, из них 115 выявлено при прямом посеве суспензии клещей и 21 – через биопробу. При параллельном посеве на контрольную среду выделено 134 культуры *F. tularensis*: 113 – из суспензии клещей и 21 – биопробой. Интенсивность роста туляремии микроба на Ft-агаре была более выражена, особенно в тех случаях, когда выделяли единичные (до 20) колонии. Среднее время выявления роста культур на Ft-агаре при прямом посеве материала составило 2–4 сут.

Результаты испытаний Ft-агара на Уральской ПЧС представлены в таблице.

По итогам проведенных комплексных испытаний диагностических свойств сухой прозрачной питательной среды для культивирования и выделения *F. tularensis* (Ft-агар) сделано заключение о хороших диагностических свойствах среды и необходимости ее использования в практической работе с туляремии микробом.

Среда проста в приготовлении, не требует внесения крови или других стимуляторов роста, обладает хорошими ростовыми и селективными свойствами, сертифицирована (Рег. № ФСП 2007/00899). Налажен ее промышленный выпуск.

В настоящее время в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации» проводятся работы по оптимизации питательной среды для культивирования и выделения туляремии микроба, готовой к употреблению, стерильной во флаконах объемом 100 и 250 мл в комплекте с селективной и стимулирующей добавками для работы в полевых условиях, в передвижных лабораториях и др.

Выражаем благодарность Т.И.Анисимовой, И.С.Мещеряковой, В.М.Мезенцеву, Г.Д.Харабаджану за оказание методической и практической помощи при проведении испытаний.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анциферов М.И. Желточно-агаровая среда для выращивания туляремийного микроба. Известия Иркутского Государственного научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока. 1958; 18:143–53.
2. Барулина И.С., Саяпина Л.В., Байдалова Н.П., Хорева И.И., Мецереякова И.С., Кормилицына М.И., Коровкин С.А. Оценка показателя «специфическая безопасность» живой туляремийной вакцины. Пробл. особо опасных инф. 2009; 1(99):64–6.
3. Емельянова О.С. Микробиология туляремии. В кн.: Туляремия. М.; 1960. С. 51–95.
4. Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза. Методические указания. МУ 3.3.2.2124-06. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2007. 35 с.
5. Копылов В.А., Сухарь В.И. Сухая элективная среда для диагностики туляремийного микроба на основе модифицированного пептона Д. В кн.: Актуальные вопросы разработки препаратов медицинской биотехнологии: Тез. док. науч. конф. Махачкала; 1988. Т. 1. С. 121–2.
6. Кундин В.А. Прозрачная питательная среда для *F. tularensis*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1969; 4:34–6.
7. Логачева Л.В., Морозова Т.П. Питательная среда для *Francisella tularensis*. Патент РФ № 1730143. 1992.
8. Морозова Т.П., Артюхин В.И. Питательная среда для выращивания туляремийного микроба. АС. № 1593220. 1986.
9. Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.; 1975; С. 31–6.
10. Павлович Н.В., Мишанькин Б.Н. Прозрачная питательная среда для культивирования *Francisella tularensis*. Антибиот. мед. биотехнол. 1987; 32(2):133–7.
11. Downs C.M., Coriell L.L. The cultivation of *Bacterium tularensis*. J. Bacteriol. 1947; 53:89–100.
12. Francis E. The amino-acid cistine in the cultivation of tularemia. Public Health Reports. 1923; 38(3):324–7.
13. Gaspar A.J., Ward M.K. Studies on *Pasteurella tularensis*. Effect of Duolite Treatment on Growth Promoting Properties of Blood and Plasma. J. Lab. Clin. Med. 1960; 55:633–8.

14. Hood A.M. A Growth medium without blood cells for *Pasteurella tularensis*. J. Gen. Microbiol. 1961; 26:45–8.
15. McCoy, G.W., Chapin C. W. Further observations on a plague-like disease of rodents with a preliminary note on the causative agent. *Bacterium tularensis*. J. Infect. Dis. 1912; 10:61–72.
16. WHO Guidelines on Tularemia. World Health Organization. Geneva. 2007.

T.P.Morozova, L.V.Domotenko, M.V.Khramov

Evaluation of the Diagnostic Properties of Transparent Nutrient Medium for Cultivation and Isolation of Tularemia Agent (Ft-agar)

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

Presented are the results of transparent dry nutrient medium (Ft agar) for *Francisella tularensis* cultivation and isolation testing in the model experiments and field trials. Ft-agar was shown to possess fine growth and selective properties. It could be used for work with the pure cultures of tularemia agent and with the field material. The medium is certified (the registered number of MM is 2007/00899).

Key words: tularemia microbe, nutrient media, field trials.

Об авторах:

Морозова Т.П., Домотенко Л.В., Храмов М.В. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Оболensk. E-mail: domotenko@obolensk.org

Authors:

Morozova T.P., Domotenko L.V., Khramov M.V. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk. E-mail: domotenko@obolensk.org

Поступила 14.09.09.

В.А.Оборин, Е.В.Пименов, А.Г.Ивонин

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА *YERSINIA PESTIS* EV НИИЭГ НА ЕГО АДГЕЗИВНЫЕ СВОЙСТВА

ГОУ ВПО «Вятский государственный университет», Киров

При помощи фотокolorиметрического метода определены адгезивные свойства клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных в различных условиях. Выявлено, что температура культивирования и состав питательных сред оказывают существенное влияние на формирование поверхностных структур бактерий, отвечающих за их прикрепление к эритроцитам человека. Установлено, что наиболее высокий уровень адгезии проявляют микробные клетки, выращенные при $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ на ГРМ-агаре и агаре Хоттингера. Показано, что лиофилизация бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ, а также отмывание от экстрацеллюлярных метаболитов не влияет на их адгезивную способность. Полученные результаты позволяют рекомендовать фотокolorиметрический метод для изучения адгезивной активности микробных культур, составляющих основу живых вакцин.

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

Адгезия – общебиологическое свойство всех живых клеток, в том числе и микроорганизмов. Для патогенных бактерий адгезия является одним из основных факторов патогенности [9, 10]. Микробные клетки вакцинных штаммов также должны прикрепляться к слизистым оболочкам и покровным тканям, проникать и размножаться в организме хозяина, вызывая иммунный ответ. Поэтому изучение адгезивных свойств бактерий живых вакцин является важным направлением исследований современной микробиологии.

Известно, что лиганд-рецепторное взаимодействие микробных и эукариотических клеток зависит от морфофункционального состояния их поверхностных структур [4, 11]. У чумного микроба выявлены и изучены образования, ответственные за процесс прикрепления к клеткам хозяина [1, 14, 15]. Ранее нами было показано, что микробные клетки вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ обладают выраженной адгезивной способностью в отношении эритроцитов человека [6].

В настоящем сообщении представлены данные об адгезивной активности микробных культур *Y. pestis* EV НИИЭГ, полученных в разные сроки культивирования, на различных питательных средах и температурных режимах выращивания.

Материалы и методы

В работе использовали микробную культуру штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, выделенную из коммерческой чумной живой сухой вакцины. Для выращивания микробной культуры применяли различные питательные среды на основе гидролизата рыбной муки (ГРМ-агар), pH 7,2, мясо-пептонный агар (МПА) и агар Хоттингера (АХ), pH 7,2, приготовленные в лабораторных условиях. В качестве дополнительных ингредиентов в питательные среды вносили сульфит натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) и генцианвиолет (ГВ). Бактерии выращивали при различных темпе-

ратурных режимах (20 ± 1) , (28 ± 1) и $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24, 48 и 72 ч, после чего микробные клетки суспендировали в 0,9 % растворе хлорида натрия. Исследования проводили с суспензией микробной культуры, соответствующей 1,0 единице оптической плотности (ОП) при длине волны проходящего света 540 нм.

Для получения суспензии эритроцитов использовали венозную кровь донора 0(I) Rh+ группы крови. В качестве антикоагулянта применяли 3,8 % раствор лимонно-кислого натрия (1:10). Не позднее 24 ч после 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 $1,0 \cdot 10^{12}/\text{л}$.

Адгезивную активность микробных культур определяли с помощью разработанного авторами фотокolorиметрического метода [8]. 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 бактерий и 1,0 мл 0,9 % раствора хлорида натрия; 1,0 мл суспензии эритроцитов и 2,5 мл 0,9 % раствора хлорида натрия. Пробы инкубировали на вращающейся платформе при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 30 мин, после чего центрифугировали при 1000 об/мин в течение 1,5 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 показателю адгезии (ПА) который рассчитывали по формуле:

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

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

жидкости в контрольной пробе 2, $D_{оп}$ – оптическая плотность надосадочной жидкости в опытной пробе.

В каждой серии опытов выполняли по пять независимых определений; статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы, применяемой при анализе медицинской информации «Biostat 4.03».

Результаты и обсуждение

По литературным данным, адгезивные свойства микробных клеток зависят от многих факторов и в первую очередь от условий их культивирования [4, 9].

Поэтому первоначально были изучены адгезивные свойства микробных клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных на плотных питательных средах различного состава. Для этого определяли показатель адгезии микробных культур, культивируемых в течение 48 ч при температуре $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ на основе гидролизата рыбной муки (рН 7,2) и агара Хоттингера, которые применяются для выращивания *Y. pestis*, а также мясо-пептонного агара, используемого при культивировании других микроорганизмов. В качестве дополнительных ингредиентов в питательные среды вносили сульфит натрия и генцианвиолет, которые применяют для стимуляции роста чумного микроба и ингибирования посторонней микрофлоры при выращивании *Y. pestis* [1, 5, 14]. Показатель адгезии определяли с помощью фотокolorиметрического метода по отношению эритроцитов человека. В предыдущих исследованиях было выявлено, что уровень адгезии бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ зависит от видовой принадлежности эритроцитов и показано, что эритроциты людей обладают способностью фиксировать на своей поверхности микробные клетки вакцинного штамма чумного микроба [7]. Кроме того, живая чумная вакцина используется для иммунизации людей. Следовательно, особый интерес представляют данные об адгезивных свойствах бактерий вакцинного штамма чумного микроба к эритроцитам человека.

Проведенные исследования показали, что уровень адгезии бактерий, выращенных на ГРМ-агаре и АХ, был достоверно выше уровня адгезии бактерий, выращенных на МПА. Очевидно, что МПА являлся менее благоприятной средой для формирования микробными клетками факторов адгезии. При этом добавление в состав МПА дополнительных ингредиентов – Na_2SO_3 и ГВ не влияло на показатели адгезии, в то время как их включение в состав ГРМ-агара и АХ приводило к статистически значимому повышению адгезивности микробных культур. Вероятно, входя в состав питательных сред, благоприятных для синтеза адгезинов бактерий, эти компоненты способствовали еще большей их экспрессии.

Далее исследовали влияние температуры и продолжительности выращивания бактерий на уровень

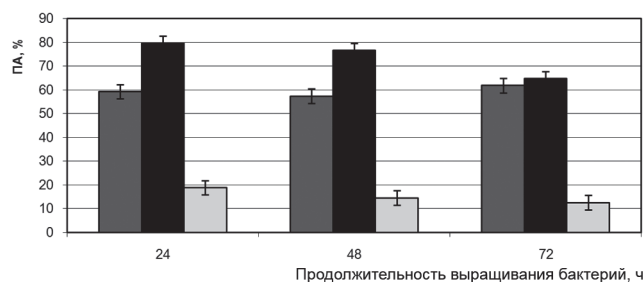


Рис. 1. Показатели адгезии штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ в зависимости от температуры и продолжительности выращивания микробных клеток:

■ – $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$, ■ – $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$, ■ – $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$

адгезии (рис. 1). Наиболее высокие значения ПА регистрировали в случае выращивания микробных клеток при температуре $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$. При этом у 24- и 48-часовых культур величина ПА составляла 76–80 %, а у 72-часовых достоверно ($P < 0,05$) снижалась до уровня 64 %. Значения ПА микробных клеток, культивируемых при $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ находились в пределах 57–62 %, при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ – 12–19 %.

Из литературы известно [5], что при температуре культивирования $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ у клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ выявляется два дополнительных белка, которые не образуются при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Можно предположить, что именно эти белки играют определенную роль в прикреплении бактерий к эритроцитам человека. Согласно данным [12], адгезин чумного микроба (белок рН6 антиген) экспрессируется только в диапазоне температур 35–41 $^\circ\text{C}$ и кислых условиях среды. Однако полученные нами результаты исследований показали, что высокие адгезивные свойства проявляют микробные клетки *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенные при относительно низкой температуре и нейтральном рН. Это свидетельствует о наличии у чумного микроба, вероятно, и других адгезинов.

В последние годы появились сообщения о наличии у бактерий надоболочечных белковых структур [2, 3, 13]. S-слой выявлен и изучен у чумного микроба, имеются данные о его участии в прикреплении клеток *Y. pestis* к различным поверхностям [3]. Поэтому на следующем этапе исследований было изучено влияния экстрацеллюлярных метаболитов на способность бактерий прикрепляться к эритроцитам человека. Для этой цели определяли степень адгезии микробных клеток, дважды отмытых 0,9 % раствором хлорида натрия путем центрифугирования при 4000 об/мин в течение 10 мин, и клеток, смытых с питательных сред без последующего отмыывания (рис. 2).

Из данных, представленных на рис. 2, видно, что удаление надоболочечных структур бактерий не приводило к статистически значимым изменениям ПА. Следовательно, экстрацеллюлярные субстанции не оказывают влияния на адгезию бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека.

На заключительном этапе работы были проведены исследования по изучению влияния процесса ли-

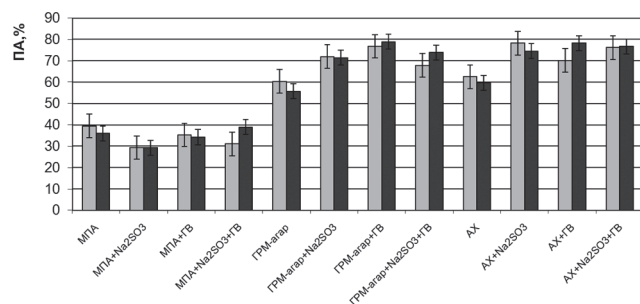


Рис. 2. Влияние отмытия клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ от внеклеточных метаболитов на их адгезивную способность в отношении эритроцитов человека:

■ — отмытые микробные клетки, ■ — микробные клетки без отмытия

офилизации на адгезивные свойства штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ. Для этого определяли ПА микробной культуры, выращенной на ГРМ-агаре с ГВ и суспензированной в 0,9 % растворе натрия хлорида, и культуры, полученной в результате разведения чумной живой сухой вакцины 0,9 % раствором натрия хлорида. В одном варианте эксперимента клетки, приготовленные из лиофилизированного состояния, дважды отмывали от стабилизаторов путем центрифугирования при 4000 об/мин в течение 10 мин, а в другом — применяли без отмытия. Установили, что значения ПА микробных клеток, выращенных на питательной среде и полученных из лиофильно-высушенного состояния, статистически значимо друг от друга не отличались (рис. 3). Полученные данные свидетельствовали о сохранении адгезивной способности клеток штамма при их лиофилизации в процессе производства вакцины.

Таким образом, установили, что на адгезивные свойства бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ в отношении эритроцитов человека оказывают влияние состав среды, температура культивирования и, в незначительной степени, продолжительность выращивания. Лиофилизация микробных клеток не сказывается на их способности взаимодействовать с эритроцитами. Следовательно, условия, применяемые для получения клеток штамма при производстве живой сухой чумной вакцины (выращивание при $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48 ч на АХ, лиофилизация) [12], являются благоприятными для сохранения и проявления у чумного микроба адгезивной активности.

Установлено, что экстрацеллюлярные метаболиты не влияют на адгезивность штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ. Очевидно, что в процессе взаимодействия бактерий с эритроцитами человека участвуют поверхностные структуры их клеточной стенки.

Проведенные исследования показали высокую чувствительность и информативность фотоколориметрического метода оценки адгезии и возможность его использования для изучения адгезивных свойств бактерий, входящих в состав живых вакцин, а так-

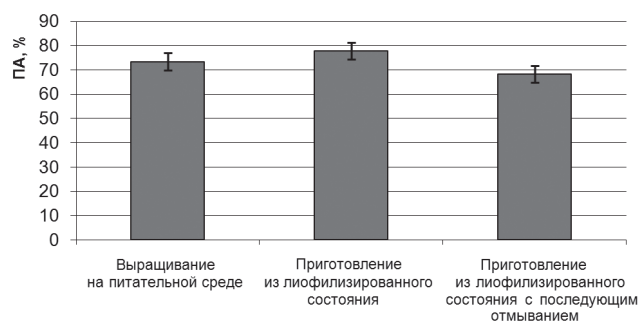


Рис. 3. Показатели адгезии клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных на питательной среде, а также полученных из лиофилизированного состояния

же для выбора оптимальных условий приготовления препаратов для иммунизации людей и животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бахтеева И.В. Исследование функциональной активности pH 6 антигена *Yersinia pestis* с помощью наборов изогенных мутантов [автореф. дис. ... канд. мед. наук]. М.: 2008. 24 с.
2. Гончарова А.Ю. Выделение, биохимическая и иммуно-биологическая характеристика белков S-слоя сибиреязвенного микроба [автореф. дис. ... канд. мед. наук]. М.: 2007. 22 с.
3. Дятлов И.А. Получение S-слоя чумного микроба и возможности его применения. Биотехнология. 2004; 1:20–5.
4. Езепчук Ю.В. Патогенность как функция биомолекул. М.: Медицина; 1985. 240 с.
5. Зюзина В.П., Демидова Г.В., Соколова Е.П., Беспалова И.А., Бородин Т.Н., Алексеева Л.П. и др. Сравнение спектра белков, присутствующих в препаратах липополисахаридов *Yersinia pestis*, выращенных при 28 и 37 °C. Биотехнология. 2003; 3:20–4.
6. Оборин В.А., Ивонин А.Г., Пименов Е.В., Романов В.Е., Абаишева Ф.И., Вылегжанина О.В. Изучение адгезии клеток вакцинного штамма EV *Yersinia pestis* к эритроцитам человека фотоколориметрическим методом. Вестник НГТУ. Сер.: Биология, клин. мед. 2009; 7(3):25–9.
7. Оборин В.А., Пименов Е.В., Ивонин А.Г. Изучение адгезии бактерий вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам животных фотоколориметрическим методом. Probl. особо опасных инф. 2010; 1:48–50.
8. Патент 2360969 Российская Федерация, МПК C12Q1/02, G01N33/483. Способ определения бактериофиксирующей активности эритроцитов. В.Е.Романов, А.Г.Ивонин, А.Л. Бондаренко, В.А.Оборин, Е.Л.Нехорошкина; заявитель и патентообладатель ФГОУ ВПО Вятская ГСХА. № 2007141246/13; заявл. 06.11.2007; опубл. 10.07.2009. Бюл. № 11.
9. Поспелова С.В., Карпунина Т.И., Зубарева Н.А. Изучение адгезивных свойств микроорганизмов, выделенных от больных с патологией гепатобилиарной системы. Пермский мед. журн. 1998; XV(3):22–5.
10. Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М., Бардых И.Х., Винокур Н.И. Адгезивные и некоторые другие свойства VIBRIO CHOLERAЕ TCP⁺ CTX⁺, изолированных на объектах внешней среды Ростовской области в 2002 году. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2004; 6:3–6.
11. Усвятков Б.Я., Ханина Е.А., Бухарин О.В. Взаимодействие бактерий и эритроцитов. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005; 4:89–95.
12. Федорова В.А., Голова А.Б., Елисеев Ю.Ю. Влияние условий культивирования бактерий *Yersinia pestis* на индукцию специфического иммунитета при моделировании экспериментальной чумы у мышей. Иммунология. 2007; 6:371–4.
13. Bichowsky-Slomnicki L., Ben-Efraim S. Biological activities in the extracts of *Pasteurella pestis* and their relationship to the "pH 6 antigen". J. Bacteriol. 1963; 86:101–11.
14. Huang X.-Z., Lindler L.E. The pH 6 antigen is an antiphagocytic factor produced by *Yersinia pestis* independent of *Yersinia* outer proteins and capsule antigen. Infect. Immun. 2004; 72:7212–9.
15. Liu F., Chen F., Galván E.M., Lasaro M.A., Schifferli D.M. Effects of Psa and F1 on the Adhesive and Invasive Interactions of *Yersinia pestis* with Human Respiratory Tract Epithelial Cells. Infect. Immun. 2006; 74:5636–44.

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

The Influence of Growth Conditions of *Yersinia pestis* EV NIEG Strain on Its Adhesion Properties

Vyatka State University, Kirov

Adhesion properties of vaccine *Y. pestis* EV NIEG strain cells, cultivated in different conditions, were identified by photocolometric method. It was elucidated that the temperature of cultivation and the composition of nutrient media influence essentially the formation of surface structures of bacteria responsible for attachment to human red blood cells. The highest level of adhesion was demonstrated by the microbial cells cultivated at (28±1) °C on GRM-agar and Hottinger agar. Liophilisation of *Y. pestis* EV NIEG cell as well as washing off extracellular metabolites did not affect the adhesion property of bacteria. The results received enabled to recommend the photo-

colorimetric method for study of adhesion activity of microbial cultures which were the basis of live vaccines.

Key words: adhesion, bacteria, vaccine strain *Y. pestis* 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 12.01.10.

Е.Г.Абрамова, А.К.Никифоров, О.А.Лобовикова, С.А.Еремин, Ю.Г.Васин, Т.А.Михеева,
И.М.Жулидов, Л.Н.Минаева, М.В.Галкина, Л.В.Савицкая, А.Г.Селезнева, Р.А.Свинцов,
С.В.Генералов, И.В.Шульгина

ПРОИЗВОДСТВО ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА – ИТОГИ ПЕРВЫХ ПЯТИ ЛЕТ

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

Представлены сравнительные данные регламентированных и фактических показателей качественных характеристик гетерологичного антирабического иммуноглобулина производства ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» за пять лет серийного выпуска препарата. Освещены современные высокотехнологичные методы ведения баромембранных процессов, применяемые при очистке иммуноглобулина.

Ключевые слова: бешенство, гетерологичный иммуноглобулин, постэкспозиционная профилактика, баромембранные процессы.

Бешенство является одной из важнейших проблем отечественного здравоохранения. Его эпидемиологическая значимость определяется абсолютной летальностью, повсеместным распространением, прямой связью с заболеваниями среди животных, уровнем социально-экономического развития государства и оказанием антирабической помощи населению [5, 6, 11, 18]. Для экстренной профилактики заболевания людей гидрофобией при тяжелых укусах бешеными или подозрительными на бешенство животными применяют антирабический иммуноглобулин в сочетании с антирабической вакциной [12, 13, 19, 20, 26, 27].

В 2009 г. исполнилось пять лет серийного производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина в РосНИПЧИ «Микроб». Предпосылками для организации производства препарата послужили ряд причин, главные из них – резкий подъем заболеваемости бешенством практически во всех регионах России в 90-х годах XX века и отсутствие в стране производства препарата. Так, если до 80-х годов прошлого столетия число лиц, ежегодно обращающихся за антирабической помощью, не превышало 200 тыс., то к 90-м годам и по настоящее время эта цифра стабильно превышает 400 тыс., примерно половина из этого числа получает курс антирабического лечения [14, 15, 25].

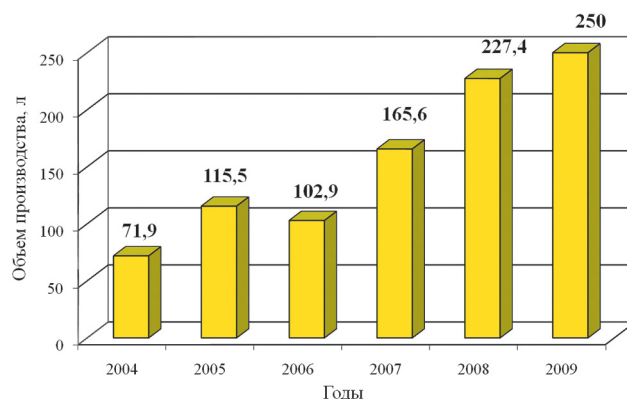
На сегодняшний день выпущено 80 серий антирабического иммуноглобулина общим объемом около тысячи литров без брака и рекламаций (рисунок). Однако это количество препарата не может в полной мере удовлетворить потребность учреждений здравоохранения, что свидетельствует о востребованности производства иммуноглобулина и необходимости увеличения объемов его выпуска. Подтверждение этому – решение Коллегии Федеральной службы Роспотребнадзора от 25.09.2009 г. «Актуальные вопросы организации надзора за бешенством в Российской Федерации» [1].

Биотехнологическая схема получения препарата

включает в себя следующие этапы: приготовление органо-тканевого рабического антигена для иммунизации продуцентов на основе фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253»; гипериммунизация лошадей; получение антирабической сыворотки; фракционирование антирабической сыворотки с целью удаления балластных белков; осаждение гамма-глобулина; получение жидкого иммуноглобулина; очистка и ультрафильтрация жидкого иммуноглобулина; стабилизация, депириrogenизация и стерилизация иммуноглобулина; розлив и запаковка ампул с препаратом; контроль готового препарата на производстве, в ОБТК и в лаборатории бешенства и оспы ГИСК им. Л.А.Тарасевича в Москве.

Технологический процесс занимает около 6 месяцев от начала работы с продуцентами до сдачи препарата на склад.

Действующая в институте система управления качеством, представленная отделом биологического и технологического контроля и отделом стандартизации, качества и метрологии, гарантирует проведение технологических процессов в безусловном соответствии нормативным требованиям и стандартам, распространяющимся как на сырье, вспомогательные материалы, так и на технологические про-



Производство гетерологичного антирабического иммуноглобулина в РосНИПЧИ «Микроб» в 2004–2009 гг.

цедуры. Каждая серия препарата проходит тестирование в специализированной лаборатории ГИСК им. Л.А.Тарасевича в Москве.

Фактические данные в сравнении с регламентированными, полученные за пять лет серийного производства иммуноглобулина, представлены в таблице. Стабильные параметры качественных характеристик выпускаемого препарата позволяют делать вывод о технологичности и воспроизводимости производственного процесса.

О высокой степени проявления защитных свойств иммуноглобулина при формировании пассивного иммунитета у пациентов свидетельствует важнейший показатель качества препарата – специфическая активность, фактическая величина которой (340 МЕ/мл) значительно превосходит регламентированное значение.

Об эффективности риванол-спиртового метода выделения гамма-глобулина из иммунной сыворотки свидетельствуют результаты электрофореза. Выпускаемый препарат характеризуется практически 100 % содержанием фракции гамма-глобулина без примесей альбумина, хотя по ФСП допускается наличие α - и β -глобулинов до 20 %.

Кроме показателей, указанных в таблице, препарат иммуноглобулина контролируют по таким параметрам, как описание, подлинность, отсутствие механических включений, герметизация, токсичность, отсутствие остаточного риванола, стерильность – в общей сложности 15 контрольных тестов. Все показатели выпускаемого препарата полностью соответствуют требованиям фармакопейной статьи на препарат.

При развертывании производства антирабического иммуноглобулина в РосНИПЧИ «Микроб» воспроизведена риванол-спиртовая технология фракционирования антирабической сыворотки [2, 7], однако финишные этапы очистки и стерилизации иммуноглобулина значительно модернизированы в связи с внедрением в производство современных технологий ведения баромембранных процессов [10, 17]. Несомненно, повышение качества иммуноглобулина во многом зависит от совершенствования технологического уровня и внедрения в производство про-

грессивных технологий. Качество очистки препарата определяет степень его безопасности для пациента. По данным ВОЗ, современные высокоочищенные препараты гетерологичного антирабического иммуноглобулина характеризуются проявлением побочных реакций лишь в 1–2 % случаев [28, 29].

Сегодня, в связи с интенсивным развитием фармацевтических технологий, в том числе фильтрационных, линейка продукции фирм-производителей фильтрационных материалов и оборудования настолько разнообразна, что позволяет подобрать оптимальный вариант системы фильтрации и решить самые сложные задачи по очистке и стерилизации иммуноглобулина.

Выбор оптимальной системы фильтрации представляет собой определение четких позиций по следующим вопросам: определение фильтрационных задач; выбор фильтрующего материала; выбор типа фильтрующего элемента; выбор фильтродержателя; определение критичности фильтрационного узла.

Какие же фильтрационные задачи требуют решения при производстве иммуноглобулина? Первая – удаление из раствора гамма-глобулина остаточного количества мельчайших частиц риванола или проведение осветляющей фильтрации [9]. Так называемый «ситовый» механизм удержания частиц в данном случае не может обеспечить высокого ресурса работы фильтра мембранного типа и наилучшим материалом для решения этой задачи как с технологической, так и экономической точки зрения является фильтровальный картон на основе целлюлозного волокна, обладающий высокой сорбционной способностью. Фильтрация через пластины картона проводится перед этапом осаждения гамма-глобулина, и данный тип фильтрации относится к фильтрации с глубинным механизмом.

Вторая фильтрационная задача – проведение предварительной фильтрации с целью удаления из жидкого иммуноглобулина коллоидных или взвешенных частиц размером от 0,2 мкм и более. Для этих целей в РосНИПЧИ «Микроб» используют патронные мембранные элементы «Технофильтр» марки ЭПМ.К на основе полиамидной мембраны (Россия). Полиамиды занимают одну из лидирующих позиций в производстве мембран для микрофильтрации, что обусловлено комплексом присущих им свойств – гидрофильностью, биологической инертностью, стойкостью к действию многих растворителей [22]. Фильтроэлементы имеют общепринятую в мировой практике конструкцию в виде цилиндра, состоящего из гофрированной мембраны в два слоя, расположенной между двумя слоями полипропиленового полотна. За счет гофрирования мембраны обеспечивается значительное увеличение эффективной площади фильтрации. Для удаления из жидкого иммуноглобулина коллоидных частиц размером от 0,45 мкм и более в производстве используют фильтроэлементы ЭПМ.К-0,80/0,45 с двумя слоями мембраны – первая с размером пор 0,80 мкм, вторая – 0,45 мкм. Далее для

Показатели качества гетерологичного антирабического иммуноглобулина

Показатель качества	Требования ФСП 42 0020441303	Фактические результаты (значение медианы)
Прозрачность	Не более 0,05	0,012
Цветность	Не более 0,15	0,0355
pH	От 6,6 до 7,4	6,915
Содержание белка, %	От 9 до 11	9,4
Содержание спирта, %	Не более 4,5	2,75
Пирогенность, °C	Не более 1,4	0,9
Специфическая активность, МЕ/мл	Не менее 150	340
Электрофоретическая однородность	Фракция γ -глобулина – не менее 80 %; наличие примесей α , β -глобулинов – не более 20 %. Альбумин должен отсутствовать	Фракция γ -глобулина – 100 %. Альбумин отсутствует

удаления более мелких коллоидных частиц и микроорганизмов размером от 0,22 мкм следует патронная фильтрация через элементы ЭПМ.К-0,45/0,20 с двухслойной мембраной с размером пор 0,45 и 0,20 мкм.

Казалось бы, такая технологическая цепочка, состоящая из предварительной через мембраны 0,80 и 0,45 мкм и конечной стерилизующей (0,20 мкм) фильтраций, вполне обеспечивает очистку жидкого иммуноглобулина от коллоидных загрязнений и его стерильность, однако далеко не все фильтрационные задачи решены с помощью патронной мембранной микрофильтрации.

Следующей фильтрационной задачей является максимальная очистка жидкого иммуноглобулина от нежелательных низкомолекулярных примесей, среди которых остатки спирта, применяемого для фракционирования, остатки гемпигмента.

Для удаления остатков спирта из препарата необходим этап ультрафильтрации или диализ. Ранее для проведения диализа в производстве иммуноглобулина успешно применяли разделительный ультрафильтрационный волоконный аппарат с мембранами из полисульфона. После ликвидации предприятия-изготовителя этих аппаратов и невозможностью их приобретения нами апробирована аналогичная колонка марки «МИФИЛ» (Беларусь) также с мембранами из полисульфона. Этот материал мембран наиболее предпочтителен, поскольку обладает повышенной устойчивостью к щелочам, кислотам, моющим агентам. Несмотря на достоинства используемых ранее разделительных аппаратов, их использование требовало тщательно подобранных режимов санитизации, консервирования и расконсервирования, контроля целостности мембран, что повышало трудозатраты при проведении процесса диализа. Для устранения подобных проблем нами были испытаны одноразовые диализаторы «Fresenius» F10HPS и FX100 (Германия), поставляемые в стерильном виде. К явным преимуществам диализаторов «Fresenius» относятся: однократное применение, высокая удельная производительность, обеспечивающая компактность аппаратов. Диализаторы F10HPS изготовлены на основе хорошо зарекомендовавшей себя полисульфоновой мембраны, а FX100 – на основе мембраны из новейшего геликсона. Преимущества улучшенной диализной мембраны из геликсона заключаются в том, что при производстве этой мембраны используется новая технология контролируемого на наноуровне вытягивания волокна, создающая заданную структуру пор и их равномерное распределение по внутреннему слою мембраны. Это гарантирует эффективность процесса диализа. Кроме этого, в новом дизайне диализатора FX100 нашла применение сшивка деталей корпуса с применением инновационной лазерной технологии. Одноразовые диализаторы как нельзя лучше вписываются в концепцию GMP, следуя которой, мы должны выстроить однонаправленный поток фильтрационных материалов, где не будет места процессам отмычки и очистки фильтров для повторного использования. При

проведении диализа для циркуляции двух встречных потоков – препарата и физиологического раствора в РосНИПЧИ «Микроб» используют стандартные перистальтические насосы MasterFlex производства США с регулируемым уровнем подачи жидкости.

Проведение диализа позволяет снизить уровень содержания спиртосодержащих компонентов с уровня 6–7 до 2–3 %, что ниже предельно допустимого по ФСП значения – 4,5 %. Данный показатель имеет немаловажное значение для сохранения стабильности свойств, поскольку наличие остаточного спирта в готовом препарате может вызывать агрегацию иммуноглобулина, а именно агрегаты в препаратах иммуноглобулина способствуют проявлению различных побочных анафилактических реакций [16].

Задача удаления возможных остатков гемпигмента для улучшения цветности препарата решена нами следующим образом.

Первоначально для улучшения показателей цветности и прозрачности препарата был апробирован активированный уголь, применение которого имеет место в фармацевтической промышленности из-за огромной площади его поверхности – более 500 м²/г [24]. Использовали активированный уголь растительного происхождения двух разновидностей – порошкообразный на древесной основе и гранулированный на основе кокосовой скорлупы. Активированный уголь засыпали в реактор на одном из этапов фракционирования. Однако ни одна из марок угля не была внедрена в производство в силу нескольких существенных недостатков: риск для персонала и, как следствие, необходимость использования защитных средств от вдыхания угольной пыли, взрывоопасность при высоких плотностях, возникшие проблемы с очисткой оборудования и всего помещения от мельчайших частиц угля. Тем не менее, не отказавшись от идеи использования активированного угля для очистки препарата, мы нашли ее воплощение в применении фильтрующих пластин ZetaCarbon марки CUNO (Франция), материал которых обеспечивает два различных механизма сорбции – электрокинетического за счет Зета-потенциала и сорбции на развитой поверхности высококачественного активированного угля [24]. Это фильтрация глубинного типа. Дополняющие друг друга механизмы сорбции значительно улучшают показатель цветности препарата.

Пожалуй, одна из самых сложных фильтрационных задач в производстве иммуноглобулина – удаление из препарата пирогенов – продуктов, вызывающих в организме пациента повышение температуры. Сотни веществ обладают эффектом пирогенности – белки, липиды, токсины, продукты жизнедеятельности бактерий, неорганические соединения, коллоиды и другие, но в области контроля качества инъекционных лекарственных средств наибольшее практическое значение имеют бактериальные эндотоксины, являющиеся фрагментами внешней стенки грамотрицательных бактерий. Для развития лихорадочного приступа достаточно присутствия бакте-

риальных эндотоксинов в растворе в концентрации 1 нг/мл. Другие пирогены менее активны, и для развития пирогенного эффекта их концентрация должна быть в 1000 раз больше. Трудность удаления эндотоксинов обусловлена, во-первых, их термоустойчивостью – они не разрушаются при обычных режимах стерилизации, следовательно, при гибели бактериальной клетки сохраняется пирогенный эффект, во-вторых, крайне малыми размерами – пирогены способны фильтроваться через мембраны с размерами пор до 0,001 мкм. Однако есть одно свойство у пирогенов, которое лежит в основе их удаления – наличие поверхностного отрицательного заряда.

Максимально эффективно удалить пирогены в наших условиях позволяют как глубинные фильтры CUNO – ZetaCarbon, о которых говорилось выше, так и специально адаптированные для удаления пирогенов фильтры ZetaPlus с основой из целлюлозы и диатомита также с двойным механизмом сорбции – за счет Зета-потенциала и сорбции в глубине матрикса. Если коснуться истории, можно отметить, что глубинные фильтры семейства ZetaPlus пришли на смену асбесто-целлюлозным фильтрам, которые широко использовались до 60-х годов прошлого столетия в фармацевтической промышленности. В конце 60-х годов хронический контакт с асбестовой пылью был признан существенно вредным, а жидкости, отфильтрованные на асбестовых фильтрах, потенциально опасными для здоровья. В 1973 г. был наложен официальный запрет на использование асбестовых фильтров в производстве препаратов для инъекций. Глубинные фильтры ZetaPlus состоят из целлюлозы, диатомита и связующей смолы, положительно заряженные молекулы которой химически связываются с компонентами матрикса и образуют фильтрационный материал со множеством положительно заряженных микроловушек. Двухфакторный механизм задержания пирогенов – механическое просеивание через поры в глубине фильтра и электрокинетическая адсорбция – позволяют считать эти фильтры оптимальными при очистке иммуноглобулина от пирогенов. Применение глубинных фильтров CUNO позволяет привести показатель пирогенности в соответствие с требованиями фармакопейной статьи при определении биологическим методом на кроликах.

В технологической цепочке очистки иммуноглобулина остался последний этап – стерилизующая фильтрация иммуноглобулина, технологический узел с наивысшей степенью ответственности. Статус этой позиции влечет за собой и особые требования к типу и материалу фильтра. Для стерилизующей фильтрации фармацевтических препаратов в качестве финишных фильтров используют исключительно мембранные фильтры, которые могут быть как дисковыми, так и патронными. Почему? До крупномасштабного внедрения мембран для стерилизации лекарственных средств в фармпроизводстве применяли глубинные фильтры различных конструкций. Хотя в настоящее время известны глубинные фильтры, ко-

торыми можно извлекать из жидкостей частицы размером менее 1 мкм, они имеют ряд ограничений по сравнению с мембранными. Нестабильная матрица глубинных фильтров, а главным образом то, что их работу нельзя подвергнуть проверке на целостность, является существенным недостатком и приводит к невозможности их использования на финишных стадиях очистки в критических сферах применения. Для работ, проводимых в соответствии с GMP, стерилизующие фильтры необходимо подвергать проверке на целостность до и после фильтрации, чтобы гарантировать, что использованные в каждом конкретном случае производственные фильтры соответствуют спецификациям изготовителя и не были повреждены в результате стерилизации или других непредвиденных событий в процессе их использования [4].

Каким же требованиям должен отвечать материал мембраны для стерилизующей фильтрации? После того, как в многочисленных исследованиях специалистами-биотехнологами было показано, что микропористые фильтры размером пор 0,2 мкм способны эффективно задерживать микроорганизмы, большее внимание стали уделять другим факторам, которые могут влиять на производительность фильтрации – к таким, например, как способность связываться с белками, совместимость с фильтруемым продуктом [8, 23]. Продукт не должен изменять фильтрационных свойств и эффективность удаления микроорганизмов, а мембрана, в свою очередь, не должна выделять в фильтрат сколько-нибудь значительного количества веществ, а также сорбировать на себе вещества из фильтрата.

Всем этим требованиям отвечают применяемые нами на финишной ступени фильтрационного каскада дисковые фильтры из ацетата целлюлозы с размером пор 0,22 мкм с эффективностью удержания частиц 99,996 %. Применение данного типа мембран не приводит к потере белка в препарате, данный тип фильтра обладает гидрофильностью, термостабильностью – предварительное автоклавирование при температуре 120 °C не изменяет механические и структурно-фильтрационные характеристики мембраны, что обеспечивает стабильное удаление микрорганов из препарата.

Таким образом, научный подход к решению фильтрационных задач, а именно изначально четкое формулирование технического задания для подбора системы с учетом стадии процесса и критичности фильтрационного узла, выбор фильтрующего материала и типа фильтрующего элемента, выбор типа фильтродержателя и фильтрационной системы, обеспечивающей минимизацию потерь, обусловил создание в производстве антирабического иммуноглобулина системы каскадной фильтрации. Она состоит из нескольких баромембранных процессов: предфильтрация через пластины фильтровального картона, предфильтрация через патронные мембранные элементы с двумя типами размера пор на мембране, ультрафильтрация на современных диализаторах на основе полисульфо-

новой или геликсоновой мембран, фильтрация через глубинные фильтры ZetaCarbon и ZetaPlus, конечная стерилизующая фильтрация через ацетатцеллюлозные мембраны 0,22 мкм. Данная система фильтрации позволяет получить стерильный антирабический иммуноглобулин, максимально очищенный от риванола, гемпигмента, пирогенов, остатков спирта, что в совокупности с биологическими показателями характеризует высокое качество выпускаемого препарата.

В последние 5 лет в производство иммуноглобулина активно внедряется стратегия GMP, гарант качества выпускаемого лекарственного средства [3, 21]. Данная концепция стимулировала разработку алгоритма и проведения таких мероприятий, как валидация оборудования, технологических процессов, аналитических методик, составления досье на каждую серию препарата, включающего протоколы производства. Концепция GMP влечет за собой и такие значительные положительные изменения, как проектировка и постройка «чистых помещений», запуск автоматической линии по розливу, запайке и этикетировке препарата, внедрение системы анализа рисков на производстве и многое другое, способствующее развитию производства антирабического иммуноглобулина.

Таким образом, воспроизведенный риванол-спиртовой способ выделения антирабического иммуноглобулина в комплексе с высокотехнологичными современными методами ведения баромембранных процессов при очистке препарата позволяют получать высокоочищенный, качественный, эффективный препарат для постэкспозиционной профилактики бешенства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Актуальные вопросы организации надзора за бешенством в Российской Федерации. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. http://rospotrebnadzor.ru/press_center/press/10168.
2. Воронин Е.С., редактор. Биотехнология. СПб.: ГИОРД; 2005. 792 с.
3. ГОСТ Р 52249-2004 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств». М.; 2004. 217 с.
4. Граф Е.-Г., Геерлигс Г. Аспекты валидации стерилизующей фильтрации в процессе асептического производства фармацевтических препаратов. В кн. Производство лекарств по GMP. М.; 2005. С. 132-137.
5. Груздев К.Н., Недосеков В.В. Бешенство животных. М.: Аквариум; 2001. 304 с.
6. Еремин В.И., Красильникова Н.Н., Заяц Н.А. Эпизоотологическая ситуация по бешенству в Саратовской области. В кн.: Социальные проблемы медицины и экологии человека. Матер. Всерос. науч.-практ. конф. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та; 2009. С. 104-6.
7. Карпов С.П., Прегер С.М., Синельников Г.Е. и др. Гипериммунные сыворотки. Томск: Изд-во Томского ун-та; 1976. 378 с.
8. Комиссаров А.В., Комоско Г.В., Лещенко А.А. и др. Изучение процесса стерилизующей фильтрации жидкого противобешенного лошадиного глобулина. Биотехнология. 2002; 2:66-74.
9. Котова А.Ю., Горобец С.В. Технология осветления трудно-фильтруемых биологических жидкостей. Фармацевтические технологии и упаковка. 2008; 3:38-40.
10. Краснопольский Ю.М., Борщевская М.И. Биотехнология иммунобиологических препаратов. Харьков: «Фармтэк»; 2008. 312 с.
11. Львов Д.К. Медицинская вирусология: Руководство. М.: ООО «Медицинское информационное агентство»; 2008. 656 с.
12. Медуницын Н.В. Медицинские иммунобиологические препараты, применяемые для специфической профилактики бешенства. Бюл. Вакцинация. Бешенство. 2005; 1(37).

13. Мовсисянц А.А., Кравченко А.Т. Профилактика и лечение бешенства: достижения и проблемы. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1989; 8:97-104.
14. Мовсисянц А.А., Хадарцев О.С. Случаи гидрофобии в Российской Федерации. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2003; 5:112-6.
15. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2008 году: Государственный доклад. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2009. 467 с.
16. Пилявская Е.А. Определение фрагментации и агрегации белка в гетерогенном антирабическом иммуноглобулине. В кн.: Научные основы производства гипериммунных сывороток. Томск; 1979. С. 60-1.
17. Свитцов А.А. Баромембранные процессы в биотехнологии. Фармацевтические технологии и упаковка. 2007; 4:18-21.
18. Селимов М.А. Бешенство. М.: Медицина; 1978. 336 с.
19. Селимов М.А., Ключева Е.В., Аксенова Т.А. и др. Лечение инaktivированной 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. Селимов М.А. Прошлое, настоящее и будущее специфической профилактики гидрофобии (к 100-летию первой пастеровской антирабической прививки). Вopr. вирусол. 1986; 3:370-4.
21. Сергеева Е.М. ISO, GMP и лекарственные средства для россиян. Чистые помещения и технологические среды. 2006; 2:42-7.
22. Тарасова С.А., Федотов Ю.А. Микрофильтрационные полиамидные мембраны и фильтрующие элементы на их основе в процессах осветления и стерилизации жидких лекарственных форм. В кн.: Производство лекарств по GMP. М.; 2005. 153-8.
23. Терентьев М.А. Как выбирать мембранный фильтр для стерилизующей фильтрации. В кн.: Производство лекарств по GMP. М.; 2005. С. 138-42.
24. Терентьев М.А. Современное использование активированного угля в производстве субстанций. В кн.: Производство лекарств по GMP. М.; 2005. С. 143-8.
25. Черкасский Б.Л., Хадарцев О.С., Мовсисянц А.А. Эпидемиологический надзор за бешенством в Российской Федерации. Бюл. Вакцинация. Бешенство. 2005; 1(37).
26. Selimov M.A. Efficacite de l'administration combinee de gamma-globulin de serum immune de cheval et de vaccin anti-rabiques chez des loups enragés. Extrait de «La Revue de Medicine». 1975; 10-11:723-30.
27. Wilde H., Chomchey P., Punyaratabandhu P. et al. Purified equine rabies immune globuline: a safe and affordable alternative to human rabies immune globulin. Bull. WHO. 1989; 67(6):731-8.
28. World Health Organization. Expert Consultation on Rabies. Technical Report Series 824. Geneva, Switzerland; 1994.
29. World Health Organization. Expert Consultation on Rabies. Technical Report Series 931. Geneva, Switzerland; 2005.

E.G.Abramova, A.K.Nikiforov, O.A.Lobovikova, S.A.Eremin, Yu.G.Vasin, T.A.Mikheeva, I.M.Zhulidov, L.N.Minaeva, M.V.Galkina, L.V.Savitskaya, A.G.Selezneva, R.A.Svintsov, S.V.Generalov, I.V.Shoulgina

Heterologous Anti-Rabies Immunoglobulin – Results of the First Five Years of Production

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Presented are the comparative data of actual and regulated indicators of the qualitative characteristics of the heterologous anti-rabies immunoglobulin produced by the RARI "Microbe" for the five years of serial preparation manufacturing. Modern high-technology methods to control the baromembrane processes used in immunoglobulin purification are highlighted.

Key words: rabies, heterologous immunoglobulin, post-exposure prophylaxis, baromembrane processes.

Об авторах:

Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Лобовикова О.А., Еремин С.А., Васин Ю.Г., Михеева Т.А., Жулидов И.М., Минаева Л.Н., Галкина М.В., Савицкая Л.В., Селезнева А.Г., Свинцов Р.А., Генералов С.В., Шульгина И.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Abramova E.G., Nikiforov A.K., Lobovikova O.A., Eremin S.A., Vasin Yu.G., Mikheeva T.A., Zhulidov I.M., Minaeva L.N., Galkina M.V., Savitskaya L.V., Selezneva A.G., Svintsov R.A., Generalov S.V., Shoulgina I.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 26.10.09.

А.В.Степанов, Н.В.Майоров, А.К.Никифоров

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ СИНТЕЗА ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ
ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА ПЦР-ТЕСТ-СИСТЕМ***ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

В результате проведенных исследований усовершенствована технология синтеза олигонуклеотидных праймеров – ингредиентов выпускаемых РосНИПЧИ «Микроб» ПЦР-тест-систем. Установлено, что использование 25 % водного раствора аммиака при аммолизе увеличивает выход конечного продукта до 93 %, а применение растворов Сар А № 1 и Сар Б № 3 на стадии кэппирования – на 16 %. Использование усовершенствованной технологии синтеза олигонуклеотидов для производства генодиагностических препаратов позволит увеличить количество выпускаемой продукции и снизить затраты на дорогостоящие реагенты.

Ключевые слова: синтез олигонуклеотидов, кэппирование, аммолиз.

Синтетические фрагменты ДНК находят все более широкое применение в работах как молекулярно-биологического, так и медицинского характера. Олигонуклеотиды используются в ПЦР для детекции ДНК и РНК различных возбудителей, типирования, в качестве зондов при гибридизации, а также линкеров, облегчающих клонирование.

История синтеза олигонуклеотидных праймеров началась в 60-х годах прошлого века. Основной вклад в его развитие внесли Н.G.Khorana и соавторы, осуществившие в 1968 г. химический синтез фрагментов нуклеиновых кислот заданной последовательности. В 1970 г. они впервые синтезировали полный ген аланиновой транспортной РНК.

Первый метод синтеза, получивший название фосфодиэфирного, был основан на образовании фосфодиэфирной связи между нуклеотидами. Однако этот метод оказался малоэффективным из-за ряда побочных реакций, приводящих к значительным временным затратам и низкому выходу продукта.

Фосфотриэфирный метод, разработанный вскоре, позволил сократить синтез до нескольких часов, в отличие от фосфодиэфирного, протекавшего несколько суток.

В начале 80-х годов американский ученый М.Н.Caruthers (1984) разработал твердофазный амидофосфитный метод синтеза. Синтезируемая цепь ДНК при этом фиксируется на твердом носителе, что позволяет проводить процессы в одной емкости, легко отмывать после каждого этапа использованные реагенты и добавлять новые в количестве, обеспечивающем возможно полное протекание реакции. Открытие твердофазного метода стало настоящим прорывом в технологии синтеза.

Среди существующих в настоящее время твердофазных разновидностей синтеза, наиболее популярными являются Н-фосфонатный и фосфитамидный методы. В Н-фосфонатном используются Н-фосфонатные синтоны [2, 3], в фосфитамидном в качестве синтонов используются фосфорамидиты [1].

Нами при производстве препаратов для генной диагностики особо опасных инфекций используется фосфитамидный метод. Его основным преимуществом является существенно меньшее время образо-

вания связи между Р- и ОН-компонентами, которое занимает несколько минут, против нескольких часов, например, у фосфотриэфирной или нескольких дней при фосфодиэфирной конденсации. Кроме того, исходные реагенты для фосфоамидитного синтеза более стабильны, что позволяет хранить их в течение длительного времени.

Известно, что синтез праймеров представляет собой циклический процесс. За время каждого цикла происходит присоединение одного из оснований. Цикл состоит из пяти этапов: первый – твердая фаза с пришитым химическим способом мономером обрабатывается трихлоруксусной кислотой для удаления защитной группировки; второй – происходит активация добавляемого в реакционную среду мономера; третий – осуществляется непосредственно синтез олигонуклеотида; четвертый – происходит кэппирование – процесс блокирования продуктов, не вступивших в синтез; пятый (заключительный) – межнуклеотидная связь из фосфитной, с помощью окислителя, переводится в более устойчивую – фосфатную.

После пятого этапа начинается следующий цикл и продолжается до тех пор, пока цепочка олигонуклеотида не достигнет заданной длины. По окончании синтеза производится аммолиз – снятие защитных групп и отсоединение праймера от полимерного носителя. Далее праймеры очищаются от примесей посредством обращенно-фазовой хроматографии на RP-картриджах, гель-электрофорезом в полиакриламиде, а также при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Для оценки качества синтеза проводят вертикальный электрофорез полученного продукта в 20 % ПААГ (полиакриламидном геле) в денатурирующих условиях или лазерную десорбционно-ионизационную спектрометрию.

Для количественной оценки олигонуклеотида определяют его оптическую плотность при 260 нм.

Задача, которую мы поставили в своих исследованиях, заключалась в изучении возможности повышения эффективности синтеза олигонуклеотидных праймеров на стадиях аммолиза и кэппирования для увеличения их количественного выхода и сни-

жения материальных затрат, что особенно важно в условиях масштабного производства генодиагностических препаратов.

Материалы и методы

Синтез олигонуклеотидов stx2 – 5'-cgggcagat-tctagacctcctg-3' и stx3 – 5'-cgatgatcttgga-gcattccac-3', входящих в состав ПЦР-тест-системы ГенХол, проводили в восьмиканальном синтезаторе ДНК ASM-800 (Биоссет, Россия) твердофазным фосфитамидным методом.

Эксперименты по изучению влияния аммонолиза на выход конечного продукта проводили двумя приемами: стандартным – раствором моноэтаноламина (Экрос, Россия) в воде (2:1) в течение 1 ч при температуре 60 °С и экспериментальным – с 25 % аммиаком (Экрос, Россия) в течение 12 ч при температуре 50 °С.

Изучение влияния кэспирующих растворов проводили следующими стандартными и экспериментальными реактивами: деблокирующий раствор – 3 % трихлоруксусная кислота (Экрос, Россия) в дихлорметане (Merck, Германия); активатор – 0,4 М раствор тетразола (Технолог, Россия) в ацетонитриле (Panreac, Испания); окислитель – смесь, состоящая из 0,1 М йода (Экрос, Россия) в растворе уксусной кислоты (Экрос, Россия) и пиридина (Лаверна, Россия) в пропорции (1:9); 0,05 М раствор амидофосфитных производных нуклеозидов (Glen Research, США) в ацетонитриле; кэспирующий раствор А № 1, состоящий из уксусного ангидрида (Acros, США), 2,6-лутидина (Merck, Германия) и ацетонитрила в соотношении 1:1:8; кэспирующий раствор А № 2, состоящий из ацетонитрила и уксусного ангидрида в соотношении 9:1; кэспирующий раствор А № 3, состоящий из 22,5 % раствора уксусного ангидрида в ацетонитриле; кэспирующий раствор Б № 1, состоящий из 1-метилимидазола (Aldrich, США), пиридина и ацетонитрила в соотношении 1:1:8; кэспирующий раствор Б № 2, состоящий из 6,5 % раствора диметиламинопиридина (Fluka, Швейцария) в пиридине и ацетонитриле в соотношении 1:8; кэспирующий раствор Б № 3, состоящий из 1-метилимидазола, триэтиламина (Merck, Германия) и ацетонитрила в соотношении 1:4,5:14,5; кэспирующий раствор Б № 4, состоящий из 1-метилимидазола и ацетонитрила в соотношении (1:4). Уксусный ангидрид и пиридин очищали обычной перегонкой, дихлорметан и ацетонитрил перегоняли над пентоксидом фосфора.

Очистку синтезированных праймеров осуществляли методом обращенно-фазовой хроматографии на RP-картриджах (ChemGenes, США) на двухканальной системе очистки OPS-201 (Биоссет, Россия). Затем олигонуклеотиды переосаждали 6 % перхлоратом лития (Fluka, Швейцария) в ацетоне (Экрос, Россия), отмывали от солей ацетоном и подсушивали этоксиэтаном (Вектон, Россия).

Качество синтезируемого продукта проверяли

электрофорезом в 20 % ПААГ (Reanal, Венгрия) в денатурирующих условиях (с 7 М мочевиной). В качестве лидирующего красителя использовали смесь 0,05 % бромфенолового синего и 0,05 % ксиленианола (Диа-М, Россия) в 95 % водном растворе формамида (Merck, Германия) с 10 мМ NaOH (Хеликон, Россия). Для окрашивания полос и визуализации результата использовали 0,75 % Stains-all (Serva, Германия) в 50 % водном растворе формамида.

Оптическую плотность олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически при 260 нм на СФ-26 (ЛОМО, Россия) в 1 мм кварцевых кюветах и пересчитывали в пмоль/мкл с помощью формулы:

$$C = \frac{10 \cdot A_{260}}{1,54 \cdot nA + 0,75 \cdot nC + 1,17 \cdot nG + 0,92 \cdot nT},$$

где A_{260} – коэффициент поглощения при длине волны 260 нм, а nA, nC, nG, nT – количество оснований в нуклеотидной последовательности праймера.

Аналитическую и специфическую активность праймеров stx2 и stx3 проверяли в составе изготавливаемой нами коммерческой ПЦР-тест-системы ГенХол. Для этого (в соответствии с ТУ 8895-006-01898109-2007) выращивали штаммы холерных вибрионов: классического биовара 569В, биовара эльтор: М-1298 и 158, а также *E. coli* 12226 О-55. Обеззараживание стандартных бактериальных суспензий и выделение ДНК осуществляли прогреванием при 56 °С в течение 30 мин с 0,01 % мертиолятом натрия в соответствии с методическими указаниями [5]. ДНК, полученную из тест-штаммов, в объеме 10 мкл вносили в ПЦР-реакционную смесь, состоящую из (приведены конечные концентрации): 0,7 М триса (ICN, США), 0,2 М аммония сернокислого (Sigma, США); 0,1 % Твина-20 (Sigma, США), 0,02 % БСА (Serva, Германия), 2 мМ дНТФ (Медиген, Россия), 1,5 мМ MgCl₂ (Serva, Германия) и 0,25 мкл (1,25 ед.) Taq-полимеразы (Бионем, Россия).

Термоциклирование проводили в амплификаторе МС-2 «Терцик» (ДНК-Технология, Россия) по матричному способу регулирования: предварительная денатурация при 94 °С в течение 5 мин; затем 35 циклов, включающих 3 шага по 30 с каждый: денатурация при 94 °С, отжиг при 60 °С и синтез при 72 °С; в заключение проводили дополнительный синтез в течение 7 мин.

Результат ПЦР оценивали методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле с бромидом этидия (0,5 мкг/мл). Документирование осуществляли с помощью Bio-Rad Gel Doc™ XR System (США). Данные обработаны с применением стандартных статистических методов [4].

Результаты и обсуждение

Аммонолиз – снятие синтезированного олигонуклеотида с твердофазного носителя и удаление защитных групп. Этот процесс, используемый в настоящее время и названный нами в дальнейшем стандартным,

закключается в снятии праймера с носителя водным раствором моноэтаноламина при температуре 60 °С. Стандартный прием занимает 1 ч, что позволяет синтезировать и очистить 4 пары праймеров за один день. Однако его существенным недостатком, по нашим наблюдениям, является низкий выход конечного продукта. Другой вид аммонолиза, называемый в дальнейшем предлагаемым, осуществляется 25 % водным раствором аммиака при температуре 55 °С в течение 12 ч. При таком способе обработки синтез 4 пар праймеров занимает два рабочих дня [7].

Нами было решено изучить стандартный и предлагаемый методы аммонолиза в сравнении и установить, какой из них обеспечивает наибольший выход конечного продукта.

Выбор праймеров ctx2 и ctx3 в качестве объекта для синтеза был обусловлен тем, что они входят в состав выпускаемого нами препарата для детекции ДНК возбудителя холеры ГенХол, процедура проверки которого стандартизирована, изложена в ТУ 8895-006-01898109-2007 и регулярно выполняется при его изготовлении.

Сравнительные эксперименты проводили в стандартных условиях одинакового масштаба синтеза – 40 нмоль. Всего было проведено 16 синтезов: 8 – с моноэтаноламином и 8 – с аммиаком. Получено 16 праймеров, из них 8 ctx2 и 8 ctx3, каждый из которых был охарактеризован количественно (по оптической плотности в ОЕ) и по специфической активности (в ПЦР). Количественный выход олигонуклеотидов (в ОЕ) представлен в таблице.

В результате проведенных исследований и как видно из таблицы использование аммонолиза с аммиаком приводит к существенному повышению выхода продукта. Так, например, для праймеров ctx2 и ctx3 при аммонолизе стандартным методом с использованием моноэтаноламина выход составил 2,93 и 3,85 ОЕ соответственно, а при использовании предлагаемого приема с гидроксидом аммония – 3,78 и 7,35 ОЕ.

Таким образом, использование предлагаемой методики приводит к увеличению выхода продукта: ctx2 – на 31 %, а ctx3 – на 93 %. Однако аммонолиз с использованием аммиака позволяет проводить полный синтез и очистку четырех пар праймеров за два рабочих дня, в то время как аммонолиз с моноэтаноламином – за один. Поэтому для оперативной работы и выполнения срочных заказов (синтез олигонуклеотидов в малых масштабах, не требующих высоких концентраций) более подходит метод синтеза с использованием моноэтаноламина, а для производ-

ственных целей, например масштабного производства генодиагностических препаратов, – аммонолиз с аммиаком.

На третьем этапе выход продукта составляет 96–98 %, и, как следствие, с каждым циклом увеличивается содержание непрореагировавших 5'-гидроксильных групп, что может привести к нарушению в последовательности синтезируемых праймеров. Чтобы исключить это явление проводят экппирование – ацетилирование непрореагировавших гидроксильных групп, после которого не вступившие в реакцию мономеры и цепочки олигонуклеотидов блокируются, теряя способность к образованию неспецифического продукта.

Для изучения влияния экппирования на выход олигонуклеотидов были использованы применяемые в настоящее время растворы, названные нами стандартными: экппирующий раствор А, состоящий из уксусного ангидрида, 2,6-лутидина и ацетонитрила в соотношении 1:1:8; экппирующий раствор Б, состоящий из 1-метилимидазола, пиридина и ацетонитрила в соотношении 1:1:8.

В качестве экспериментальных были использованы подобранные на основании литературных данных и в дальнейшем названные нами предлагаемыми следующие растворы:

Экппирующий раствор А (Сар А): Сар А № 2 – ацетонитрил и уксусный ангидрид в пропорции (9:1) [8]; Сар А № 3 – 22,5 % раствор уксусного ангидрида в ацетонитриле [1].

Экппирующий раствор Б (Сар Б): Сар Б № 2 – 6,5 % раствор диметиламинопиридина в пиридине и ацетонитриле в пропорции (1:8) [8]; Сар Б № 3 – 1-метилимидазол, триэтиламин и ацетонитрил в пропорции (1:4,5:14,5) [1]; Сар Б № 4 – 1-метилимидазол и ацетонитрил в пропорции (1:4) [6].

Изучение влияния экппирующих растворов и их сочетаний по сравнению со стандартной методикой проводили в условиях одинакового масштаба синтеза (40 нмоль). В качестве контроля использовали метод, заключающийся в применении растворов Сар А № 1 и Сар Б № 1. Для количественной оценки синтезируемых олигонуклеотидов использовали спектрофотометрическое определение оптической плотности при 260 нм. Результаты выражали в виде суммарной величины, включающей общее количество праймеров ctx2 и ctx3.

Результаты изучения влияния экппирующих растворов в различных сочетаниях на выход олигонуклеотидных праймеров приведены на рис. 1, на котором на оси ординат приведены используемые реагенты и их сочетания, а на оси абсцисс – суммарный выход праймеров ctx2 и ctx3 в оптических единицах, наименьший выход олигонуклеотидов (по сравнению с контролем – реагенты Сар А № 1 и Сар Б № 1) – от 6 до 7,5 ОЕ отмечался при использовании Сар А № 2 и Сар Б № 4, Сар А № 3 и Сар Б № 4, Сар А № 3 и Сар Б № 3 и Сар А № 3 и Сар Б № 2. Средние показатели – 3,7 ОЕ были продемонстрированы Сар А № 3 и Сар Б № 1. Высокие показатели – от 13 до 13,2 ОЕ

Влияние метода аммонолиза на количественный выход олигонуклеотидов ctx2 и ctx3

Синтезируемый праймер	Метод аммонолиза и выход продукта М±m ОЕ		Увеличение выхода праймера, %
	с моноэтаноламином	с аммиаком	
ctx2	2,93±1,15	3,78±1,47	31
ctx3	3,85±0,52	7,35±0,89	93

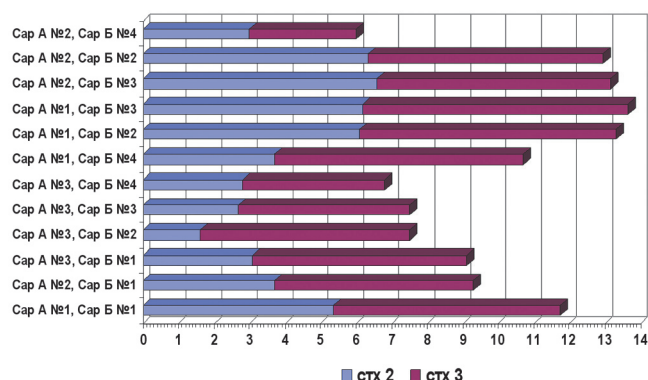


Рис. 1. Влияние экпирующих растворов и их сочетаний на суммарный выход олигонуклеотидных праймеров ctx2 и ctx3

отмечены при использовании Cap A № 2 и Cap B № 2, Cap A № 2 и Cap B № 3 и Cap A № 1 и Cap B № 2. Наибольший выход продукта – 13,7 ОЕ наблюдался при использовании Cap A № 1 и Cap B № 3.

Изучение влияния экпирующих растворов и их сочетаний на количественный выход олигонуклеотидов показало, что наилучшим эффектом обладает сочетание экспериментальных растворов Cap A № 1 и Cap B № 3. Их применение позволяет увеличить выход синтезируемого продукта на 16 % по сравнению с используемым в настоящее время стандартным способом.

Олигонуклеотиды ctx2 и ctx3, полученные с использованием отработанных приемов – аммонолиза с 25 % аммиаком и экпированием с растворами Cap A № 1 и Cap B № 3, в составе коммерческой тест-системы ГенХол были изучены в ПЦР для проверки ее аналитических и специфических свойств. Определение аналитической и специфической активности проводили в соответствии с ТУ 8895-006-01898109-2007 на «Тест-систему для выявления ДНК *Vibrio cholerae* (ctxA+) методом полимеразной цепной реакции». Для этого выращивали тест-штаммы – холерные вибрионы: классического биовара 569В; биовара эльтор: М-1298 и 158, а также *E. coli* 12226 О-55, готовили из них стандартные разведения, обеззараживали и выделяли ДНК. С полученной ДНК проводили ПЦР. Результаты представлены на рис. 2.

Постановка ПЦР с праймерами в составе тест-системы ГенХол, синтезированными с использованием отработанных приемов – аммонолиза с 25 % аммиаком и экпированием с растворами Cap A № 1 и Cap B № 3, продемонстрировала следующие результаты: трек № 1 – суспензия холерных вибрионов биовара эльтор 158 (ctxA-) – $1 \cdot 10^7$ м.кл./мл, результат отрицательный; трек № 2 – суспензия кишечной палочки 12226 О-55 – $1 \cdot 10^7$ м.кл./мл, результат отрицательный; треки №№ 3–5 – суспензия холерных вибрионов классического биовара 569В $1 \cdot 10^1$ – $1 \cdot 10^3$ м.кл./мл, результат положительный; треки №№ 6–8 – суспензия холерных вибрионов биовара эльтор М1298 – $1 \cdot 10^1$ – $1 \cdot 10^3$ м.кл./мл, результат положительный; треки №№ 9, 10 – препарат контрольной

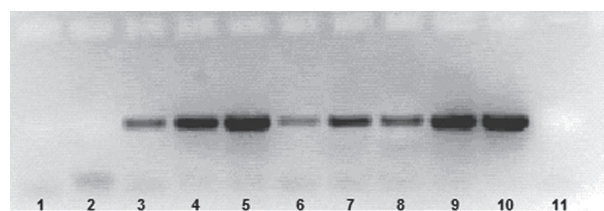


Рис. 2. Проверка праймеров ctx2 и ctx3 в составе ПЦР-тест-системы ГенХол с тест-штаммами. Электрофорез в 1,5 % агарозном геле с этидиум бромидом

ДНК в концентрации 0,1 и 1 нг/мкл, результат положительный; трек № 11 – отрицательный контроль, результат отрицательный.

Проверка ПЦР-тест-системы ГенХол с праймерами ctx2 и ctx3, синтезированных с помощью разработанных приемов, подтвердила ее соответствие требованиям ТУ 8895-006-01898109-2007: специфическая активность – не реагирует с отрицательными штаммами (холерными вибрионами биовара эльтор 158 и кишечной палочкой 12226 О-55, не содержащими специфическую область ДНК-мишени) – треки 1 и 2; аналитическая активность – положительный результат со штаммами, содержащими ctx-участок – в концентрации $1 \cdot 10^3$ м.кл./мл – треки 3–8 (рис. 2).

Таким образом, в результате проведенных экспериментов усовершенствована и оптимизирована схема синтеза олигонуклеотидных праймеров, входящих в состав выпускаемых ПЦР-тест-систем. Установлено, что использование 25 % водного раствора аммиака на стадии аммонолиза приводит к существенному увеличению выхода праймеров – до 93 %; применение экпирующих растворов в сочетании: Cap A № 1 и Cap B № 3 повышает количественный выход олигонуклеотидов – до 16 %; разработанные аммонолиз и экпирование в условиях масштабного производства генодиагностических препаратов позволяют значительно увеличить количество выпускаемой продукции и снизить затраты на дорогостоящие реагенты; подходы и методические приемы, использованные нами для решения поставленных задач, могут быть применены при оптимизации других этапов синтеза в технологии производства генодиагностических препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грязнов С.М., Потапов В.К., Метелев В.Г., Елов А.А., Пурмаль А.А., Шабарова З.А. Полностью автоматический синтез олигонуклеотидов фосфитамидным методом на синтезаторе «Виктория-4 М». Биоорганическая химия. 1986; 12 (7):988–91.
2. Ефимов В.А., Дубей И.Я. Модификация Н-фосфонатного метода синтеза олигонуклеотидов на полимерных носителях. Биоорганическая химия. 1990; 16(2):211–8.
3. Исагулянц М.Г., Самошин В.В., Макеева И.В., Смирнов В.Д. Эффективный синтез олиго(поли)дезоксирибонуклеотидов Н-фосфонатным методом в пластиковой микроколонке. Биоорганическая химия. 1990; 16(7):933–40.
4. Поллард Дж. Справочник по вычислительным методам статистики. М.: Финансы и статистика; 1982. 344 с.
5. Шевырев М.П., Федоров Ю.М., Куличенко А.Н., Осина Н.А., Шарова И.Н., Ляпин М.Н. и др. Методические указания МУ 1.3.1794-03. Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I–II

групп патогенности.

6. *Manoharan Muthiah, Jung Michael E., Rajeev Kallanthottathil G., Pandey Rajendra K., Wang Gang.* US Patent Application No: 2009/0005, 549 (2009).

7. *Syrjänen S.* Oligonucleotides. In: *Methods in Molecular Medicine*. Vol. 12. Stephenson J.R., Warnes A., editors. Diagnostic Virology Protocols. Humana Press; 1998. P. 341–65.

8. <http://www.glenresearch.com/GlenReports/GR17-13>.

A.V.Stepanov, N.V.Mayorov, A.K.Nikiforov

Improvement of Oligonucleotide Primers Synthesis Technology for PCR Test Systems Production

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

The investigations carried out resulted in the improvement of technology of synthesis of the oligonucleotide primers, components of the PCR test systems produced in the RARI "Microbe". The final product output was dem-

onstrated to increase by 93 % when 25 % aquatic ammonium solution was used for ammonolysis, and by 16 % if solutions Cap A N1 and Cap B N 3 were used at the stage of capping. Application of the improved technology of oligonucleotide synthesis for gene diagnostic preparations production will permit to increase the amount of the output products and reduce expenses for high-priced reagents.

Key words: oligonucleotide synthesis, capping, ammonolysis

Об авторах:

Степанов А.В., Майоров Н.В., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Stepanov A.V., Mayorov N.V., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 28.12.09.

А.И.Гончаров, Л.И.Шапошникова

ОБ ОСОБЕННОСТЯХ МОРФОЛОГИИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ *CALLOPSYLLA CASPIA* ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ЧАСТЕЙ ЕЕ АРЕАЛА

ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»

В результате проведенного анализа установлено, что в Китае обитает не *Callopsylla caspia fragilis*, а 1 или 2 новых (ssp. n.) подвидов *Cal. caspia*. А *Cal. yui* является не более, чем подвидом (stat. nov.) *Cal. caspia*. В Таджикистане, Афганистане и в Пакистане обитают представители нового (1 или 2) подвида *Cal. caspia*. Указаны особенности самок разных подвидов *Cal. caspia*.

Ключевые слова: новый подвид, ареал, половая клешня, крючок эдеагуса, дифференциальные признаки, синоним.

Callopsylla caspia (Ioff et Argyropulo, 1934) [5] был выделен В.Е.Тифловым по экземплярам, добытым им 26.05.1932 г. в Аксайском ущелье Заилийского Алатау (близ города Алма-Ата) из гнезда «мыши?» (вернее – полевки?), а так же 26.07.1932 и 11.08.1932 гг. из гнезда «*Dyromys*» (= *Dryomys*) *nit-edula angelus* (по-видимому, случайный хозяин).

Рисунки и описание этого вида были опубликованы только в 1937 г. [4]. А в 1934 г. в работе И.Г.Иоффа и А.И.Аргиропуло [5] по блохам Армении (т.е. тремя годами ранее) указаны особенности этого вида (без ссылок на В.Е.Тифлова) и поэтому И.Г.Иоффа и А.И.Аргиропуло теперь считают авторами первоописания.

Следует отметить, что у всех самцов, добытых В.Е.Тифловым в Заилийском Алатау, в средней части основания дигитоида имеется небольшой бугорок, как правило, отсутствующий у экземпляров из других мест (кроме одного самца из Болгарии). Вершина горизонтальной ветви девятого стернита острая, несколько изогнута вниз. Кроме того, у трех самцов из Заилийского Алатау, длинная щетинка на заднем крае дигитоида расположена близко к основаниям двух коротких шипиков, а расстояние между двумя длинными щетинками заднего края дигитоида варьирует.

Форма неподвижного отростка половой клешни и расположение оснований ацетабулярных щетинок у всех самцов из Заилийского Алатау разные. Вершина крючка эдеагуса едва изогнута вниз. Особенности дигитоида, горизонтальной ветви девятого стернита и крючка эдеагуса в разных частях ареала (т.е. у разных подвидов) *Callopsylla caspia* сильно отличаются.

У самки из Заилийского Алатау высота стигмы 8 тергита равна длине церка и ширине резервуара семеприемника. Особенности кавказских особей указаны ранее [5]. Склеротизация муфты копулятивной сумки уже, чем высота резервуара семеприемника.

У самцов из Бардобы (Алайская долина в Киргизии) вершина горизонтальной ветви 9 стернита округлая, а «клюв» крючка эдеагуса прямой и не-

много длиннее, чем у *Cal. c. caspia*. Задне-верхний край дигитоида без очень длинного выступа. Этот самец близок к самцу из Афганистана [6] и к особям из окрестностей озера Искандер-куль (Гиссарский хребет, Таджикистан). У самки из окрестностей озера Искандер-куль стигма 8 тергита менее высокая (гораздо короче церка), а резервуар семеприемника более узкий, чем у *Cal. c. caspia*.

У самцов из Пакистана (Гилгит; Hazara, Dist-Kaghan Valley) (ранее неправильно определенных как *Cal. fragilis* ssp. n.), в отличие от самца из Бардобы (ssp. n.), из окрестностей озера Искандер-куль и из Афганистана, задне-верхний край дигитоида заметно более вытянут. Вершина горизонтальной ветви 9 стернита округлая, а задне-нижний выступ на заднем крае дигитоида более смещен вверх. Но «клюв» крючка эдеагуса прямой, и крючок отличается от такового *Cal. c. fragilis* формой вентрального края.

У самки из Пакистана высота стигмы 8 тергита немного меньше длины церка, а резервуар семеприемника относительно узкий (его высота заметно меньше склеротизации копулятивной сумки). Пакистанских особей, по нашему мнению, целесообразно относить к новому подвиду *Cal. caspia* ssp. n., а его описание будет дано в отдельном сообщении.

Из Болгарии (Родопы) описан [8] подвид *Cal. caspia rhodopeia*, близкий к *Cal. c. caspia* (но опубликован только рисунок половой клешни). У исследованных нами двух самцов из Болгарии форма дигитоида и вершины горизонтальной ветви 9 стернита, расположение оснований ацетабулярных щетинок, длина тела и манубриума половой клешни несколько отличались. *Cal. c. rhodopeia* помещен [9] в синонимы *Cal. caspia*, но, в отличие от *Cal. c. caspia*, у *Cal. c. rhodopeia* (= ssp. propria), вершина горизонтальной ветви 9 стернита не острая, а соотношение длины тела половой клешни к его ширине (41:37) меньше (у *Cal. c. caspia* – 40:28). У самки *Cal. c. rhodopeia* стигма 8 тергита гораздо шире высоты резервуара семеприемника и равна ширине склеротизации в узкой (равной высоте стигмы 8 тергита) муфте ко-

пулятивной сумки.

В 1953 г. опубликовано [3] краткое описание *Cal. fragilis*, позже помещенного [9] в синонимы *Cal. caspia*. Но у самцов *Cal. c. fragilis* вершина узкой горизонтальной ветви 9 стернита широкоокруглая, а задне-нижний край дигитоида расположен более высоко (на уровне основания верхней ацетабулярной щетинки), чем у *Cal. c. caspia*. Наиболее надежно *Cal. c. fragilis* (= ssp. propria) отличается от близких подвидов и других видов формой вентрального края крючка эдеагуса (выемка этого края почти широкоокруглая). Форма неподвижного отростка половой клешни и задне-нижнего выступа дигитоида у разных особей (из Бетпакдала и в Карагандинской области) отличаются.

У самки ширина склеротизации в муфте копулятивной сумки равна высоте резервуара семеприемника, а высота стигмы 8 тергита немного короче церка.

На рисунке 469 в сводке по блохам Синьцзяна [10] и на рисунках 1712–1713 в работе по этим паразитам Китая [7] изображены самцы не *Cal. c. fragilis* (см. форму вершины горизонтальной ветви 9 стернита и вентрального края крючка эдеагуса), а *Cal. c. caspia* или весьма близкого к нему нового подвида (ssp. n.). Но, в отличие от «типичных» *Cal. c. caspia*, у этих самцов задне-нижний выступ дигитоида более сильно (как у *Cal. c. fragilis*) сдвинут вверх. Возможно, поэтому этих самцов отнесли к *Cal. c. fragilis*, но крючок эдеагуса у них сильно отличается от такового *Cal. c. fragilis*.

На рисунке 471 [10] у самки резервуар семеприемника узкий, длинный, а копулятивная сумка очень широкая (более чем вдвое шире высоты семеприемника). Склеротизация копулятивной сумки почти равна ширине придатка семеприемника (у *Cal. c. fragilis* – вдвое шире его).

У самца из Китая, весьма близкого к *Cal. c. caspia* и изображенного на рисунке 1707 [7], в отличие от типичных *Cal. c. caspia*, дорсальный край дигитоида короче длины тела половой клешни, а «клюв» крючка эдеагуса не меньше ширины горизонтальной ветви 9 стернита (у синтипов *Cal. c. caspia* – меньше). У самки, изображенной на рисунке 1708 [7], стигма 8 тергита невысокая (короче длины церка), а склеротизация в муфте копулятивной сумки, возможно, шире, чем у «типичных» *Cal. c. caspia*.

Следовательно, для территории Китая нет достаточно убедительных данных о наличии там *Cal. c. fragilis*, но на этой территории обитают представители *Cal. c. caspia* и подвида *Cal. caspia*, близкого (или идентичного) к обнаруженному в Таджикистане и изображенного на рис. 466 в сводке [10], а также на рис. 1707 [7] – еще одного нового подвида.

В 1950 г. З.М.Вовчинская [2] из Баян-Хонгорского аймака Монголии описала *Cal. gaiskii* (позже помещенный в число подвидов *Cal. caspia*), у которого субапикальная часть горизонтальной ветви 9 стернита узкая, дорсальный край дигитоида обычно более выпуклый, а задне-нижний выступ дигитоида

и верхняя щетинка на его заднем крае расположены гораздо выше, чем у типичных *Cal. caspia*. Средняя часть дигитоида у *Cal. c. gaiskii* (= ssp. propria) шире (дорсальный край в 2 раза длиннее середины), чем у *Cal. c. fragilis* (у последнего это соотношение равно почти 2,5:1), а длинная щетинка на его заднем крае расположена близко к основанию шипиков.

У самки на 7 стерните почти вдвое меньше щетинок, чем у *Cal. c. caspia*. Высота стигмы 8 тергита равна церку и немного больше высоты резервуара семеприемника и склеротизации в муфте копулятивной сумки.

В 1990 г. [10] опубликовано описание и рисунки *Cal. yui* и отмечено, что у нового вида дорсальный край дигитоида менее выпуклый (но такие самцы есть и в Тыве), чем у *Cal. gaiskii*, а задне-нижний выступ у некоторых особей расположен почти на середине его высоты.

У *Cal. yui* и *Cal. c. fragilis* рукоятка половой клешни более чем в 2,5 раза длиннее средней части дигитоида, а у *Cal. c. gaiskii* – менее чем вдвое. Из-за близкого расположения основания верхней длинной щетинки заднего края дигитоида к основанию шипиков, *Cal. yui* весьма (как и формой горизонтальной ветви 9 стернита и дигитоида) похож на *Cal. c. gaiskii*. Хотя у *Cal. yui* вершина крючка эдеагуса более изогнута вниз, а рукоятка половой клешни длиннее (больше дорсального края дигитоида), чем у *Cal. c. gaiskii* (у которого рукоятка короче или равна дорсальному краю дигитоида), считаем, что *Cal. yui* является одним из подвидов *Cal. caspia* (stat. nov.), весьма близким, если не идентичным *Cal. c. gaiskii*. Изучение дополнительных материалов позволит уточнить систематическое положение особей из Китая, так как в Национальной коллекции блох России, хранящейся в Ставропольском научно-исследовательском противочумном институте, имеются только единичные экземпляры блох из Китая.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гончаров А.И. О подвидах *Callopsylla caspia* (Ioff et Arguypulo, 1934). В кн.: Фауна Ставрополя: Межвуз. сб. науч. тр. Ставрополь, 1995; 6:146–7.
2. Иофф И.Г., Скалон О.И., Вовчинская З.М., Дарская Н.Ф., Емельянова Н.Д., Исаева-Гурвич Э.В. и др. Новые виды блох. Сообщение II. Мед. паразитол. и паразитарн. бол. 1950; 19(3):268–73.
3. Иофф И.Г., Гершкович Н.Л., Загнибородова Е.Н., Лабунец Н.Ф., Лебедев А.Д., Микулин М.А. и др. Новые виды блох (*Suctoria* – *Aphaniptera*). Сообщение III. Мед. паразитол. и паразитарн. бол. 1953; 5:460–5.
4. Туфлов В.Е. К изучению фауны блох (*Aphaniptera*) восточной части Казахской ССР. В кн.: Тр. Казахского филиала Академии Наук Союза ССР. 1937; 2:189–219.
5. Ioff I., Arguypulo A. Die Flohe Armeniens. Zeitschrift für Parasitenkunde. Berlin, 1934; 7(2):138–66.
6. Lewis R.E. *Siphonaptera* collected during the 1965 Street expedition to Afghanistan. Fieldiana Zoology. 1973; 64:161.
7. Liu C. et al. Fauna Sinica. Insecta. Siphonaptera. Beijing: Science press; 1986. 1334 s.
8. Rosicky B., Daniel M., Cerny V., Mrciak M., Gregor F., Povolny D. Zur Kenntnis der Flohe (*Aphaniptera*) Bulgariens. Vysledky zoologicke expedice CSAV do Bulgarska (Cast III). Prace Brnenske zakladny Ceskoslovenske Akademie Ved. Sesit 7, spis. 390, ročník XXXI. 1959. S. 321–54.
9. Smit F.G.A.M., Wright A.M. A list of code numbers of species and subspecies of *Siphonaptera*. Dep. of Entomology British Museum (Natural History). London; 1978.

10. Yu X., Ye R., Xie X. The fauna of Xinjiang. Xinjiang Peoples Publishing House, Urumqi; 1990. 542 s.

A.I.Goncharov, L.I.Shaposhnikova

**The Particularities of Morphology
of the *Callopsylla caspia*
Representatives from Different Parts of Its Areal**

Stavropol Research Anti-Plague Institute

The analysis carried out demonstrates that China is inhabited not with *Callopsylla caspia* fragilis, but with 1 or 2 new (ssp. n.) subspecies of *Cal. caspia*. *Cal. yui* was proved to be the subspecies (stat. nov.) of *Cal. caspia*. In Tadjikistan, Afghanistan and Pakistan representatives of new (1 or 2)

subspecies of *Cal. caspia* reside. Peculiarities of the females of different subspecies of *Cal. caspia* are presented.

Key words: new subspecies, area, reproductive claw, the aedeagus' hook, differential features, synonym.

Об авторах:

Гончаров А.И., Шапошникова Л.И. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Authors:

Goncharov A.I., Shaposhnikova L.I. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 355035, Stavropol, Sovetskaya St., 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 28.08.09.

И.С.Казина

ЭПИДЕМИОЛОГО-ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ЛЕПТОСПИРОЗАМ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ МОРДОВИЯ ЗА 2002–2008 гг.*ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Мордовия», Саранск*

В сообщении представлены результаты ретроспективного анализа заболеваемости лептоспирозами в Республике Мордовия за 2002–2008 гг. и основные направления эпидемиологического надзора за природными очагами этой инфекции.

Ключевые слова: лептоспирозы, природный очаг, мониторинг.

Медицинская значимость природно-очаговых инфекций определяется тяжестью клинического течения, высокой летальностью, большой стоимостью лечения и затрат на проведение противоэпидемических мероприятий. Исключительная стойкость микроорганизмов, а также циклическое возрастание их активности в природных очагах обуславливают постоянный риск инфицирования большого количества людей.

Лептоспирозы характеризуются наиболее широким распространением по сравнению с другими зоонозами. В последние годы во многих регионах Российской Федерации (РФ) отмечается ухудшение эпидемиологической ситуации по лептоспирозам, особенно в Южном, Приволжском, Центральном федеральным округам.

Республика Мордовия (РМ) входит в состав Приволжского Федерального округа, располагается в лесостепной зоне. Случаи заболевания лептоспирозами среди людей на протяжении ряда лет отмечены на всей территории республики, характерно наличие районов с относительно стабильной и высокой заболеваемостью: Большеберезниковский – 26,1; Инсарский – 21,6; Чамзинский – 15,9; Ковылкинский – 8,3; Краснослободский – 9,2; Рузаевский и Кочкуровский – 6,2; Дубенский – 6,4; Торбеевский – 5,2; г. Саранск – 11,5 на 100 тыс. населения.

К настоящему времени доказано существование на территории Мордовии сочетанных природных очагов лептоспирозов, ГЛПС и туляремии [6]. Долевое соотношение заболеваний в сочетанных природных очагах различно: преобладают сочетания лептоспирозов и ГЛПС (51,6 %) в восточном районе и ассоциации вышеназванных трех инфекций (25,8 %) в центральном районе.

Лептоспирозы на территории республики регистрируются с 1956 г., к эпидемиологическим особенностям следует отнести разную интенсивность эпидемического процесса. Результаты анализа заболеваемости лептоспирозами свидетельствуют о напряженной эпидемиологической ситуации по данной инфекции в 2002–2008 гг. За предыдущие 6 лет до анализируемого периода эпидемиологическая обстановка по лептоспирозам была стабильна, среднегодовой показатель составил 3,7 с колебаниями от 2,4 до

5,4 на 100 тыс. населения. В 2002 г. заболеваемость лептоспирозами на территории Мордовии резко возросла до 22,2 на 100 тыс. населения. Среднегодовой показатель в 2002–2008 гг. по сравнению с предыдущим периодом вырос в 4,1 раза, до уровня 15,3 на 100 тыс. населения. Более высокие показатели зарегистрированы в 2002 и 2004 гг., когда показатели заболеваемости равнялись 22,2 и 38,3 на 100 тыс. населения соответственно, среднегодовой показатель составил 20,8 на 100 тыс. населения. На фоне снижения показателей заболеваемости в 2005 г., по сравнению со среднегодовым показателем за 2002–2004 гг., в последующие три года (2006–2008 гг.) в динамике эпидемического процесса отмечается тенденция к росту заболеваемости.

Внутригодовая динамика заболеваемости лептоспирозами характеризуется выраженной летне-осенней сезонностью с активацией эпидемического процесса в июле – октябре, с пиком заболеваемости в августе. При этом сумма заболеваний в месяцы сезонного подъема составляет 85 % от годовой [2].

На территории Мордовии выявлены постоянно функционирующие природные очаги лептоспироза, играющие основную роль в инфицировании населения лептоспирозами. Заражение людей в природных очагах происходит в летне-осенний период при повышении эпидемической активности очагов. В целях обеспечения их мониторинга обследованы различные виды стадий (ометы, лесокустарниковые, лугополевые, околотовные) во все периоды года. На территории республики обитает 7 видов мелких млекопитающих: рыжая, обыкновенная полевка, полевая, лесная, желтогорлая и домовая мыши, бурозубка [1, 2, 3]. С 1999 г. доминирует в отловах рыжая полевка, ее доля колеблется от 8 до 90 %. В 2008 г. в лесокустарниковых стадиях доминировала лесная мышь (в 2007 г. – рыжая полевка), в лугополевых – полевая мышь (в 2007 г. – рыжая полевка), в околотовных – бурозубка (аналогично в 2007 г.). В населенных пунктах продолжает размножаться домовая мышь [4, 5].

Роль сельскохозяйственных животных в эпидемическом процессе лептоспирозов неоднозначна. Так, в 2008 г., по сравнению с предыдущим годом, наблюдается снижение количества положительно

реагирующих животных в РМА: у лошадей – с 40 % в 2007 г. до 6,8 % в 2008 г., крупного рогатого скота – с 19 % до 3 %, свиней – с 3 % до 0,04 %. При изучении структуры лептоспир, циркулирующих у животных, при обследовании крупного рогатого скота выделены лептоспиры группы *Pomona*, *Grippotyphosa*, *Icterhaemorrhagiae*, *Tarassovi*, *Sejroe*, *Hebdomadis*, лошадей – *Pomona*, *Grippotyphosa*, свиней – *Grippotyphosa*. Преобладали серогруппы *Pomona* и *Hebdomadis*, по данным 2007–2008 гг. [3].

Согласно полученным нами результатам этиологическая структура лептоспирозов среди населения отличается от таковой у сельскохозяйственных животных. Серопейзаж лептоспир у больных, выявленных за период 2005–2008 гг., представлен серогруппами *Australis*, *Grippotyphosa*, *Pomona*, *Icterhaemorrhagiae*, *Canicola*, *Tarassovi* [2]. Из общего числа лабораторно подтвержденных случаев лептоспирозов при первичном обследовании доминировала доля лептоспир серогруппы *Australis* (антитела к *Leptospira australis*, по всей вероятности, относятся к межгрупповым и синтезируются на ранних стадиях инфекции, вызываемой возбудителями других серогрупп): 2008 г. – 76 %, 2007 г. – 36,4 %, 2006 г. – 41,3 %, 2005 г. – 18,9 %; удельный вес серогруппы *Grippotyphosa* составил в 2008 г. – 4 %, 2007 г. – 33,3 %, 2006 г. – 23,9 %, 2005 г. – 40,5 %; *Icterhaemorrhagiae*: 2008 г. – 4 %, 2007 г. – 12,1 %, 2006 г. – 10,8 %, 2005 г. – 1,8 %; *Canicola*: 2008 г. – 4 %, 2007 г. – 3,0 %, 2006 г. – 17,4 %, 2005 г. – 0 %; *Pomona*: 2008 г. – 4 %, 2007 г. – 6,1 %.

Диагноз «лептоспироз» у основной части больных выставляется на основании клинико-эпидемиологических данных, в 2008 г. подобные случаи составили 65,8 % от общего числа случаев лептоспирозов за год, в 2007 г. – 62,1 %, в 2006 г. – 38,7 %, в 2005 г. – 27,8 %.

Для лабораторной диагностики лептоспирозов в настоящее время используют иммунологический (РМА) и бактериологический методы. Высокий удельный вес серопозитивных лиц (до 26–27 % от числа обследованных) свидетельствует о постоянно протекающем процессе инфицирования населения [3]. Нередко заболевание лептоспироз подтверждается у пациентов с предварительным диагнозом, не исключая лептоспироз: ГЛПС, ОРЗ, ЛНЭ, острый пиелонефрит, вирусный гепатит, ЭВИ, пневмония.

Наибольшие показатели заболеваемости отмечены у лиц от 20 до 49 лет (52 %). Заслуживает внимания тот факт, что в годы эпидемического подъема дети до 14 лет активнее участвуют в эпидемическом процессе лептоспирозов. Среди заболевших преобладают мужчины (72 %), имея больший риск заражения. Городское население болеет чаще сельского [1, 2].

При изучении профессионального состава выявлено, что наибольшую долю среди заболевших составляют служащие – 24,3 %, рабочие – 28,3 %, уча-

щиеся – 15,0 %, неработающие – 14,1 % [1].

Анализ структуры заболеваемости лептоспирозом по условиям заражения показал, что преобладают заражения, связанные с купанием в открытых водоемах – 37,9 %, связанные с работами в бытовых условиях (работы с сеном, соломой, фуражом) составляют 10,8 %, при уходе за с/х животными – 6,2 % и 16,5 % больных связывали свое заболевание с выездом и посещением дачных участков [1, 2, 3].

На территории Мордовии заболеваемость проявляется в виде спорадических случаев и эпидемических вспышек – «купальные» вспышки [4]. Так, наиболее сложная эпидемиологическая и эпизоотологическая ситуация по лептоспирозу сложилась на территории республики в 2004 г., было зарегистрировано 337 случаев, показатель заболеваемости составил 38,5 на 100 тыс. населения. Высокие показатели заболеваемости отмечены в Саранске, Zubovo-Полянском, Большеберезниковском, Ковылкинском, Торбеевском, Чамзинском районах. В этиологической структуре преобладали лептоспиры серогруппы *Grippotyphosa*. Заражения были связаны в основном с купанием и употреблением воды из открытых водоемов (85 % случаев). Пик заболеваемости пришелся на август – 46 % (155 случаев) и сентябрь – 35 % (118 случаев). Причем за этот период 89 больных лептоспирозом выявлены в Zubovo-Полянском районе, в основном они имеют общие условия и место заражения (купание в р. Парца в черте пос. Zubovo-Поляна), 36 % больных – это дети до 14 лет. При проведении лабораторных исследований выявлены антитела к лептоспирам серогруппы *Grippotyphosa*. За аналогичный период времени в Саранске выявлено 83 случая лептоспироза, в 70 % заболевание протекало как безжелтушная форма, средней степени тяжести. Диагноз лабораторно подтвержден в 86,5 % случаев, в 60 % заболевание вызвано моноинфекцией *L. grippotyphosa*, в 32 % – микстинфекцией *L. grippotyphosa* + *L. australis*. Подъем заболеваемости был обусловлен высокой численностью мышевидных млекопитающих и эпизоотией среди них, не исключалось участие в эпидемическом процессе инфицированного лептоспирами крупного рогатого скота.

Одним из основных моментов в эпидемиологии лептоспироза на территории Республики Мордовия продолжает оставаться сохранение и активное функционирование очагов лептоспироза, что требует постоянного внимания со стороны работников лечебно-профилактических учреждений и санитарно-эпидемиологической службы: обеспечение своевременной дифференциальной диагностики лептоспирозов у людей, проведение мониторинга природных очагов лептоспироза и комплекса профилактических и противоэпидемических мероприятий для предотвращения вспышечной заболеваемости среди населения [3, 4].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

I.S.Kazina

1. Бондаренко А.Л., Утенкова Е.О., Русских Г.А., Хмелевская Н.С. Эпидемиология лептоспироза в Кировской области. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2002; 3:27–30.
2. Волкова Е.Г., Меркулов А.В., Нафеев А.А. Эпидемиологический анализ некоторых инфекций с природной очаговостью в Ульяновской области. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2002; 3:112–4.
3. Макеев С.М., Марамович А.С., Носков А.К., Чернявский В.Ф., Кондаков А.А., Краснощек В.Н. и др. Эпидемиолого-эпизоотологическое районирование территории и профилактика лептоспирозов в Дальневосточном Федеральном округе. Пробл. особо опасных инф. 2007; 2(94):24–7.
4. Нафеев А.А. Групповая заболеваемость лептоспирозом на эндемичной территории. Эпидемиол. и инф. бол. 2006; 2:54–5.
5. Родина Л.В., Тимошков В.В., Цвиль Л.А., Маненкова Г.М., Салова Н.Я., Голованова В.П. и др. Состояние природных очагов лептоспирозов на территории Москвы в 1995–2004 годах. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2006; 2:78–81.
6. Чумаков М.Э. Сочетанные природные очаги некоторых инфекционных заболеваний в Республике Мордовия. РЭТ-инфо. 2004; 5:24–7.

**The Epidemiological and Epizootiological Situation
on Leptospirosis in the Territory of the Republic of Mordovia
for 2002–2008**

Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Mordovia, Saransk

Presented are the results of retrospective analysis of leptospirosis morbidity in the Rrepublic of Mordovia for 2002–2008. Main directions of the epidemiologic surveillance in natural foci of this infection were shown.

Key words: leptospirosis, natural focus, monitoring.

Об авторах:

Казина И.С. Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Мордовия. 430030, Республика Мордовия, г. Саранск, ул. Дальняя, д. 1 а.
E-mail: cgie@moris.ru

Authors:

Kazina I.S. Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Mordovia. 430030, Republic of Mordovia, Saransk, Dalnaia St., B. 1 a.
E-mail: cgie@moris.ru

Поступила 13.04.09.

Е.Н.Кочетов, А.И.Богачева, Ю.В.Андрущенко

ОПЫТ ПОДГОТОВКИ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ФОРМИРОВАНИЙ В РЕСПУБЛИКЕ МОРДОВИЯ

ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Мордовия», Саранск

Описаны первые республиканские соревнования групп эпидемиологической разведки, проведенные на базе Центра гигиены и эпидемиологии в Республике Мордовия.

Ключевые слова: санитарно-противоэпидемический отряд (СПЭО), противоэпидемические мероприятия.

Республика Мордовия расположена в Приволжском Федеральном округе. На севере граничит с Нижегородской областью, на северо-западе – с Рязанской, на востоке – с Республикой Чувашия, на юге – с Пензенской и Ульяновской областями. Численность населения составляет 840391 тыс. чел. В составе населения преобладают русские, мордва, татары.

Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Республике Мордовия представлена Управлением Роспотребнадзора и пятью территориальными отделами, Федеральным государственным учреждением здравоохранения «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Мордовия» и его пятью филиалами в районах.

Согласно Перечню потенциально опасных объектов экономики в республике расположено более 11 предприятий, на которых содержится хлор и аммиак (ОАО «Биохимик», молочный комбинат и др.). Взрыво- и пожароопасные объекты – это и газонаполнительные станции, предприятия «Резинотехника», «Саранскабель», «Орбита» и др. Легковоспламеняющиеся горючие вещества, нефтепродукты (элеватор, компрессорные станции и др.).

В действующих законодательных и иных нормативно-правовых актах важная роль в составе сил гражданской обороны отводится нештатным аварийно-спасательным формированиям и спасательным службам. Повышаются требования к их созданию, оснащению, подготовке и обучению.

На базе ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Мордовия» сформирован санитарно-противоэпидемический отряд (СПЭО), а во всех пяти филиалах – группы санитарно-эпидемиологической разведки. В составе СПЭО структурно выделены радиологическая, санитарно-гигиеническая (токсикологическая) и эпидемиологическая бригады быстрого реагирования. Из их состава сформирована смешанная группа санэпидразведки для предварительной оценки ситуации и определения полноты развертывания отряда. СПЭО и группы санэпидразведки укомплектованы необходимыми приборами, СИЗ, автотранспортом, мобильной связью. Имеются изолирующие противогазы ИП-4, регенеративные патроны РП-4, противогазы ГП-7, респираторы, комбинезоны защитные «Тайвек классик Плюс», полубкомбинезоны, куртки, сапоги, ботинки, зимняя одеж-

да и многое другое согласно Табелю оснащения.

Для того чтобы ввести в подготовку специализированных формирований, наряду с проводимыми тактико-специальными учениями, такую форму обучения с элементами состязания и соперничества как соревнования, в 2009 г. принято решение организовать и провести Первые Республиканские соревнования групп санитарно-эпидемиологической разведки.

Основные задачи и цель соревнований:

- оценить укомплектованность групп средствами индивидуальной защиты, приборами разведки и другим имуществом по Табелю оснащения, а также знания и умение ими пользоваться;

- проверить и реально оценить готовность групп санитарно-эпидемиологической разведки к выполнению задач по предназначению в мирное и военное время;

- отработать взаимодействие в группе как при автономной ее работе в очаге, так и во взаимодействии с другими формированиями, а также порядок выполнения мероприятий по предупреждению и ликвидации последствий различных типов чрезвычайных ситуаций.

С целью непредвзятого судейства на соревнованиях по согласованию была определена судейская коллегия из сотрудников Управления Роспотребнадзора по Республике Мордовия и ГУ «Управление гражданской защиты Республики Мордовия».

Приказом Главного врача ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Мордовия» «Об организации подготовки и проведения республиканских соревнований групп санитарно-эпидемиологической разведки» утверждены разработанные организационные документы: Положение, План подготовки и проведения соревнований, сценарий, смета расходов, состав оргкомитета и судейской коллегии (по согласованию с задействованными органами и организациями), а также определены мероприятия по подготовке и проведению соревнований, назначены ответственные исполнители. Проведены учебно-методический сбор со старшими судьями 4 этапов соревнований, семинар с судейской коллегией, составлен график прохождения этапов соревнований, определены статисты на соревнования из числа сотрудников Центра.

Местом проведения соревнований определена территория Всероссийского экспериментального городка «Школа безопасности» Большеберезниковского

муниципального района.

К началу соревнований План подготовки был выполнен полностью. Проведена рекогносцировка района соревнований, дезобработка местности от клещей и комаров, уборка и подготовка мест размещения групп, автотранспорта, организовано горячее питание для участников, исследована вода на микробиологические, санитарно-химические показатели. Оборудованы районы этапов соревнований, проведена имитация очагов поражения, подготовлены имитационные билеты, судейские и оценочные листы, итоговые протоколы, стенды и наглядная документация, решены вопросы обеспечения соревнований громкоговорящей связью, видеосъемкой, приглашены представители СМИ и т.д.

Первые Республиканские соревнования санитарно-эпидемиологической разведки проходили в IV этапе:

I – проверка оснащения группы санитарно-эпидемиологической разведки и умения им пользоваться;

II – работа группы санитарно-эпидемиологической разведки в зоне радиоактивного загрязнения местности;

III – работа группы санитарно-эпидемиологической разведки в зоне химического поражения;

IV – работа группы санитарно-эпидемиологической разведки в эпидемиологическом очаге.

На I этапе оценивалось оснащение групп средствами индивидуальной защиты, приборами разведки, укладками для отбора проб и другим имуществом (полнота, качество и соответствие нормам) по Табелю оснащения, утвержденному Приказом Федеральной службы, а также знание и умение им пользоваться. Это один из основных критериев готовности группы к выполнению поставленных задач по предназначению. На этом этапе отрабатывался и проверялся норматив по надеванию противогазов в составе группы на время.

На II, III, IV этапах (условно в очагах радиоактивного загрязнения, химического поражения и эпидемиологического очага) группы отрабатывали практические мероприятия по разведке: инструментальные замеры, отбор проб из объектов окружающей среды и пищевых продуктов, от инфицированного больного и контактировавших с ним, расчет зоны поражения и ее ограждение знаками, оценка обстановки в зоне, частичная дезактивация личного состава и автотранспорта. Оценивалась слаженность действия группы по вводной. Проведен смотр наглядной агитации (санбюллетений).

Противоэпидемические мероприятия, направленные на локализацию очага холеры и предупреждение распространения заболевания среди населения, проводились согласно СП 3.1.1.2521-09 «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории РФ». Был проведен учет информации об эпидемиологической обстановке – сбор анамнеза у больного, его изоляция с дальнейшей эвакуацией на спецтранспорте.

Эпидемиологическое обследование в очаге – определение круга контактных лиц и направление

их в изолятор, активное выявление других случаев проявления заболевания, проведение антибиотико-профилактики.

Проведен комплекс мероприятий, направленных на локализацию эпидемического очага и прерывание путей передачи инфекции. Разработана и предоставлена оперативная информация о состоянии эпидемиологического очага холеры в штаб по организации противохолерных мероприятий.

Пробы, отобранные для исследования на холеру, были доставлены в лабораторию особо опасных инфекций ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в РМ» в течение двух часов с момента отбора (в качестве транспортной среды использовалась 1 % пептонная вода). Лабораторная диагностика проб проводилась согласно МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры» с использованием зарегистрированных (внесенных в государственный реестр) и разрешенных к применению на территории Российской Федерации питательных сред, диагностических препаратов и тест-систем. При проведении ПЦР-диагностики использовалась тест-система АмплиСенс *Vibrio cholerae*-FL, производства ФГУН НИИЭГ, Москва. По окончании всех экспресс-методов и бактериологических исследований был дан письменный окончательный отрицательный ответ (через 48 ч).

По итогам результатов 4 этапов судейская коллегия определила победителей и лучших в номинациях. Они награждены переходящим кубком, грамотами и ценными подарками. На торжественном закрытии соревнований каждая из команд представила свой номер художественной самодеятельности. Был смонтирован видеофильм. На совещании по итогам соревнования были разобраны допущенные ошибки и составлен план их устранения. Поставлены задачи по дальнейшему оснащению СПЭО и ГСЭР. Цель и задачи соревнований, которые руководящий состав и организационный комитет ставили перед участниками, были успешно выполнены.

E.N.Kochetov, A.I.Bogacheva, Yu.V.Andrushchenko

The Experience of Specialized Teams Training in the Republic of Mordovia

Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Mordovia, Saransk

Described are the First Republican competitions of the teams of epidemiological reconnaissance carried out on the basis of Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Mordovia.

Key words: Sanitary Anti-Epidemic Team (SAET), anti-epidemic measures.

Об авторах:

Кочетов Е.Н., Богачева А.И., Андрущенко Ю.В. Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Мордовия. 430030, Республика Мордовия, г. Саранск, ул. Дальняя, д. 1 а. E-mail: cgie@moris.ru

Authors:

Kochetov E.N., Bogacheva A.I., Andrushchenko Yu.V. Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Mordovia. 430030, Republic of Mordovia, Saransk, Dalnaya St., B. 1 a. E-mail: cgie@moris.ru

Поступила 08.12.09.

К 70-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ВИКТОРА ВАСИЛЬЕВИЧА МАЛЕЕВА

Виктору Васильевичу Малееву, выдающемуся ученому-инфекционисту и эпидемиологу, организатору здравоохранения, заместителю директора Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии по научной и клинической работе Роспотребнадзора, академику Российской академии медицинских наук исполнилось 70 лет.

Начав свою трудовую и научную деятельность после окончания Андиганского государственного медицинского института врачом-педиатром, Виктор Васильевич с 1979 г. является заместителем директора ЦНИИ эпидемиологии, заведующим отделом инфекционной патологии. Его деятельность на этом посту связана не только с исследованиями в области инфекционной патологии и эпидемиологии, но и с выездами в очаги эпидемий опасных инфекций в различные регионы России и в страны Азии, Африки, Центральной и Южной Америки, где под его руководством осуществлялись диагностические, лечебные и противоэпидемические мероприятия.

С именем В.В.Малеева связаны создание оригинальной клинко-патогенетической классификации обезвоживания при холере и других острых кишечных инфекциях, разработка критериев оценки тяжести течения и методики интенсивной терапии наиболее распространенных инфекционных болезней, определение клинических особенностей вновь открытых и возвращающихся инфекционных болезней, в том числе особо опасных – холеры, чумы, геморрагических лихорадок, риккетсиозов, ТОРС, легионеллеза и др.

В.В.Малееву принадлежит открытие закономерностей нарушения системы свертывания крови при многих инфекционных болезнях и разработка терапии патологии гемостаза. Им разработаны клиническая и лабораторная диагностика, дифференциальная диагностика инфекционных болезней, концепция развития инфекционной службы на 2004–2008 годы. Предложенная им методика регидратационной терапии больных холерой позволила оказывать помощь в самых сложных условиях, добиваться достаточно быстрого терапевтического эффекта, а также значительно снизить летальность. Данная методика и по настоящее время является основной в терапии больных острыми кишечными инфекциями.

Академик В.В. Малеев уделяет большое внимание подготовке высококвалифицированных специалистов, под его руководством защищено несколько десятков докторских и кандидатских диссертаций.



Высоко ценятся его монографии и научные публикации, которые являются пособиями для инфекционистов, эпидемиологов, бактериологов.

Многогранна научно-общественная деятельность Виктора Васильевича. В 2002 г. В.В.Малеев избран действительным членом Российской академии медицинских наук. Он – заместитель председателя Научного совета по эпидемиологии, паразитологии и инфекционным болезням, член экспертного совета ВАК Министерства образования РФ, личный

представитель Председателя Правительства РФ в группе личных представителей премьер-министров государств Балтийского моря по борьбе с распространением инфекционных болезней, член Президиума Всероссийского научно-практического общества микробиологов, эпидемиологов и паразитологов. Виктор Васильевич является заместителем главного редактора журнала «Инфекционные болезни», членом редколлегии журналов «ЖМЭИ» и «Эпидемиология и инфекционные болезни», членом редакционного совета журнала «Проблемы особо опасных инфекций». Как член Координационного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации Виктор Васильевич много внимания уделяет проблемам обеспечения санитарно-эпидемиологической безопасности страны, решению вопросов борьбы с инфекционными болезнями.

Многолетняя научно-организационная деятельность В.В.Малеева, его неоценимый вклад в развитие медицинской науки, безупречный труд по заслугам высоко оценен Родиной. В 1996 году за разработку комплекса лечебных мероприятий при холере и других острых кишечных инфекциях ему была присуждена премия Правительства Российской Федерации, в 1997 г. – Государственная премия РФ за цикл работ по клинике, диагностике и терапии неизвестных ранее инфекционных болезней. За помощь в ликвидации эпидемии чумы в Индии в 1995 г. он награжден орденом Дружбы, а также медалями и другими знаками отличия.

Виктор Васильевич не только выдающийся ученый, но и обаятельный и доброжелательный человек. Увлекается изучением иностранных языков, решением шахматных задач, любит природу.

Редакционная коллегия и редакционный совет журнала «Проблемы особо опасных инфекций» сердечно поздравляют Виктора Васильевича с юбилеем, желают крепкого здоровья, дельнейших творческих успехов, новых научных свершений, талантливых учеников и долгих лет жизни.

УЧАСТИЕ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКОЙ БРИГАДЫ ФГУЗ РОСНИПЧИ «МИКРОБ», МОДЕРНИЗИРОВАННОЙ НА БАЗЕ АВТОШАССИ, В МЕЖДУНАРОДНОМ САЛОНЕ «КОМПЛЕКСНАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ – 2010»

С 18 по 21 мая 2010 г. на территории Всероссийского выставочного центра (Москва) и 21 мая на полигоне МЧС (Ногинск) в соответствии с распоряжением Правительства Российской Федерации от 2 сентября 2009 г. №1275-р проходил III Международный салон «Комплексная безопасность – 2010», организованный Министерством Российской Федерации по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий, Министерством внутренних дел, Пограничной службой ФСБ, Федеральной службой по военно-техническому сотрудничеству, ФГУП «Рособоронэкспорт» под патронатом и при поддержке Совета Безопасности Российской Федерации и Антитеррористического центра СНГ.

Это крупный российский выставочный проект, в рамках которого были наглядно продемонстрированы основные направления государственной политики в сфере обеспечения безопасности страны и ее граждан.

Тематика Салона была представлена несколькими направлениями, включая вооружение и технические средства сил спецназначения; технические средства пограничного и таможенного контроля; техника охраны; пожарная безопасность; средства спасения; медицина катастроф; противоэпидемическая и экологическая безопасность; промышленная безопасность; ядерная и радиационная безопасность; безопасность информации и связи; транспортная безопасность.

Специализированная противоэпидемическая бригада (СПЭБ) ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» на базе автошасси приняла участие в проведении Международного салона согласно приказу Роспотребнадзора от 19.04.2010 г. № 146, в целях демонстрации возможностей модернизированных специализированных противоэпидемических бригад Роспотребнадзора.

Были задействованы 25 человек личного состава и автотранспорт СПЭБ в количестве 7 единиц в соответствии с базовым табелем оснащения (мобильный комплекс СПЭБ – МК СПЭБ – в составе трех автомашин КАМАЗ и трех спецавтоприцепов; автобус и штабной автомобиль повышенной проходимости, спецавтомобиль повышенной проходимости для доставки инфекционного больного и дополнительно – грузовая автомашина «Газель»), а также лаборатория на базе пневмокарасного модуля.

Целью участия СПЭБ РосНИПЧИ «Микроб» в Международном салоне была демонстрация технических характеристик и возможностей работы модернизированной СПЭБ при ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций санитарно-эпидемиологического характера, в том числе в рамках международного сотрудничества.

14 мая автоколонна СПЭБ выехала из Саратова и через 20 часов, преодолев расстояние в 800 км, прибыла в Ногинск. 16 мая 2010 г. осуществлено развертывание МК СПЭБ на полигоне МЧС в Ногинске: размещение мобильного комплекса на территории



Экспозиция РосНИПЧИ «Микроб» на полигоне МЧС



Посещение экспозиции РосНИПЧИ «Микроб»
Руководителем Роспотребнадзора Г.Г.Онищенко



Посещение экспозиции РосНИПЧИ «Микроб»
министром по делам МЧС С.К.Шойгу

выставки, установка пневмокаркасной палатки, подготовка лабораторий к установке оборудования, подключение систем жизнеобеспечения, установка и подключение лабораторного оборудования. Время разворачивания мобильного комплекса составило 6 часов, что соответствует заявленным тактико-техническим характеристикам. Полное время разворачивания всех элементов экспозиции составило 8 часов.

17–19 мая проводилась подготовка к показу мобильного комплекса СПЭБ и некоторых элементов оснащения бригады (изолирующий костюм, мобильный изолятор, генератор горячего тумана, лабораторное оборудование). 20 мая проведена отработка рапортов ответственных специалистов и элементов демонстрации оборудования и оснащения СПЭБ.

21 мая состоялось открытие III Международного салона «Комплексная безопасность – 2010».

Экспозицию МК СПЭБ осмотрел Руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав

потребителей и благополучия человека Г.Г.Онищенко, который дал ей высокую оценку. Посетили экспозицию министр Российской Федерации по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий С.К. Шойгу, губернатор Саратовской области П.Л.Ипатов.

В рамках Международного салона «Комплексная безопасность – 2010» от РосНИПЧИ «Микроб» на ВВЦ 18–21 мая представлена экспозиция, включавшая три информационных стенда (мобильный комплекс СПЭБ Роспотребнадзора, опыт участия СПЭБ в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения в чрезвычайных ситуациях, модернизированная СПЭБ на базе пневмокаркасных модулей), продемонстрирован фильм «Модернизированные специализированные противоэпидемические бригады Роспотребнадзора».

Участие СПЭБ РосНИПЧИ «Микроб» в работе III Международного салона «Комплексная безопасность – 2010» наглядно продемонстрировало возможности мобильных комплексов СПЭБ Роспотребнадзора: самостоятельное передвижение на большие расстояния, быстрое разворачивание и приведение комплекса в готовность для работы в зоне ЧС, применение передовых диагностических и информационных технологий, современного высокотехнологичного лабораторного оборудования и средств связи, средств индивидуальной защиты и аппаратуры для проведения дезинфекционной обработки. Показана их способность к автономному функционированию в полевых условиях.

Руководитель Роспотребнадзора Г.Г.Онищенко в письме на имя директора РосНИПЧИ «Микроб» выразил благодарность за организацию и участие специалистов модернизированной СПЭБ института в Международном салоне «Комплексная безопасность – 2010».



Посещение экспозиции РосНИПЧИ «Микроб»
губернатором Саратовской области П.Л.Ипатовым