

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 106

4 · 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,
Н.А.Лушиной,
А.Ю.Мощиной

Подписано в печать 22.11.10
Формат 60×88 1/8
Бумага мелованная
Печать офсетная
Усл. печ. л. 10,5
Гарнитура Таймс
Заказ 1273

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. 106. 1–86

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 (Оболенск),
А.Н.Куличенко, докт. мед. наук, профессор (Ставрополь),
В.В.Кутырев, докт. мед. наук, член-корр. РАМН (Саратов),
Ю.М.Ломов, докт. мед. наук, профессор (Ростов-на-Дону),
Д.К.Львов, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва),
В.П.Бондарев, докт. мед. наук (Сергиев Посад),
В.В.Малеев, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва),
В.П.Сергиев, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва)

*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**

Онищенко Г.Г., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Грижебовский Г.М., Клиндухов В.П. Обеспечение защиты от биологических угроз при проведении олимпийских игр 5

Эпидемиология, биобезопасность

Князева Т.В., Чекашов В.Н., Поршаков А.М., Мокроусова Т.В., Матросов А.Н., Шилов М.М., Яковлев С.А., Кузнецов А.А., Толоконникова С.И., Шарова И.Н., Красовская Т.Ю. Распространение и численность иксодовых клещей и блох – переносчиков инфекционных болезней в полупустынной зоне Саратовского заволжья 9

Корзун В.М., Чипанин Е.В., Иннокентьева Т.И., Михайлов Е.П., Денисов А.В. Динамика эпизоотической активности и численности монгольской пищухи в Горно-Алтайском природном очаге чумы..... 13

Мананков В.В., Алексеев В.В., Смелянский В.П., Пашанина Т.П., Погасий Н.И., Путинцева Е.В., Британова А.Л., Антонов В.А., Алексеева В.В., Ткаченко Г.А., Савченко С.Т., Русакова Н.В., Фролова Г.И., Фролов А.Ю., Иоанниди Е.А., Божко В.Г., Попов С.Ф. Эпидемиологический мониторинг природного очага Крымской геморрагической лихорадки в Волгоградской области за период с 2000 по 2009 год 19

Тюрин Е.А., Иванов С.А., Маринин Л.И., Дятлов И.А., Ляпин М.Н. Боксирующие устройства, используемые при проведении работ с биологическими агентами I–II групп патогенности..... 23

Микробиология, диагностика

Гаева А.В., Булгакова Е.Г., Киреев М.Н., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Кутырев В.В. Внутривидовая дифференциация и определение очаговой принадлежности штаммов чумного микроба методом вычитающего рестрикционного фингерпринтинга 28

Иванова А.В., Казачинская Е.И., Качко А.В., Субботина Е.Л., Сорокин А.В., Разумов И.А., Нетеосов С.В., Локтев В.Б. Получение и иммунологическая характеристика рекомбинантных белков VP40 и NP филовировусов 32

Напалкова Г.М., Корсакова И.И., Храпова Н.П., Пивень Н.Н., Ломова Л.В., Булатова Т.В. Дифференциация патогенных и непатогенных буркхольдерий с помощью ракетного иммуноэлектрофореза 37

Стрельникова-Ааб Е.Н., Ливанова Л.Ф., Горяев А.А., Челдышова Н.Б., Смирнова Н.И. Авирулентные штаммы *Vibrio cholerae* O1 – продуценты протективного O1-антигена: получение и свойства 39

Иммунология

Бугоркова С.А., Задумина С.Ю., Пионтковский С.А., Бугоркова Т.В., Самойлова Л.В. Характеристика реакции клеток APUD-системы морских свинок как маркер адаптационно-компенсаторных процессов при аэрогенной иммунизации против чумы 43

Onischenko G.G., Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Grizhebovsky G.M., Klindukhov V.P. Ensuring of Protection from Biological Threats During Olympic Games

Epidemiology, Biosafety

Knyazeva T.V., Chekashov V.N., Porshakov A.M., Mokrousova T.V., Matrosov A.N., Shilov M.M., Yakovlev S.A., Kuznetsov A.A., Tolokonnikova S.I., Sharova I.N., Krasovskaya T.Yu. Distribution and Abundance of Ticks and Fleas, Infectious Diseases Vectors, in the Semi-Desert Zone of Saratov Trans-Volga Region

Korzun V.M., Chipanin E.V., Innokent'eva T.I., Mikhailov E.P., Denisov A.V. Dynamics of Epizootic Activity and Abundance of Mongolian Pika in the Altai Mountain Natural Plague Focus

Manankov V.V., Alekseev V.V., Smelyanskiy V.P., Pashanina T.P., Pogasiy N.I., Putintseva E.V., Britanova A.L., Antonov V.A., Alekseeva V.V., Tkachenko G.A., Savchenko S.T., Rusakova N.V., Frolova G.I., Frolov A.Yu., Ionnidi E.A., Bozhko V.G., Popov S.F. Epidemiological Monitoring of Crimean Hemorrhagic Fever Natural Focus in the Volgograd Region in 2000–2009

Tiurin E.A., Ivanov S.A., Marinin L.I., Dyatlov I.A., Lyapin M.N. Biosafety Cabinets Used in the Work with Biological Agents of I–II Pathogenicity Groups

Microbiology, Diagnostics

Gaeva A.V., Bulgakova E.G., Kireev M.N., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Kutyrev V.V. Intra-Species Differentiation and Determination of the Focal Belonging of Plague Microbe Strains Using Subtracted Restriction Fingerprinting

Ivanova A.V., Kazachinskaya E.I., Kachko A.V., Subbotina E.L., Sorokin A.V., Razumov I.A., Neteosov S.V., Loktev V.B. Obtaining and Immunologic Characterization of Filoviruses Recombinant Proteins VP40 and NP

Napalkova G.M., Korsakova I.I., Khrapova N.P., Piven' N.N., Lomova L.V., Bulatova T.V. Differentiation of Pathogenic and Non-Pathogenic Burkholderias Using Rocket Immunoelectrophoresis

Strelnikova-Aab E.N., Livanova L.F., Goryaev A.A., Cheldyshova N.B., Smirnova N.I. *Vibrio cholerae* O1 Avirulent Strains – Producers of Protective O1 Antigen: Obtaining and Peculiarities

Immunology

Bugorkova S.A., Zadumina S.Yu., Piontkovskiy S.A., Bugorkova T.V., Samoylova L.V. Characteristic of Cells' Reaction of APUD-System of Guinea Pigs as Marker of Adaptive-Compensatory Processes under Aerogenic Immunization against Plague

Бывалов А.А., Кутырев В.В. Опыт использования антигенов <i>Yersinia pestis</i> для разработки чумной химической вакцины	47	Byvalov A.A., Kutyrer V.V. The Experience of Application of <i>Yersinia pestis</i> Antigens for Plague Chemical Vaccine Development	
Дубровина В.И., Татарников С.А., Коновалова Ж.А., Войткова В.В., Мазепа А.В., Лукьянова С.В., Рычкова В.Н., Бельков А.И., Шкаруба Т.Т. Влияние туляремийного микроба разных подвигов на функциональную активность иммунокомпетентных клеток экспериментальных животных	51	Dubrovina V.I., Tatarnikov S.A., Konovalova Zh.A., Voitkova V.V., Mazepa A.V., Lukiyanova S.V., Rychkova V.N., Belkov A.I., Shkaruba T.T. Influence of Tularemia Microbe of Different Subspecies on the Functional Activity of Immunocompetent Cells of Experimental Animals	
Биотехнология		Biotechnology	
Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Киреев М.Н., Кочкалова Н.Н., Генералов С.В., Селезнева А.Г., Савицкая Л.В., Иванов Ю.В. Определение молекулярных параметров препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина методом гель-фильтрации	54	Abramova E.G., Nikiforov A.K., Kireev M.N., Kochkalova N.N., Generalov S.V., Selezneva A.G., Savitskaya L.V., Ivanov Yu.V. Determination of the Molecular Parameters of Heterologous Anti-Rabies Immunoglobulin Using Gel-Filtration	
Аленкина Т.В., Красичков Г.Г., Фомина Г.М., Лобовикова О.А., Миронова Н.П., Пуденкова О.С., Никифоров А.К., Саяпина Л.В., Малахаева А.Н. Сравнительная характеристика сывороток диагностических чумных антифаговых, полученных от разных видов продуцентов	58	Alenkina T.V., Krasichkov G.G., Fomina G.M., Lobovikova O.A., Mironova N.P., Pudenkova O.S., Nikiforov A.K., Sayapina L.V., Malakhaeva A.N. Comparative Analysis of Diagnostic Plague Antiphage Sera Received from Producers of Different Types	
Янов Д.С., Клинова С.Н., МIRONIN А.В., Живов И.В., Погорельский И.П., Дробков В.И., Федоров Ю.Н., Кибирев Я.А. Разработка методического подхода к созданию рекомбинантного штамма-продуцента субъединицы В холерного токсина	62	Yanov D.S., Klinova S.N., Mironin A.V., Zhivov I.V., Pogorelsky I.P., Drobkov V.I., Feodorov Yu.N., Kibirev Ya.A. Development of Methodic Approach to Construction of Recombinant Strain, Producer of the Cholera Toxin B Subunit	
Краткие сообщения		Brief Communications	
Базанова Л.П., Воронова Г.А., Косилко С.А. Взаимоотношения чумного микроба и блох из географически разобщенных популяций	66	Bazanova L.P., Voronova G. A., Kosilko S.A. Interrelations of Plague Microbe and Fleas from Geographically Separated Populations	
Сергеева И.В. Грипп А(H1N1) 2009 на территории Красноярска	69	Sergeeva I.V. A(H1N1) 2009 Flu in the Territory of Krasnoyarsk	
Информация		Information	
Резолюция X Межгосударственной научно-практической конференции «Актуальные проблемы предупреждения и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций на территории государств-участников Содружества Независимых Государств»	72	Resolution of the X Inter-State Scientific and Practical Conference "Actual Problems of Prevention and Liquidation of Emergency Situations Consequences in the Territory of CIS Member States"	
Протокол X заседания Координационного совета по проблемам санитарной охраны территорий государств-участников Содружества Независимых Государств от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней	75	Protocol from the X Session of the Coordination Council on the Problems of Sanitary Protection of the Territory of CIS Member States to prevent import and spread of particularly dangerous infectious diseases	
Резолюция Межведомственного совещания по проблемам санитарно-эпидемиологической охраны территории Российской Федерации	77	Resolution of the Interdepartmental Meeting on the problems of sanitary and epidemiological protection of the Russian Federation territory	
Памяти коллеги		Revering the Memory of the Colleague	
Памяти Васильева Никифора Трофимовича (1947–2010)	82	Of blessed memory of Vasil'ev Nikifor Trofimovich (1947–2010)	
Юбилеи	84	Anniversaries	
<i>Правила для авторов</i>	85	<i>Instruction to Authors</i>	

Г.Г.Онищенко¹, А.Н.Куличенко², О.В.Малецкая², Г.М.Грижебовский², В.П.Клиндухов³

ОБЕСПЕЧЕНИЕ ЗАЩИТЫ ОТ БИОЛОГИЧЕСКИХ УГРОЗ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ОЛИМПИЙСКИХ ИГР

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

²ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»;

³Управление Роспотребнадзора по Краснодарскому краю, Краснодар

Представлен анализ комплексных мер по обеспечению эпидемиологического благополучия в период подготовки и проведения Олимпийских игр за рубежом. С учетом накопленного опыта предложены основные направления противозидемической работы при подготовке к зимним Олимпийским играм 2014 г. Отмечена необходимость дополнения традиционного эпидемиологического надзора за инфекциями синдромным надзором, а также использованием ГИС-технологий, автоматизированных систем контроля атмосферного воздуха и других новых технологий обеспечения биологической безопасности.

Ключевые слова: Олимпийские игры, биологические угрозы, эпидемиологический надзор, биологическая безопасность, синдромный надзор.

Олимпийские игры ввиду широты размаха и исключительного общественного интереса требуют чрезвычайного уровня готовности системы санитарно-эпидемиологического надзора принимающей страны по обеспечению эпидемиологической безопасности участников этих массовых мероприятий, гостей и местного населения.

Практика организации Олимпиад и других массовых мероприятий свидетельствует об отсутствии серьезных эпидемиологических осложнений во время их проведения.

В доступной литературе сообщается о вспышках гриппа и гастроэнтеритов во время Международного дня молодежи в Австралии в 2008 г. [3], о заносах гриппа А (H1N1) участниками Универсиады и гостями музыкального фестиваля в Сербии в 2009 г. и местной передачи этой же разновидности гриппа участниками мероприятий [6], о вспышке кори среди спортсменов и местного населения во время специальных Олимпийских игр в США в 1991 г. [5], о вспышках норовирусной инфекции во время чемпионата мира по футболу среди персонала и зарубежных журналистов в международном медиацентре в Мюнхене (Германия) в 2006 г. [12], в молодежном лагере в штате Вирджиния (США) в 2005 г. [2] и среди местного населения во время зимних Олимпийских игр в Ванкувере (Канада) в 2010 г. [10]. Сообщается о вспышках легионеллеза на круизных лайнерах в портах, примыкающих к местам проведения массовых мероприятий [11]. Следует отметить, что указанные события не оказывали существенного влияния на ход проведения спортивных мероприятий в силу заблаговременной оценки рисков эпидемиологической опасности и планирования мер по минимизации их последствий.

Как следует из опыта организации и проведения Олимпиад и других массовых мероприятий (Универсиады, музыкальные фестивали, Кубки Мира

и Европы по футболу и т.п.), обобщенных в недавнем руководстве Всемирной организации здравоохранения (Communicable Disease Alert and Response for Mass Gatherings: Key Considerations) [3], обеспечение защиты от биологических угроз при подготовке и проведении названных мероприятий включает три звена:

- оценка эпидемиологических рисков,
- осуществление полноценной системы эпидемиологического надзора,
- своевременное и адекватное реагирование при возникновении эпидемиологических осложнений.

Результаты анализа эпидемиологических рисков являются основанием для планирования мер биологической безопасности во время проведения Олимпиад, в том числе систем надзора и реагирования на чрезвычайные события.

Как показывает зарубежный опыт, подготовка к Олимпиадам начинается за несколько лет до их проведения. Существенная роль, при этом, отводится эпидемиологическому надзору как системе, направленной, в конечном итоге, на обеспечение биологической безопасности населения. Во время этой фазы надзора с использованием рутинных методов оцениваются будущие эпидемиологические риски, разрабатываются и реализуются управленческие решения по стабилизации эпидемиологической обстановки на территории проведения Олимпийских игр.

Вторая фаза – это усиленный эпидемиологический надзор, начинающийся, как правило, за один месяц до проведения Олимпиады.

Третья фаза эпидемиологического надзора продолжается определенное время после Олимпиады. При этом используются рутинные методы с целью выявления заболеваний с длительным инкубационным периодом, которые, возможно, связаны с состоявшимся событием (туберкулез, ВИЧ-инфекция).

Всемирной организацией здравоохранения

(ВОЗ) рекомендуется традиционный эпидемиологический надзор за инфекциями дополнить синдромным надзором с целью более раннего выявления заболеваний и оперативного проведения необходимых мероприятий [1]. В упомянутом выше руководстве ВОЗ рекомендованы 10 синдромов, надзор в отношении которых необходим во время проведения мероприятий с большим скоплением местного и прилегающего населения, в том числе и Олимпиад. Это синдромы: гастроэнтерит с кровью, гастроэнтерит с водянистыми выделениями, острая лихорадка с сыпью, менингит/энцефалит, дыхательная недостаточность без лихорадки, острая респираторная инфекция с лихорадкой, состояние в связи с высокой температурой внешней среды, острый вирусный гепатит, ботулиноподобный синдром, неожиданная смерть. Приводятся ключевые признаки каждого синдрома и нозологические формы болезней, которые объединяет каждый конкретный синдром. При этом перечень нозологических форм включает не только такие инфекции, как корь, грипп, сальмонеллез, норовирусная инфекция и т.п., но и нозологические формы, этиологические агенты которых в списках CDC отнесены к категории А возбудителей особо опасных инфекций, которые могут использоваться в актах биотерроризма (сибирская язва, ботулизм, чума и натуральная оспа).

При преднамеренном применении патогенных биологических агентов в условиях высокой плотности населения потребуются значительные силы для работы в очагах инфекции (эпидемиологическое расследование и т.п.). При этом для доказательного заключения о намеренном использовании патогенного биологического агента потребуются анализ синдромных проявлений болезненных состояний, а также индикаторов названного события, к числу которых относятся:

- групповая заболеваемость в виде случаев, не имеющих между собой взаимной связи;
- факты заболеваний инфекциями, не являющимися эндемичными для данной территории и сопровождающимися высокой летальностью;
- факты заболеваний в необычный для инфекции сезон года, при этом отмечается нетипичная возрастная структура заболевших;
- случаи выделения штаммов (этиологических агентов) с атипичными признаками или с множественной лекарственной устойчивостью;
- необычный рост числа обращений за медицинской помощью с признаками лихорадочного, респираторного, неврологического, гастроэнтерологического и других состояний, а также резкое возрастание числа обращений в аптечную сеть для закупки тех или других лекарственных препаратов и т.д.

Известно, что синдромный подход и целенаправленный интенсивный ежедневный мониторинг объектов окружающей среды на микробную флору (воздух, вода, пищевые продукты), интегрированные в традиционные системы эпидемиологического

надзора, использовались уже в 2002 г. во время зимних Олимпийских игр в Солт Лейк Сити и в 2006 г. [7] в Турине [4], а также во время проведения летних Олимпиад в Афинах в 2004 г. [8] и в Пекине в 2008 г. [9]. Можно отметить, что в Греции впервые в истории Олимпийских игр была использована программа контроля внешней среды, сочетающая в себе анализ результатов лабораторных исследований ее объектов и регулярные, а в ряде случаев и по показаниям, инспекционные проверки предприятий пищевой промышленности, общественного питания, систем коммунального жизнеобеспечения населения и т.д. по 17 гигиенически значимым показателям с принятием жестких мер административного воздействия в случае необходимости. Разработанная высокодетализированная форма электронного отчета с использованием ГИС-технологий позволила осуществлять быстрый обмен данными и материалами в любое время суток для обеспечения эпидемиологического надзора в режиме реального времени, автоматически выявлять недостатки в микробиологических исследованиях, нарушения схемы и качества проводимых ответных мер при обострении эпидемиологической ситуации. В Ванкувере для исследования проб воздуха с фильтров, а также твердых и жидких проб функционировала мобильная лаборатория для детекции биологических агентов (бактерии, вирусы, а также рикетии) с использованием ПЦР в режиме реального времени.

Специальная аппаратура обнаружения и индикации ПБА представляет собой либо полный, либо упрощенный вариант системы биологической разведки BASIS (Biological Aerosol Sentry and Information System).

Используя систему BASIS, возможно проводить индикацию пяти ПБА (возбудителей чумы, оспы, сибирской язвы, туляремии, а также ботулинического токсина). По оценкам американских специалистов система BASIS позволяет обеспечить реагирование на применение биологического оружия в пределах 8–10 ч.

Впервые система BASIS была использована в рамках обеспечения эпидемической безопасности зимних Олимпийских игр 2002 г. в Солт-Лэйк-Сити. На открытом воздухе и внутри олимпийских объектов было развернуто 16 постов отбора проб, и функционировала одна мобильная лаборатория.

С февраля 2004 г. на ряде станций контроля атмосферного воздуха устанавливается аппаратура, предназначенная для автономного функционирования – Autonomous Pathogen Detection System (APDS). Индикация ПБА в атмосферном воздухе осуществляется APDS с помощью твердофазного иммуноанализа с регистрацией результатов проточной цитометрией, а также ПЦР, проводимой в случае положительной пробы иммуноанализа. Система APDS способна длительное время (до 8 сут) работать в автономном режиме без замены картриджа с расходными реагентами. Периодичность забора проб биоаэрозоля и выполнение иммуноанализа составляют 30–60 мин.

Кроме того, представляется целесообразным интегрирование в систему надзора во время проведения Олимпиады ГИС-технологий с целью анализа актуальной информации об обстановке в режиме реального времени и поддержки принятия управленческих решений по минимизации эпидемиологических последствий того или иного события.

Применительно к зимним Олимпийским играм 2014 г. оценка рисков, как представляется, необходима по следующим основным направлениям:

1. Заблаговременная четкая идентификация местных заразных болезней и анализ возможности осложнения эпидемиологической обстановки по ним как в период строительства олимпийских объектов, так и во время проведения Олимпиады.

Сравнительный анализ обстановки по некоторым нозологическим формам инфекционной патологии свидетельствует о том, что заболеваемость ими в Сочи в 2008–2009 гг. в ряде случаев превышала средние показатели по Российской Федерации и по Краснодарскому краю. Так, отмечено резкое превышение показателей в отношении вирусного гепатита А, острых кишечных инфекций установленной и неустановленной этиологии. Достаточно высокой является заболеваемость инфекциями, передающимися половым путем.

С 2004 г. в Сочи резко обострилась эпизоотическая обстановка по бешенству. В этом же году зарегистрированы два случая бешенства среди жителей Адлерского района. С тех пор ежегодно наблюдаются заболевания различных животных (от 3 до 101 случая), а количество укушенных людей дикими и домашними животными достигает 600 и более в пересчете на 100 тыс. населения и в два раза превышает аналогичный показатель по Краснодарскому краю.

К изложенному следует добавить, что территория, где будут проводиться Олимпийские игры, является неблагоприятной по ряду других природно-очаговых инфекций (лептоспироз, кишечный иерсиниоз, псевдотуберкулез, клещевой боррелиоз), и в зимнее время года можно ожидать осложнений по ряду из них, в частности, по кишечному иерсиниозу и псевдотуберкулезу. Осложнения по этим и другим названным выше инфекциям, даже в подготовительный к Олимпиаде период, могут иметь широкий международный общественный резонанс.

2. Концентрация больших масс людей в ходе проведения Олимпиады, несомненно, чревата опасностью активизации механизмов передачи инфекционных болезней, в первую очередь, с фекально-оральным и аспирационным механизмами передачи. Это связано с увеличением нагрузки на коммунальные системы жизнеобеспечения населения (водопотребление, водоочистка, канализация), с возможными авариями на них, увеличением объема продукции пищевой промышленности (увеличение производства и завоза продуктов) и ростом нагрузки на сети общественного питания, увеличением числа объектов массового пребывания людей, в том числе гости-

ничных комплексов и приспособленных под них круизных лайнеров и т.д.

3. Нельзя не учитывать возможность заноса участниками Олимпиады и зарубежными гостями ряда инфекционных болезней, в том числе и тех, мероприятия в отношении которых регламентируются Международными медико-санитарными правилами (2005 г.) и которые могут трансформироваться в чрезвычайные ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения, в том числе и международного значения.

4. Существенное место в многочисленных литературных источниках в последние годы занимает проблема биологического терроризма во время проведения массовых мероприятий, в том числе и Олимпиад. Риск таких актов ни в коей мере нельзя недооценивать и во время зимней Олимпиады 2014 г. Следует учитывать, что осложнение эпидемиологической обстановки, связанное с актом биотерроризма, потребует проведения широкого комплекса дорогостоящих противоэпидемических мер и вызовет широкий международный резонанс.

Что касается вопросов готовности к реагированию на чрезвычайные эпидемические ситуации в ходе проведения Олимпиады 2014 г., то следует, прежде всего, упомянуть, что во исполнение Распоряжения Правительства Российской Федерации от 21 мая 2007 г. № 642-р были выделены средства и проведена модернизация специализированных противоэпидемических бригад (СПЭБ) пяти научно-исследовательских противочумных институтов. Эти бригады сегодня представляют собой оснащенные современным оборудованием мобильные лабораторные модули на базе автошасси, способные к работе в автономных условиях. Представляется целесообразным привлечение СПЭБ противочумных институтов в период проведения Олимпийских игр.

Кроме того, необходимы:

- разработка нормативно-методической базы, регламентирующей весь комплекс противоэпидемических мероприятий в период проведения Олимпийских игр 2014 г. в г. Сочи;

- создание (внедрение в практику) систем быстрой и эффективной детекции и анализа патогенных биологических агентов из биологического материала и из объектов внешней среды (в т.ч. в рамках ФЦП) и дополнительного оснащения ими лабораторий г. Сочи и СПЭБ;

- создание компьютерной аналитической системы надзора в режиме реального времени за заболеваемостью и информацией микробиологического характера (в т.ч. с привлечением ГИС);

- формирование госпитальной базы для подопытных больных и для больных особо опасными инфекциями;

- проведение тренировочных учений с вводом условного больного и других форм повышения готовности медицинского персонала;

- внедрение в практику работы лабораторий ин-

фекционных стационаров методов исследования на возбудителей острых желудочно-кишечных заболеваний вирусной этиологии (норовирусы, астровирусы, ротавирусы, энтеровирусы);

- создание резерва современных диагностических препаратов, дезинфицирующих средств, расходных материалов, средств индивидуальной защиты, а также лечебных препаратов.

Глобальные угрозы, связанные с инфекционными болезнями и терроризмом, делают задачу готовности системы здравоохранения необыкновенно сложной для любого государства. Решение ее требует развития и внедрения в практику новых систем обеспечения биологической безопасности, которые в равной мере значимы как для готовящегося события, так и для обеспечения безопасности России в целом.

Благодарим за обсуждение материала Т.В.Шевыреву, Г.Д.Брюханову, Ю.В.Юничеву, В.И.Малая.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Buehler J.W., Hopkins R.S., Overhage J.M. et al.* Framework for evaluating public health surveillance systems for early detection of outbreaks. *Morb. Mort. Wkly Rep.* 2004; 53(RR05):1–11.
2. *Coletta M., Dewey L., White-Russel M. et al.* Surveillance for early detection of disease outbreaks at an outdoor mass gathering – Virginia, 2005. *Morb. Mort. Wkly Rep.* 2006; 55(3):71–4.
3. Communicable diseases alert and response for mass gatherings: key consideration. Geneva, WHO; 2009. 130 p.
4. *Demicheli V., Raso R., Tiberti D. et al.* Results from investigated surveillance system from the 2006 Winter Olympic and Paralympic Games in Italy. *Eurosurveillance.* 2006; 11(33).
5. *Ehresman K.R.* An outbreak of measles at an international sporting event with airborne transmission in a domed stadium. *J. Infect. Dis.* 1995; 171(5):679–83.
6. *Loncarevic G., Paine L., Kon P. et al.* Public health preparedness for two mass gatherings events in the context of pandemic influenza (H₁N₁) 2009 – Serbia, July 2009. *Eurosurveillance.* 2009; 14(31).
7. *Mundorff M.B., Gesteland P.H., Rolst R.T.* Syndromic surveillance using chief complaints from urgent-care facilities during the Salt Lake 2002 Olympic Winter Games. *Morb. Mort. Wkly Rep.* 2004; 53(17):254.
8. Olympic security. U.S. support to Athens Games provide lessons to future Olympics. Available from: <http://www.gao.gov/cgi-bin/getrpt?GAO-05-547>.
9. *Payne L., Arias P., Kreid L.P. et al.* Preparedness activities ahead of the Beijing 2008 Olympic Games – enhancing EU epidemic

intelligence. *Eurosurveillance.* 2008; 13(32).

10. Progress report. 21st Winter Olympic Games 2010 in Vancouver, British Columbia, Canada. Available from: http://www.vch.ca/your_2010_winter_games/2010_health_watch_2010_health_watch.

11. *Rowbotham T.J.* Legionellosis associated with ships: 1977–1997. *Commun. Dis. Public Health.* 1998; 1(3):146–51.

12. *Schenkel K., Williams C., Eckmanns T. et al.* Enhanced surveillance of infectious diseases: the 2006 FIFA World Cup experience, Germany. *Eurosurveillance.* 2006; 11(12).

G.G.Onischenko, A.N.Kulichenko, O.V.Maletskaia,
G.M.Grizhebovsky, V.P.Klindukhov

Ensuring of Protection from Biological Threats During Olympic Games

Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow; Stavropol Research Anti-Plague Institute; Department of the Rospotrebnadzor for the Krasnodar Territory, Krasnodar

Analysis of complex measures to ensure epidemiological safety during the period of preparation and carrying out the Olympic Games abroad is presented. The main directions of the anti-epidemic work during preparation for the 2014 Winter Olympic Games are suggested based upon available experience. It has been noted that syndromic surveillance, GIS technologies, automated stations for control of atmospheric air and other new technologies ensuring biological safety should be added to traditional epidemiological surveillance of infections.

Key words: Olympic Games, biological threats, epidemiological surveillance, biological safety, syndromic surveillance.

Об авторах:

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

Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Грижебовский Г.М. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Клиндухов В.П. Управление Роспотребнадзора по Краснодарскому краю. Краснодар.

Authors:

Onischenko G.G. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare. Moscow.

Kulichenko A.N., Maletskaia O.V., Grizhebovsky G.M. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 355035, Stavropol, Sovetskaya St., 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Klindukhov V.P. Department of the Rospotrebnadzor for the Krasnodar Territory. Krasnodar.

Поступила 28.10.10.

Т.В.Князева, В.Н.Чекашов, А.М.Поршаков, Т.В.Мокроусова, А.Н.Матросов, М.М.Шилов,
С.А.Яковлев, А.А.Кузнецов, С.И.Толоконникова, И.Н.Шарова, Т.Ю.Красовская

**РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ЧИСЛЕННОСТЬ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ И БЛОХ – ПЕРЕНОСЧИКОВ
ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ В ПОЛУПУСТЫННОЙ ЗОНЕ САРАТОВСКОГО ЗАВОЛЖЬЯ**

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

В полупустынной зоне Саратовской области по многолетним наблюдениям обитают 6 видов иксодовых клещей. На мелких млекопитающих околотовных биотопов зарегистрировано 9 видов блох. Значение как переносчики возбудителей опасных инфекционных болезней в настоящее время могут иметь доминирующие виды эктопаразитов – 2 вида иксодовых клещей и 3 вида блох. Дальнейший эпизоотологический мониторинг связан с контролем численности обычных для этой территории видов эктопаразитов, а также с выявлением новых видов, имеющих предпосылки к расселению на данной территории.

Ключевые слова: иксодовые клещи, блохи, опасные инфекционные болезни.

Актуальность изучения территориального и биотопического распределения иксодовых клещей (Ixodidae) и блох (Siphonaptera), количественных характеристик их популяций, связей с прокормителями обусловлена участием этих групп кровососущих членистоногих в переносе и хранении возбудителей ряда инфекционных болезней. Распространению возбудителей может способствовать отмечаемое в настоящее время расширение ареалов некоторых видов эктопаразитов, формирование их стойких популяций на новых территориях.

Большой интерес представляют южные районы левобережья Саратовской области, на территорию которых происходит распространение возбудителей вирусных инфекций и где уже выявлена циркуляция некоторых из них: Крымской геморрагической лихорадки, лихорадок Западного Нила, Синдбис, Батаи, Инко, Тягиня [1]. Эти районы энзоотичны также по туляремии [8]. К началу XXI века в южных районах Заволжья произошли изменения в распространении и доминировании отдельных видов мелких млекопитающих [4], их эктопаразитов – блох [3], расширился ареал иксодовых клещей [5]. Мониторинг вирусных инфекций в течение ряда лет на территории Александрово-Гайского района позволяет оценить современное состояние и эпизоотологическое значение популяций кровососущих членистоногих – иксодовых клещей и блох на юге области в зоне типичной полупустыни. Иксодовых клещей собирали с крупных сельскохозяйственных животных, с поверхности почвы и растительности. На наличие эктопаразитов (клещей и блох) осматривали добытых диких млекопитающих и птиц. Наблюдения проводили преимущественно весной и осенью периодически, начиная с 2001 г., и ежегодно в период 2006–2009 гг. Сборы составили 6217 иксодовых клещей и 1026 блох.

Иксодовые клещи. Иксодовых клещей собирали в наиболее благоприятных для их обитания местах. На данной территории это заросли бурьянистой и ку-

старниковой растительности, приуроченные к поймам рек Большой и Малый Узени, гидросистемам, а также затопляемым пониженным участкам рельефа. Здесь осуществляется выпас скота и наблюдаются повышенные плотности мелких млекопитающих – прокормителей преимагинальных фаз развития иксодид. На таких участках постоянно регистрировали 4 вида иксодовых клещей: *Hyalomma scupense* Schulze, *Dermacentor marginatus* Sulzer, *Dermacentor reticulatus* Fabr и *Rhipicephalus rossicus* Jak et K. Jak. Индексы доминирования (ИД) их составили соответственно 16,0, 77,9, 4,8 и 1,3 %.

Основная масса клещей собрана в природных биотопах – 5096 экз. на 155 фл./км. По результатам многолетних учетов зараженность клещами пастбищ на данной территории сохраняется на высоком уровне. Среднемноголетний индекс обилия (ИО) составил 33 экз. на 1 фл./км с колебаниями по годам от 22 до 58 экземпляров (табл. 1). Из собранных трех видов клещей (*D. marginatus*, *D. reticulatus*, *R. rossicus*) во влажных биотопах полупустынной зоны наиболее многочисленными являются клещи *D. marginatus*. Доля данного вида в сборах составила 92,7 %, что выше аналогичных показателей в других ландшафтных зонах. Связано это с тем, что распространение и численность остальных видов иксодовых клещей в большей степени ограничены абиотическими условиями обитания в полупустыне. На втором месте стоит *D. reticulatus*. Если в середине прошлого века *D. marginatus* был обычным и многочисленным для полупустыни видом, то *D. reticulatus* здесь отсутствовал, являясь на остальной территории области спорадическим видом [2]. Например, в Заволжье его регистрировали только в Краснопартизанском, Краснокутском и Энгельском районах. В настоящее время на участках типичной степи Заволжья (Пугачевский район) индекс доминирования этого вида уже сопоставим с таковым *D. marginatus*. Проник *D. reticulatus* и вглубь полупустынной зоны, но здесь его индексы

Таблица 1

Результаты учета численности иксодовых клещей в природных биотопах полупустынной зоны Саратовской области (2001–2009 гг.)

Период учета	Пройдено фл./км	Собрано клещей	ИД, %			Общий ИО (экз. на 1 фл./км)
			<i>D. marginatus</i>	<i>D. reticulatus</i>	<i>R. rossicus</i>	
Апрель	136	4466	93,4	6,6	–	32,8
Май	19	630	87,9	0,4	11,7	33,2
Всего	155	5096	92,7	5,8	1,5	32,9

доминирования и обилия более чем в 10 раз меньше, чем у предыдущего вида. Самым малочисленным в сборах оказался *R. rossicus*, хотя на его присутствие в полупустынной зоне указывала В.Ф.Давидович [2], а широкое распространение в современный период отмечено М.А.Турцевой [5]. Обитание клещей *R. rossicus* в полупустынной зоне ограничено пойменными участками. В среднем эти клещи составили 1,5 % от общего числа пастбищных видов. Следует заметить, что сезон максимального паразитирования имаго, в отличие от других видов, сдвинут к маю–июню. В этот период доля клещей среди прочих достигала 10 %, а индекс обилия равнялся 4 экземплярам на 1 фл./км. Повышение температуры и снижение влажности воздуха летом ограничивают существование клещей в природных биотопах, и в это время они чаще встречаются на животных [6]. Истинную долю участия этого вида в популяциях паразитов дают сборы с мелких млекопитающих. Нельзя обойти вниманием находки очень редкого для полупустынной зоны лесного вида *Ixodes ricinus* Linn. Ранее [2], его встречали только в лесостепной зоне правобережья. В настоящее время он уже стал обычным на северо-востоке Заволжья. Здесь (Пугачевский р-н) доля этих клещей увеличилась от единичных находок до 5 % к весне 2009 г. В полупустынной зоне *I. ricinus* приурочены к гидрофильным лесным участкам. Единичные экземпляры их были собраны нами только в 2003 г. в реликтовом лесу в окрестностях г. Александров-Гай. Одновременно этот вид был зарегистрирован М.А.Турцевой [5].

В качестве прокормителей личинок и нимф иксодид была отмечена малая лесная мышь, нимф – общественная полевка. Незначительное число выявленных паразитарных связей объясняется малой выборкой в период пика численности преимагинальных стадий развития (лето – начало осени).

Явно выраженная гидрофильность рассматриваемых видов членистоногих ограничивает их распро-

странение по водоразделам. В сухой степи, вдали от мест массового выпаса скота, нами были собраны на «флаг» лишь единичные экземпляры *D. marginatus*. На таких целинных участках обычным обитателем является клещ *Rhipicephalus schulzei* Ol, который в своем жизненном цикле тесно связан с малым сусликом. По нашим наблюдениям, в отдельные годы индекс обилия этих клещей на сусликах составлял 1,3, а в их гнездах – 0,3 (лето 2001 г.), что является высоким показателем. Наряду с имаго, на зверьках в значительном числе встречались преимагинальные стадии развития.

Сборы клещей с крупных домашних животных составили 1121 экз. Отмечено паразитирование имаго 3 видов: *Hyalomma scupense* Schulze, *D. marginatus* и *R. rossicus* (табл. 2). Их доля в общем сборе равнялась соответственно 89,1, 10,4 и 0,5 %. Неполные сборы клещей с одного животного за период обследования составили в среднем 8 экз. с колебаниями по годам от 4 до 50 экз. В хозяйствах, где проводили акарицидные мероприятия, скот был практически свободен от клещей. В конце марта – апреле на животных доминируют клещи *H. scupense* – 97,5 %. Начиная с середины мая, преобладают имаго *D. marginatus*, встречаются также *R. rossicus*.

Блохи. В отличие от клещей, фауна блох полупустынной зоны после обобщающих публикаций В.Ф.Давидович [2], относящихся к 60–70-м годам прошлого века, не пересматривалась. Немаловажную роль в формировании современной фауны эктопаразитов сыграло изменение населения млекопитающих в конце XX – начале XXI вв. под воздействием абиотических и биотических факторов [4]: расселение и увеличение численности домового мыши, сокращение обилия пустынных видов, смена доминирующих видов животных и др. Млекопитающие являются прокормителями этой группы членистоногих и создают в своих норах условия для развития отдельных видов. Нами проанализированы сборы блох с 1138 мелких

Таблица 2

Показатели численности иксодовых клещей на крупных домашних животных в полупустынной зоне Саратовской области (2001–2009 гг.)

Период учета	Осмотрено животных	Собрано клещей	ИД, %			Общий ИО
			<i>H. scupense</i>	<i>D. marginatus</i>	<i>R. rossicus</i>	
Апрель	89	1021	97,5	2,5	–	11,5
Май	32	3	100,0	–	–	0,1
Июнь	18	97	–	93,8	6,2	5,4
Всего	139	1121	89,1	10,4	0,5	8,1

Численность массовых видов блох мелких млекопитающих интразональных ландшафтов полупустынной зоны Саратовской области (1998–2009 гг.)

Блохи	ИД, %	ИО на различных животных						
		ЛМ	ОбП	ОщП	ДМ	З	ВП	О
<i>A. rossica</i>	36,4	0,1	1,3	1,7	0	0,4	0	0
<i>Ns. mokrzecky</i>	29,8	0,3	ед.	ед.	0,3	ед.	0	0
<i>Ct. wagneri</i>	16,5	0,2	0,6	0,1	0,01	0,5	5,0	ед.
<i>Ct. secundus</i>	16,0	0	ед.	1,1	ед.	ед.	0	0
Прочие	1,3	ед.	ед.	ед.	ед.	0	0	0
Всего	100,0	0,6	2,0	2,9	0,4	1,0	5,0	0,04

Примечание: ЛМ – малая лесная мышь; ОбП – обыкновенная полевка; ОщП – общественная полевка; ДМ – домовая мышь; З – землеройка; ВП – водяная полевка; О – ондатра; ед. – единичные экземпляры.

млекопитающих. Из них 49,4 % составляла домовая мышь, 25,7 % – малая лесная мышь (хотя в целом по Заволжью этот вид преобладал), 12,2 % – общественная полевка и 7,1 % – обыкновенная полевка. Прочих видов (степная мышовка, водяная полевка, ондатра) было менее 3%.

Фауна блох мелких млекопитающих интразональных ландшафтов полупустынной зоны представлена 9 видами, в то время как во всем Заволжье – 12. Среди собранных блох 98,7 % составляли эктопаразиты 4 видов: *Amphipsylla rossica* Wagn. 1912, *Nosopsyllus mokrzecky* Wagn. 1916, *Ctenophthalmus wagneri* Tifl. 1927, *Ct. secundus* Wagn. 1916 (табл. 3). Ретроспективный анализ видового состава и обилия эктопаразитов показывает, что на грызунах, по-прежнему, многочисленной является блоха *A. rossica*, которая достигает в сборах 40 %. В качестве прокормителя наряду с обыкновенной полевкой, считающейся основным хозяином, на данной территории зарегистрирована также общественная полевка, при этом индекс доминирования (в процентах по обилию) этой блохи на полевках составил 37,1 и 48,5 % соответственно. Расселение и увеличение численности домовой мыши в полупустынной зоне привело к распространению здесь ее специфического паразита – *Ns. mokrzecky* (ИД – 29,8 %), не отмечавшегося ранее. Популяция блох в равном числе распределялась между домовой и лесной мышами (индекс обилия на каждом из видов грызунов – 0,3). Блох *Ct. secundus* В.Ф.Давидович [2] относил к новому для Саратовской области виду и указывала на единичные находки в окрестностях г. Александров-Гай. В наших сборах с 1998 по 2007 гг. эта блоха также встречалась редко. Рост численности общественной полевки, начавшийся осенью 2007 г., привел к быстрому и значительному увеличению плотности популяции ее паразита – *Ct. secundus*. В среднем доля этой блохи в сборах составила 16,0 %. Основным прокормителем явилась общественная полевка, индекс обилия *Ct. secundus* на которой равнялся 1,1. К настоящему времени заметно возросла доля блох *Ct. wagneri* – с 6,0 % [2] до 16,5 % в наших сборах. Только этот вид встречался на всех отловленных зверьках. Максимальный индекс обилия отмечен на специфическом прокормителе – водяной полевке (табл. 3).

Из других видов блох были отловлены в единичных экземплярах на ограниченном круге прокормителей: *Ctenophthalmus breviatus* Wagn. et Ioff 1926 – на малой лесной мыши, *Ct. orientalis* Wagn. 1898 – на обыкновенной полевке, *Nosopsyllus consimilis* Wagn. 1898 – на малой лесной и домовой мышах, *Leptopsylla taschenbergi* Wagn. 1898 – на домовой мыши, *Citellophilus tesquorum* Ioff 1936 – на общественной полевке. При этом первые 4 вида ранее встречались в подзоне сухих степей и не были указаны для полупустынной зоны. В то же время в наших сборах отсутствовали блохи, составлявшие ранее доминирующую группу: *Leptopsylla segnis* Schonch. 1811 и *Amphipsylla prima* Wagn. 1929. По материалам В.Ф.Давидович [2], этих блох обнаруживали преимущественно на степной пеструшке, которая сейчас стала редким видом [4] и отсутствовала в наших уловах. Общий индекс обилия блох на грызунах, по данным многолетних сборов, составил 0,9. На полевках индекс обилия был в 5 раз выше (2,6), чем на мышах (0,5).

Таким образом, в околородных биотопах полупустынной зоны доминирующую группу блох составляют виды, имеющие значение в эпизоотологии туляремии: *A. rossica*, *Ct. wagneri* и получивший распространение в настоящее время *Ns. mokrzecky*. От блох в Саратовской области выделяли 2,9 % культур туляремии [8].

На предмет зараженности эктопаразитами были осмотрены птицы околородного и антропогенного комплексов. Установлено их участие в транспортировке блох. Так, на чайке было найдено 2 самца блохи *Monopsyllus sciurorum* Schr. 1781. В пределах Саратовской области этот вид обитает в правобережных районах и является специфическим паразитом лесной сони. Также на птицах были обнаружены блохи грызунов, распространенные в данной зоне: с домового воробья снята блоха тушканчика *Mesopsylla hebes* J. et R. 1915, с грача – паразит малого суслика *Ct. breviatus*.

Таким образом, эпизоотологический статус полупустынной зоны Саратовской области в отношении опасных инфекционных болезней определяют многочисленные и постоянно встречающиеся 2 вида

иксодовых клещей – *D. marginatus* и *H. scupense*, а также 3 массовых вида блох – *A. rossica*, *Ns. mokrzecyki*, *Ct. wagneri*. Укоренению вирусных инфекций на территории этой зоны могут способствовать: возрастание численности широко распространенных, но пока малочисленных видов клещей *R. rossicus* и *D. reticulatus*, а также редко встречающегося – *I. ricinus*. Последний участвует в циркуляции боррелий на северо-востоке Заволжья [7]. Кроме того, не исключено появление клещей *Hyalomma marginatum* Koch., зарегистрированных на сопредельных территориях. Существующий комплекс наземных кровососущих членистоногих на территории полупустынной зоны Саратовской области может иметь значение при разных инфекциях как выявленных ранее, так и вновь возникающих. Дальнейший эпизоотологический мониторинг связан с контролем численности обычных для данной территории видов членистоногих и наблюдением за ареалами видов, имеющих тенденцию к расширению.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Билько Е.А., Шербакова С.А., Красовская Т.Ю., Кутырев И.В., Шарова И.Н., Найденова Е.В. Результаты лабораторных исследований по выявлению антигенов арбовирусов из полевого материала, собранного в Александрово-Гайском районе в 2006–2007 гг. В кн.: Международные медико-санитарные правила и реализация глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями в государствах-участниках СНГ: Матер. VIII межгос. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ. Саратов; 2007. С. 20–2.
2. Давидович В.Ф. О фауне блох мелких млекопитающих Саратовской области. В кн.: Труды врачей дорожной клинической больницы Приволжской ЖД. Саратов; 1967. С. 41–3.
3. Князева Т.В., Мокроусова Т.В., Толоконникова С.И., Тарасов М.А., Чекашов В.Н., Шилов М.М. Новые данные о видовом составе блох (Siphonaptera) мелких млекопитающих Саратовской области. В кн.: Матер. I Всерос. совещ. по кровососущим насекомым. СПб; 2006. С. 96–9.
4. Опарин М.Л., Опарина О.С., Матросов А.Н., Кузнецов А.А. Динамика фауны млекопитающих степей Волго-Уральского междуречья за последнее столетие. Поволжский экологический журнал. 2010; 1:71–85.

5. Турцева М.А. Спонтанные микробиоценозы некоторых видов иксодовых клещей (Ixodidae) и слепней (Tabanidae) [автореф. дис... канд. биол. наук]. Саратов; 2005. 19 с.
6. Турцева М.А., Котоманова В.Г., Сантылова О.А., Сапирова О.Л. Особенности экологии *Rhipicephalus rossicus* (Yakimov et Kohl-Yakimov, 1911) в Саратовской области. Энтомологические и паразитологические исследования в Поволжье. 2007; 6:99–102.
7. Турцева М.А., Кресова У.А., Матросов А.Н., Чекашов В.Н., Поришаков А.М., Яковлев С.А. и др. Новые данные о распространении иксодовых клещей и переносимых ими возбудителей природно-очаговых инфекций в Саратовской области. Пробл. особо опасных инф. 2009; 4(102):40–4.
8. Федорова З.П. Туляремия в Саратовской области [автореф. дис... канд. мед. наук]. Саратов; 1995. 26 с.

T.V.Knyazeva, V.N.Chekashov, A.M.Porshakov, T.V.Mokrousova, A.N.Matrosov, M.M.Shilov, S.A.Yakovlev, A.A.Kuznetsov, S.I.Tolokonnikova, I.N.Sharova, T.Yu.Krasovskaya

Distribution and Abundance of Ticks and Fleas, Infectious Diseases Vectors, in the Semi-Desert Zone of Saratov Trans-Volga Region

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Many-years observations demonstrate that six species of the ticks inhabit semi-desert zone of Saratov Trans-Volga Region. Nine flea species are registered at small mammals in the near-water biotopes. The dominating ectoparasite species can be of significance at present as dangerous infectious diseases vectors. They are 2 ticks species and 3 flea species. Epizootiologic monitoring to be carried out is associated with control of abundance of ectoparasite species conventional for this territory, and with detection of new species possessing condition to inhabit it.

Key words: ticks, fleas, dangerous infectious diseases

Об авторах:

Князева Т.В., Чекашов В.Н., Поришаков А.М., Мокроусова Т.В., Матросов А.Н., Шилов М.М., Яковлев С.А., Кузнецов А.А., Толоконникова С.И., Шарова И.Н., Красовская Т.Ю. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Knyazeva T.V., Chekashov V.N., Porshakov A.M., Mokrousova T.V., Matrosov A.N., Shilov M.M., Yakovlev S.A., Kuznetsov A.A., Tolokonnikova S.I., Sharova I.N., Krasovskaya T.Yu. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 28.09.2010.

В.М.Корзун¹, Е.В.Чипанин¹, Т.И.Иннокентьева¹, Е.П.Михайлов², А.В.Денисов²**ДИНАМИКА ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ЧИСЛЕННОСТИ МОНГОЛЬСКОЙ ПИЩУХИ В ГОРНО-АЛТАЙСКОМ ПРИРОДНОМ ОЧАГЕ ЧУМЫ**¹ФГУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»;²ФГУЗ «Алтайская противочумная станция», Горно-Алтайск

В Горно-Алтайском природном очаге чумы прослежена многолетняя динамика эпизоотической активности (1961–2009 гг.) и численности монгольской пищухи – основного носителя возбудителя (1980–2009 гг.). На фоне долговременного направленного роста численности монгольской пищухи наблюдаются ее циклические колебания с периодом около восьми лет. Закономерные изменения эпизоотической активности очага связаны с циклами численности. В фазе роста численности монгольской пищухи происходит возрастание эпизоотической активности. Пик последней, оцениваемой по количеству изолируемых культур, совпадает или приходится на следующий год после пика численности зверька, то есть на начало фазы спада. При депрессии и на начальном этапе роста численности пищухи активность очага минимальная.

Ключевые слова: Горно-Алтайский природный очаг чумы, эпизоотическая активность, монгольская пищуха, численность, динамика.

Выявление причин, определяющих динамику эпизоотического процесса в природных очагах, является одной из ключевых проблем эпизоотологии [17]. В различных природных очагах чумы выявлено наличие связи между многолетними изменениями интенсивности эпизоотий и уровнем численности основных носителей возбудителя [5, 20, 28, 29].

Сведения о положительной связи эпизоотической активности Горно-Алтайского природного очага чумы с численностью основного носителя приводились в отдельных работах [2, 10, 22, 25]. Они основывались только на качественном сопоставлении данных показателей, но количественного сравнительного анализа этих процессов не проводилось.

Горно-Алтайский природный очаг чумы, при его относительно небольшой площади, характеризуется сложной биоценотической структурой [4]. Переносчиками являются блохи нескольких видов, обеспечивающие круглогодичную циркуляцию возбудителя [15]. Основным носителем чумного микроба в очаге является монгольская пищуха (*Ochotona pallasi*) [3, 12, 24]. В меньшей степени в эпизоотии вовлекаются мелкие млекопитающие других видов: даурская пищуха (*Ochotona daurica*), длиннохвостый суслик (*Citellus undulatus*), плоскочерепная полевка (*Alticola strelzovi*). Монгольская пищуха на территории очага является массовым видом. На большей части Юго-Восточного Алтая ее поселения имеют сплошной, ленточный и местами мозаичный характер [7, 9, 12]. В современный период происходит расширение ареала монгольской пищухи на данной территории [7, 11]. Монгольская пищуха характеризуется высокой восприимчивостью и чувствительностью к циркулирующему в очаге чумному микробу [14], возбудитель чумы обнаруживается лишь в пределах ее ареала [24].

Цель работы – дать общую характеристику многолетней динамики эпизоотической активности Горно-Алтайского природного очага чумы, численности монгольской пищухи на его территории и оценить связь этих процессов.

ности монгольской пищухи на его территории и оценить связь этих процессов.

Материалы и методы

В работе использованы данные эпизоотологического обследования Горно-Алтайского природного очага чумы, проводимого Алтайской противочумной станцией с 1961 по 2009 год. За этот период на зараженность чумой исследовано бактериологически более 270 тыс. мелких млекопитающих, из них около 70 % составляли монгольские пищухи, более 1410 тыс. блох, изолировано 2223 культуры возбудителя. Эпизоотическая территория в настоящее время составляет около 290 тыс. га. Территория Горно-Алтайского очага разделена на 43 участка эпизоотологического обследования, площадь которых сильно различается. На 23 из них обнаружены проявления эпизоотий.

О ежегодной эпизоотической активности Горно-Алтайского природного очага чумы судили по количеству изолируемых культур возбудителя и по отношению количества участков с зарегистрированными эпизоотиями к общему числу обследованных участков, на которых когда-либо был выделен чумной микроб. Первый показатель дает количественное описание интенсивности эпизоотического процесса. Второй – отражает информацию о территории очага, на которой протекают эпизоотии. Эти показатели достаточно объективно характеризуют состояние очага при условии постоянства основных параметров эпизоотологического обследования (объемы исследуемого материала, сроки, широта охвата территории) на протяжении всего рассматриваемого периода. Именно такой подход, за редким исключением, и был реализован при многолетнем мониторинге очага.

Изменения численности монгольской пищухи в пределах ее ареала в Юго-Восточном Алтае были прослежены по единой методике с 1980 по 2009

год. Численность определяли в весенний (апрель–июнь) и осенний (август–октябрь) периоды по количеству жилых нор-колоний на 1 га. Для этого на 2–4-километровых маршрутах подсчитывали все норы-колонии в полосе 10 или 30 м, после чего пересчитывали их число на 1 га. Каждый год в очаге весной обследовалось от 5 до 17 участков, на которых расположены поселения монгольской пищухи (в среднем $11,2 \pm 0,49$), осенью – от 5 до 22 (в среднем $14,0 \pm 0,76$). Для оценки уровня численности зверьков в очаге все учеты, проведенные на каждом участке эпизоотологического обследования в определенный сезон текущего года, усредняли. То есть определение показателя численности за год основывалось на оценках нескольких независимых выборочных совокупностей. Причем, участки, на которых проводили эти работы, в отдельных разновременных учетах могли не повторяться. Используемый подход позволяет достаточно объективно охарактеризовать состояние населения по всей площади очага, в отличие от часто применяющегося метода учета численности на стационарных участках наблюдений или строго определенных точках сбора материала. Всего за весь период наблюдений пройдено 7144 км маршрута. Суммарная площадь учетов составила более 16 тыс. га.

Статистический анализ временных рядов проводили по Т.Андерсону [1], М.Кендаллу, А.Стьюарту [16]. Наличие долговременного тренда оценивали по значимости коэффициентов регрессии (b). Для решения определенных задач при обнаружении центральной тенденции в изменении временных рядов проводили процедуру приведения их к стационарному виду. С этой целью из каждого имеющегося значения временного ряда вычитали ожидаемую величину, полученную по аналитическому уравнению линейной регрессии. Для выделения криволинейного тренда проводили операцию выравнивания временных рядов с помощью метода взвешенной скользящей средней. Сглаживание осуществляли по пяти точкам ряда. О закономерном характере колебаний оцениваемых показателей судили по коэффициентам автокорреляции (r_a). Наличие достоверного коэффициента автокорреляции свидетельствует о неслучайности временного ряда. Период колебаний определяли по коррелограммам, которые показывают зависимость между членами ряда, разделенными во времени.

Результаты и обсуждение

Динамика эпизоотической активности. Первоначально опишем динамику выделения культур чумного микроба в Горно-Алтайском природном очаге за 1961–2009 гг. Многолетние изменения этого показателя представлены на рис. 1, А. За рассматриваемый промежуток времени возбудителя чумы выделяли ежегодно. Долговременный тренд количества выделенных культур отсутствует ($b = 0,666 \pm 0,4205$; $n = 49$; $t = 1,58$; $P > 0,05$). При этом их число в тече-

ние анализируемого периода значительно варьирует.

Прежде всего отметим, что, поскольку объем исследованного материала может определять частоту выявления эпизоотий [26], была оценена связь между количеством полученных культур и числом исследованных мелких млекопитающих за весь рассматриваемый период. Она оказалась низкой и статистически незначимой ($r = 0,253$; $df = 47$; $P > 0,05$), а это позволяет утверждать, что в данном случае объем изучаемых проб не оказывал существенного влияния на число изолятов возбудителя чумы.

Коэффициент автокорреляции временного ряда числа культур с 1961 по 2009 год достоверен и составил $0,320$ ($n = 47$; $P < 0,01$), также данный показатель статистически значим и при анализе результатов с 1980 по 2009 год – периода, по которому проводили оценку динамики численности монгольской пищухи ($r_a = 0,497$; $n = 29$; $P < 0,01$). Такие данные говорят о неслучайности многолетних изменений количества культур и наличии колебаний эпизоотической активности очага с большим периодом. Однако выявленные колебания не регулярны, что показывают коррелограммы фактических и выровненных временных рядов, на которых нет достоверных положительных значений r_a с последовательными годовыми лагами, то есть максимальные и минимальные значения появляются через неравные временные интервалы (рис. 1, Б). На возможных причинах такого явления мы остановимся ниже.

При рассмотрении изменения количества участков, на которых регистрировали эпизоотии, видно, что этот показатель постепенно увеличивается (рис. 1, А). Если в начале исследуемого периода лишь небольшая доля участков обследования была заражена чумой (чаще всего 10–20%), то в последнее десятилетие, за исключением 2001 г., их доля составляла 40–60%. Линейный тренд временного ряда количества эпизоотических участков высокозначим ($b = 0,823 \pm 0,1200$; $df = 47$; $t = 6,85$; $P < 0,001$). Выраженное увеличение количества эпизоотических участков наблюдается с начала 90-х годов XX в. (рис. 1). Это, в первую очередь, связано с последовательным расширением в очаге с этого времени эпизоотической территории, что подробно описано в ряде работ [2, 8, 13, 18, 21].

Между временными рядами двух показателей, характеризующих эпизоотическую активность, наблюдается очевидная связь – их пики и спады достаточно хорошо совпадают (рис. 1, А). Для оценки величины корреляции фактические и выровненные временные ряды количества эпизоотических участков были приведены к стационарным. Коэффициент корреляции между фактическими рядами числа изолированных культур и количества эпизоотических участков составил $0,342$ ($df = 47$; $P < 0,05$), а при сравнении выровненных данных – $0,379$ ($df = 47$; $P < 0,01$). С 1980 г. прослеживается более тесная связь этих показателей, коэффициенты корреляции соответственно равны $0,416$ ($df = 28$; $P < 0,05$) и

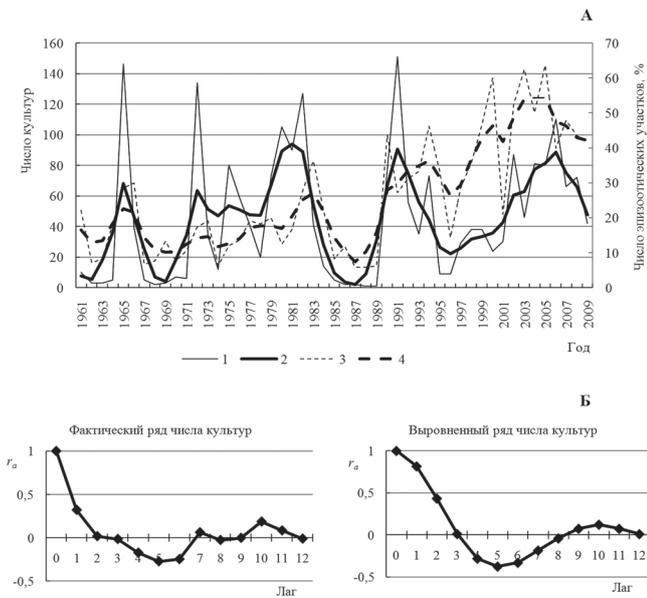


Рис. 1. Многолетняя динамика эпизоотической активности Горно-Алтайского природного очага чумы (А) и коррелограммы временных рядов (Б):

- 1 – фактический ряд количества изолированных культур,
- 2 – выровненный ряд количества изолированных культур,
- 3 – фактический ряд количества эпизоотических участков,
- 4 – выровненный ряд количества эпизоотических участков

0,626 ($df = 28; P < 0,001$). Такое совпадение двух рассматриваемых временных рядов позволяет считать, что они отражают один и тот же процесс – эпизоотическую активность очага.

Динамика численности монгольской пищухи. Далее остановимся на рассмотрении закономерностей изменения численности основного носителя возбудителя – монгольской пищухи (рис. 2, А). Прежде всего отметим, что сравнение фактических временных рядов весенней и осенней численности показывает высокую степень корреляции между ними ($r = 0,729; df = 28; P < 0,001$), а уровень первой ниже, чем второй, что наглядно видно на приведенном рисунке. Очевидно, что динамика численности зверька имеет комбинированный характер (рис. 2, А). Она складывается из направленного долговременного изменения численности и определенных ее колебаний. С 1980 по 2009 год наблюдается достоверное увеличение весенней ($b = 0,126 \pm 0,0303; df = 28; t = 4,16; P < 0,001$) и осенней численности монгольской пищухи ($b = 0,075 \pm 0,0360; df = 28; t = 2,09; P < 0,05$). Однако полученные коэффициенты регрессии высокозначимо различаются ($t = 10,54; P < 0,001$). Весенняя численность за этот промежуток времени возросла более чем в два раза (теоретическая численность, полученная из уравнения линейной регрессии, в 1980 г. составила 3,09 жилых нор на 1 га, в 2009 г. – 6,74). Направленный рост численности монгольской пищухи осенью наблюдается в меньшей степени. Теоретическая численность в 1980 г. составила 5,85 жилых нор на 1 га, в 2009 г. – 8,03. Очевидно, что за рассматриваемый период происходит уменьшение разницы между числом жилых нор на 1 га в весен-

ний и осенний период. По-видимому, это определяется тем, что осенью средняя величина показателя по очагу приближается к пределам емкости среды, иными словами к максимально возможному количеству зверьков, способных существовать на единице площади. В то же время на отдельных локальных участках уровень численности может быть гораздо выше. Весьма вероятно, что долговременный тренд на повышение численности представляет собой восходящую кривую (фазу роста) долгосрочного цикла с периодом в несколько десятилетий.

Для определения закономерностей процесса колебаний численности была проведена описанная выше процедура приведения временных рядов к стационарному виду. Выявлено, что колебания численности монгольской пищухи на территории очага имеют не случайный характер. Коэффициенты автокорреляции стационарных временных рядов составили весной – 0,334 ($P < 0,05$), осенью – 0,465 ($P < 0,01$), что свидетельствует о наличии циклических колебаний численности с большим периодом.

Построенные коррелограммы показали, что период циклических колебаний численности при оценке фактических стационарных временных рядов составил семь-восемь лет при весенних учетах и восемь-девять лет при осенних (рис. 2, Б). По выровненным стационарным рядам период в обоих случаях равен восьми годам. Это позволяет считать, что период циклических колебаний численности монгольской пищухи в Горно-Алтайском природном очаге чумы составляет около восьми лет.

Отметим, что изменение численности монгольской пищухи в трех отдельных популяциях, расположенных на рассматриваемой территории, характеризуется определенными различиями [30], и приведенные в настоящем сообщении данные отражают общую тенденцию в динамике численности зверька в Юго-Восточном Алтае.

Интересен тот факт, что за этот же период наблюдаются сходные процессы в поселениях монгольской пищухи, расположенных в западной части Монгольского Алтая на территории Монголии примерно в 100–150 км от южной границы Горно-Алтайского природного очага чумы [31]. Здесь, судя по приведенным в статье данным, после очень высоких уровней численности, зарегистрированных в 1980–1981 гг., и последовавшего после этого резкого спада, происходит возрастание численности с определенными колебаниями. Пики численности повторяются через 9–11 лет. Напротив, по материалам отчетной документации Тувинской противочумной станции, в Юго-Западной Туве на территории Тувинского природного очага чумы в последнее время отмечено существенное снижение обилия монгольской пищухи, выразившееся как в исчезновении ряда крупных пространственных группировок, так и уменьшении средней плотности населения зверьков. В этом регионе регистрируют периодические колебания численности зверька с

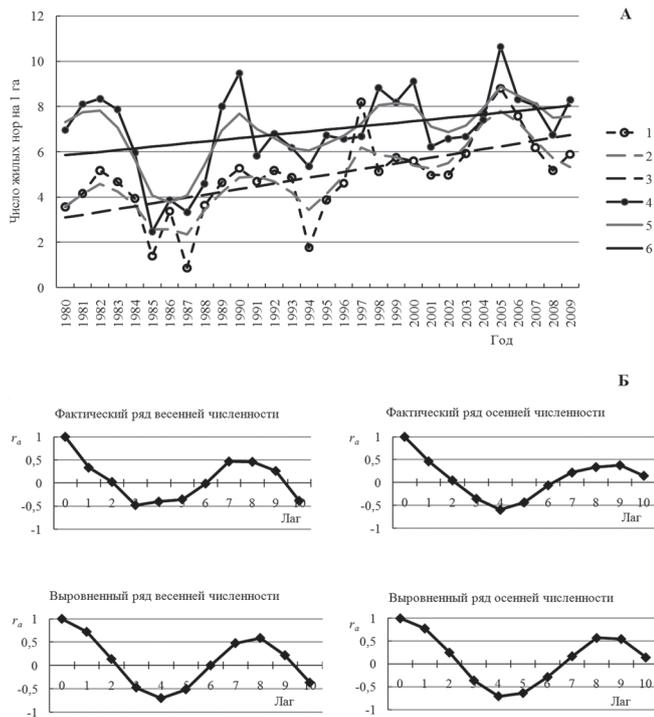


Рис. 2. Многолетняя динамика численности монгольской пищухи в Горно-Алтайском природном очаге чумы (А) и коррелограммы временных рядов (Б):

1 – фактический ряд весенней численности, 2 – выровненный ряд весенней численности, 3 – тренд весенней численности, 4 – фактический ряд осенней численности, 5 – выровненный ряд осенней численности, 6 – тренд осенней численности

сильными депрессиями [23].

Связь эпизоотической активности и численности населения монгольской пищухи. Сравнение показателей, отражающих эти процессы, показывает определенное сходство в их многолетних циклических колебаниях (рис. 3). Рассмотрим количественную оценку связи на основе имеющихся временных рядов. Коэффициенты корреляции между фактическими временными рядами количества культур и числа жилых нор на 1 га составили 0,334 ($P > 0,05$) при весенних учетах и 0,398 ($P < 0,05$) при осенних. Однако при смещении временного ряда количества культур на один год назад степень связи существенно возрастает, коэффициенты корреляции в этом случае достоверны и равны, соответственно 0,483 ($P < 0,01$) и 0,609 ($P < 0,001$). При дальнейшем увеличении лага корреляция уменьшается и приближается к нулю. После устранения направленного тренда на увеличение во временных рядах численности и приведения их к стационарным величинам корреляция между сравниваемыми рядами осталась практически на том же уровне. Сравнение фактического стационарного ряда количества эпизоотических участков и фактических рядов численности показало, что между ними имеется явная связь, коэффициент корреляции равен 0,453 ($P < 0,05$) для весенней численности и 0,582 ($P < 0,001$) для осенней. При смещении первого временного ряда на один год назад эти величины

составили – 0,468 ($P < 0,05$) и 0,432 ($P < 0,05$). По этому показателю статистически подтвержденного эффекта запаздывания в проявлении связи с численностью, как в предыдущем случае, не наблюдается. Выявленные статистические закономерности отчетливо просматриваются и при непосредственном обращении к данным эпизоотологического обследования очага, представленным на рис. 3.

Необходимо отдельно остановиться на рассмотрении особенностей проявления эпизоотической активности в период, соответствующий третьему циклу численности монгольской пищухи, отображенному на рис. 3. На этом временном отрезке связь изменения числа изолируемых культур с ходом численности зверька явно не просматривается, тогда как изменение количества эпизоотических участков ему соответствует. Каковы причины таких различий? Как отмечалось выше, количество изолируемых культур может объективно отражать интенсивность эпизоотического процесса только при сохранении основных параметров эпизоотологического обследования на протяжении всего рассматриваемого периода. Поэтому отсутствие выраженного эпизоотического цикла, оцениваемого по количеству выделенных культур и связанного с третьим циклом численности монгольской пищухи (рис. 3), весьма вероятно, обусловлено недостаточной интенсивностью эпизоотологического обследования очага. Однако широта охвата обследуемой территории очага в это время оставалась сопоставимой с таковой по всему рассматриваемому периоду. Данные обстоятельства и определили то, что эпизоотический цикл, связанный с циклом численности монгольской пищухи в 1994–2001 гг., проявился только в количестве эпизоотических участков.

Для объяснения отсутствия регулярных колебаний эпизоотической активности за весь период обследования очага, что мы констатировали выше, рассмотрим еще одну вероятную причину, обусловившую такую картину. Наиболее очевидное объяснение наличия резких неперiodических колебаний эпизоотической активности в начале рассматриваемого периода – с 1961 до конца 70-х годов (рис. 1) – это влияние мероприятий по неспецифической профилактике, выполнявшихся в очаге. Масштабные дератизационные и дезинсекционные работы проводили с 1966 по 1976 год на большей части Уландрыкского и на восточной части Тархатинского участков очаговости. За этот период суммарная площадь дератизационных обработок составила 73065 га, а дезинсекционных – 50198 га. При этом каждая выявляемая эпизоотия подавлялась путем истребления мелких млекопитающих (в первую очередь монгольских пищух) и их блох, что не могло не сказаться на естественном ходе эпизоотического процесса. С 1977 г. профилактические мероприятия стали носить ограниченный характер и сводились к опытным и защитным обработкам вокруг стоянок пастухов и населенных пунктов.

Таким образом, в Горно-Алтайском природном

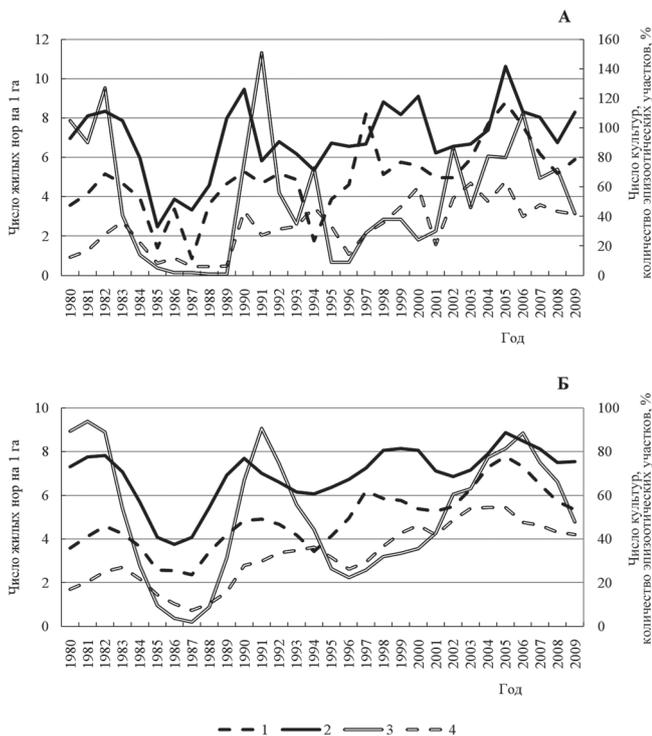


Рис. 3. Многолетняя динамика эпизоотической активности и численности монгольской пищухи в Горно-Алтайском природном очаге чумы: фактические ряды (А), выровненные ряды (Б):

1 – весенняя численность, 2 – осенняя численность, 3 – количество изолированных культур, 4 – количество эпизоотических участков

очаге чумы наблюдаются циклические колебания численности населения монгольской пищухи и связанные с ними закономерные изменения эпизоотической активности. В фазе роста численности монгольской пищухи происходит возрастание эпизоотической активности очага. Пик последней, оцениваемой по количеству изолируемых культур, совпадает или приходится на следующий год после пика численности зверька, то есть на начало фазы спада. При депрессии и на начальном этапе роста численности активность очага минимальная. Нет ничего неожиданного в том, что связь между эпизоотической активностью и уровнем численности зверьков более выражена в осенний период, когда имеет место сезонная активизация эпизоотий в очаге [15]. По-видимому, запаздывание максимального проявления эпизоотической активности на небольшой промежуток времени по отношению к пику численности носителя возбудителя является достаточно универсальной закономерностью. Сходные процессы отмечены в природном очаге чумы Монгольского Алтая, в котором, хотя монгольская пищуха и не является основным носителем, эпизоотии в ее поселениях протекали на следующий год после пика численности зверька [31]. Возникновение эпизоотий на пике и на начальном этапе спада численности основного носителя характерно для различных очагов с кардинально отличающейся биоценотической структурой

[5, 6, 19, 20, 27].

Результаты представленных материалов свидетельствуют, что регулярные изменения эпизоотической активности Горно-Алтайского природного очага чумы определяются циклическими колебаниями численности монгольской пищухи. Причины, обуславливающие циклические колебания численности зверька, требуют изучения. Вместе с этим полученные данные могут быть использованы для прогнозирования эпизоотической ситуации в Горно-Алтайском природном очаге чумы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андерсон Т. Статистический анализ временных рядов. М.: Мир, 1976. 760 с.
2. Балахонов С.В., Вержущий Д.Б., Корзун В.М. и др. Журн. инфекционной патологии. 2009. 3(16):16–20.
3. Бондаренко А.А., Иннокентьева Т.И. Эпидемиол. и профилактика. Особо опасных инф. в МНР и СССР. Улан-Батор; 1978. С. 108–10.
4. Бондаренко А.А., Иннокентьева Т.И., Климов В.Т. и др. О биоценотической и пространственной структуре Горно-Алтайского (Сайлюгемского) очага чумы. В кн.: Международный и нац. аспекты эпиднадзора при чуме. Иркутск; 1975. Ч. 1. С. 64–7.
5. Бурделов А.С. О цикличности изменений численности больших песчанок и эпизоотий в их популяциях. Труды Средне-Азиатского науч.-исслед. противочум. ин-та. Алма-Ата, 1959; 5:177–85.
6. Гаузитейн Д.М., Куницкий В.Н., Дубовицкий Н.М. и др. Динамика эпизоотий чумы в Или-Каратальском междуречье. Матер. 8 науч. конф. противочум. учреждений Средней Азии и Казахстана. Алма-Ата; 1974. С. 159–61.
7. Денисов А.В., Чипанин Е.В., Ешелкин И.И. и др. Современный ареал монгольской пищухи в Юго-Восточном Алтае. Журн. инфекционной патологии. 2009; 3(16):99–100.
8. Денисов А.В., Чипанин Е.В. Динамика проявлений эпизоотий чумы в Горно-Алтайском природном очаге. Журн. инфекционной патологии. 2009; 3(16):100–1.
9. Деревщицов А.Г., Ешелкин И.И., Лазарев Б.В. и др. Распространение и численность носителей чумы в Горно-Алтайском очаге. В кн.: Пробл. природного очаговости чумы. Иркутск; 1980. Ч. 1. С. 77–8.
10. Деревщицов А.Г., Михайлов Е.П., Басманов В.И. и др. Современное эпизоотическое состояние Горно-Алтайского очага чумы. В кн.: Организация эпиднадзора при чуме и меры ее профилактики. Алма-Ата; 1992. Ч. 2. С. 209–11.
11. Ешелкин И.И., Михайлов Е.П. О формировании ареала монгольской пищухи в Юго-Восточном Алтае. Журн. инфекционной патологии. 2009; 3(16):110–1.
12. Ешелкин И.И., Михайлов Е.П. К вопросу о гостальности Горно-Алтайского природного очага чумы. Журн. инфекционной патологии. 2009; 3(16):111–2.
13. Ешелкин И.И., Фомина Л.А., Шмидт А.А. и др. Новый эпизоотический участок Горно-Алтайского (Сайлюгемского) очага чумы. В кн.: Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. Алмата; 2001. Вып. 4. С. 137–40.
14. Иннокентьева Т.И. Особенности экологии *Yersinia pestis altaica* [автореф. дис. ... д-ра мед. наук]. Саратов; 1997. 59 с.
15. Иннокентьева Т.И., Корзун В.М., Маишковский И.К. и др. Эпизоотологическая роль блох в Горно-Алтайском природном очаге чумы. Паразитология. 2004. 4(38):273–87.
16. Кендалл М., Стьюарт А. Многомерный статистический анализ и временные ряды. М.: Наука; 1976. 736 с.
17. Коренберг Э.И. Природная очаговость инфекций: современные проблемы и перспективы исследований. Зоол. журн. 2010; 1(89):1–13.
18. Корзун В.М., Чипанин Е.В., Иннокентьева Т.И. и др. Расселение блохи *Stenophyllus hirticrus* и распространение эпизоотий чумы в Горном Алтае. Паразитология. 2007; 3(41):206–17.
19. Куницкий В.Н., Гаузитейн Д.М., Куницкая Н.Т. и др. Информативность показателей плотности популяций больших песчанок и их блох в отношении распознавания фазы эпизоотического цикла чумы. В кн.: Экология и медицинское значение песчанок фауны СССР. М.; 1977. С. 327–9.
20. Лавровский А.А. О цикличности эпизоотий в природных очагах чумы и причинах, ее обуславливающих. Пробл. особо опасных инф. 1969; 1(5):3–10.
21. Михайлов Е.П., Ешелкин И.И., Мищенко А.И. и др. О новых эпизоотических участках в Горно-Алтайском природном очаге чумы. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2004; 2(1):140–2.

22. Михайлов Е.П., Олькова Н.В., Иннокентьева Т.И. и др. Характеристика Сайлюгемского (Горно-Алтайского) природного очага чумы в период депрессии численности монгольской пищухи. В кн.: Природная очаговость чумы в Монгольской Народной Республике. Иркутск; 1988. С. 31–3.
23. Окунев Л.П., Вержуцкий Д.Б. Численность монгольской пищухи в связи с ее эпизоотологическим значением в Тувинском природном очаге чумы. Журн. инфекционной патологии. 2009; 3(16):164–5.
24. Онищенко Г.Г., Федоров Ю.М., Кутырев В.В. и др. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 192 с.
25. Потков А.Ф., Вержуцкий Д.Б., Корзун В.М. и др. Итоги популяционно-экологических исследований природной очаговости чумы в Сибири. Пробл. особо опасных инф. 2007; 2(94):33–6.
26. Руденчик Ю.В., Солдаткин И.С., Лубкова И.В. и др. Оценка связи эпизоотии чумы с численностью носителей и переносчиков в природных очагах. В кн.: Эпидемиология и профилактика чумы и холеры. Саратов; 1983. С. 3–11.
27. Шевченко В.И., Лавровский А.А., Самуров М.А. и др. К вопросу о прогнозировании крупных эпизоотий чумы в Волго-Уральских песках. Пробл. особо опасных инф. 1976; 2(48):10–5.
28. Шилов М.Н., Варшавский С.Н. Численность большой песчанки *Rhombomys jhimus* (Rodentia, Cricetidae) в Преддустюрте и на Северном Устюрте и связь ее с эпизоотиями чумы. Зоол. журн. 1987; 10(66):1552–60.
29. Ширанович П.И., Исаева Э.В., Лобанова Т.И. и др. О долговременных закономерностях эпизоотийной активности Закавказского равнинно-предгорного очага чумы и критериях ее прогнозирования. Зоол. журн. 1980; 3(59):420–9.
30. Korzun V.M., Chipanin E.V., Denisov A.V. et al. Long-duration alterations of Pallas' pika populations' numbers in Gorno-Altai natural plague focus. In: Current issues on zoonotic diseases. Ulaanbaatar; 2010. P. 120–7.
31. Tiguldur N., Bolormaa G., Zolzaya E. Plague epizootological significance of Pallas Pika's density in Mongol-Altai mountain. In: Zoonotic infectious diseases and tourism. Ulaanbaatar; 2009. P. 175–6.

V.M.Korzun, E.V.Chipanin, T.I.Innokent'eva, E.P.Mikhailov, A.V.Denisov

Dynamics of Epizootic Activity and Abundance of Mongolian Pika in the Altai Mountain Natural Plague Focus

Irkutsk Anti-Plague Research Institute of Siberia and Far East; Altai Plague Control Station, Gorno-Altai

Long-term dynamics of epizootic activity (1961–2009) and the abundance (1980–2009) of Mongolian pika – the main agent carrier – was traced in Altai mountain plague natural focus. Cyclic fluctuations of Mongolian pika abundance with near eight-year period are observed on the background of its long-term directional rise. Regular variations of focus epizootic activity are connected with the abundance cycles. The increase of epizootic activity occurs in the phase of Mongolian pika abundance rise. The peak of epizootic activity, estimated by the amount of cultures isolated, coincides with the animal's numbers peak or falls on the next year that is on the beginning of recession phase. The activity of the focus is minimal during depression of the pika's abundance and in the initial stage of its growth.

Key words: Altai mountain natural plague focus, epizootic activity, Mongolian pika, abundance, dynamics.

Об авторах:

Корзун В.М., Чипанин Е.В., Иннокентьева Т.И. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. 664047, Иркутск, ул. Триллссера, 78, E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Михайлов Е.П., Денисов А.В. Алтайская противочумная станция. Горно-Алтайск.

Authors:

Korzun V.M., Chipanin E.V., Innokent'eva T.I. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 664047, Irkutsk, Trilissera St., 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Mikhailov E.P., Denisov A.V. Altai Plague Control Station. Gorno-Altai.

Поступила 02.07.10.

В.В.Мананков¹, В.В.Алексеев¹, В.П.Смелянский¹, Т.П.Пашанина¹, Н.И.Погасий¹, Е.В.Путинцева¹,
А.Л.Британова¹, В.А.Антонов¹, В.В.Алексеева¹, Г.А.Ткаченко¹, С.Т.Савченко², Н.В.Русакова²,
Г.И.Фролова², А.Ю.Фролов², Е.А.Иоанниди³, В.Г.Божко³, С.Ф.Попов³

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ПРИРОДНОГО ОЧАГА КРЫМСКОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ В ВОЛГОГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ ЗА ПЕРИОД С 2000 ПО 2009 ГОД

¹ФГУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт»,

²ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Волгоградской области»,

³ГОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград

За период с 2000 по 2009 год в Волгоградской области зарегистрировано 104 случая заболеваний Крымской геморрагической лихорадкой (КГЛ), 9 из которых закончились летально (8,6 %). Показана динамика заболеваемости людей и ее связь с уровнем инфицированности основного носителя и переносчика – клеща *H. marginatum*. Расширение границ природного очага произошло за счет увеличения ареала обитания этого вида. Приведенные в статье данные позволили сделать вывод, что на территории Волгоградской области сформировался и активно функционирует стойкий природный очаг КГЛ, эпицентром которого являются 2 юго-западных района – Котельниковский и Октябрьский, с активным вовлечением в эпидемический процесс соседних административных территорий и лесопарковой зоны южных районов Волгограда.

Ключевые слова: Крымская геморрагическая лихорадка, носители и переносчики вируса КГЛ, клещи *H. marginatum*, природный очаг, Волгоградская область.

Крымская геморрагическая лихорадка, вызванная вирусом Конго, в настоящее время является актуальной проблемой для здравоохранения ряда стран, на территории которых зарегистрированы природные очаги [12]. С середины 90-х годов прошлого века в нашей стране наблюдается активизация эпидемического процесса этой опасной инфекции. В настоящее время наиболее стойкие и активные очаги КГЛ расположены в Южном Федеральном округе (ЮФО) Российской Федерации [5, 7]. За последние 10 лет в ЮФО было зарегистрировано 1333 больных, из них 62 случая (4,6 %) закончились летально.

Основными носителями и переносчиками вируса КГЛ являются иксодовые клещи, преимущественно рода *Hyalomma*; на юге России – это *H. marginatum*. При этом клещи являются не только переносчиками, но и хозяевами вируса. Природные очаги КГЛ практически совпадают с ареалом распространения клещей *H. marginatum* [1, 9]. Выпешка заболеваемости 2000 г. в Волгоградской области как раз была вызвана резко возросшей численностью клещей и эпизоотией КГЛ среди диких млекопитающих. На юге России этот вид клеща распространен в зоне сухих степей и полупустынь. Температурная изотерма ограничивается 3000 °С [3]. В последние годы ареал клеща *H. marginatum* несколько расширился к северу. Скорее всего, это и обусловило возникновение эпидемической ситуации на территории Котельниковского района Волгоградской области [6].

Известно, что природные очаги видоизменяются под влиянием антропогенных воздействий. Происходят изменения в видовом составе, численности и ареалах членистоногих-переносчиков, резервуаров и возбудителей многих природно-очаговых инфекций, в том числе и КГЛ, изменяется их эпиде-

миологический статус, что влечет за собой преобразование природных очагов заболеваний в антропогенные [2].

Независимо от географического положения очагов КГЛ болеют в основном сельские жители и в единичных случаях – городское население, выезжающее в сельскую местность на отдых, на садово-огородные участки и т.п. Основную часть заболевших составляют пастухи-чабаны, доярки, персонал животноводческих ферм, ветеринарные работники, имеющие ежедневный контакт с животными-прокормителями клещей.

При обилии видов переносчиков, из которых выделяются штаммы возбудителя, всегда имеются виды, экологические особенности которых обеспечивают существование природного очага. Но основным переносчиком и резервуаром КГЛ является все-таки клещ *H. marginatum*, который отличается большей агрессивностью по сравнению с другими клещами [11].

Начиная с 2000 г. проблема распространения на территории Волгоградской области Крымской геморрагической лихорадки, вызванной вирусом Конго, и вопросы усовершенствования эпидемиологического надзора и путей профилактики этой инфекции продолжают оставаться актуальными.

Целью исследования явилось изучение эпидемического потенциала природного очага КГЛ, региональных особенностей эпидемических проявлений и определение роли этой нозологической формы в краевой инфекционной патологии.

Материалом для исследования служили птицы, грызуны, кровососущие насекомые-клещи, сыворотки крови людей и крупного рогатого скота. Учет численности и инфицированности клещей, проводили, используя стандартные методы. Поиск антигенов

в сыворотках крови людей и животных, суспензиях органов грызунов, клещей и поиск антител у людей и животных проводили с помощью твердофазного иммуноферментного метода (ТИФМ). Поиск РНК вируса КГЛ в суспензиях клещей и сыворотках людей осуществляли полимеразной цепной реакцией с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [8].

При исследовании материала соблюдали меры предосторожности в соответствии с Санитарными правилами СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности», СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности и возбудителями паразитарных болезней» и МУ «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности (МУ 1.3.2569-09).

За период с 2000 по 2009 год в Волгоградской области зарегистрировано 104 случая заболеваний КГЛ, 9 из которых закончились летально (8,6 %) (рис. 1). Большинство заболевших проживало в Котельниковском (53,8 %) и близко расположенных районах – Октябрьском (21,3 %) и Калачевском (8,6 %), в других же районах области регистрировалось значительно меньшее число случаев. Так, в Котельниковском районе выявлено 58 больных КГЛ. Причем динамика возникновения заболеваний стабильная: в 2000 г. – 16 случаев КГЛ, в 2001 г. – 5, в 2002 г. – 2, в 2003 г. – 3, в 2004 г. – 2, в 2005 г. – 5, в 2006 г. – 15, в 2007 г. – 7 и в 2008 г. – 3 человека, а в 2009 г. – заболеваний КГЛ не регистрировалось. Вторым по значимости является Октябрьский, где один случай КГЛ был выявлен в 2006 г., 14 – в 2007 г. и 5 – в 2008 г. Несколько меньше регистрировалось заболеваний в Калачевском районе: 5 случаев в 2007 г. и 2 – в 2008 г.; Светлоярском районе: 1 – в 2007 г., 3 – в 2008 г. и 1 – в 2009 г. Такая же заболеваемость КГЛ была и в Суровикинском районе: 1 случай в 2005 г., 3 – в 2007 г. и по одному – в 2008 и 2009 гг.

Территориальное распределение больных КГЛ по районам области показано на рис. 2.

Анализ возрастной структуры заболеваемости КГЛ на территории Волгоградской области пока-

зал, что наибольшее количество заболевших было старше 40 лет. Одной из особенностей эпидемических проявлений КГЛ в данном регионе было то, что дети практически не болели этой инфекцией. Лишь в 2006 г. отмечен 1 больной, учащийся школы в возрасте 13 лет.

Чаще всего КГЛ болели люди, занятые в сельском хозяйстве и животноводстве, а также безработные, занимающиеся разведением домашних животных. Реже болели городские жители, выезжающие на полевые работы, на дачные участки, рыбную ловлю и отдых. Случаев внутрибольничного заражения от больных КГЛ на территории Волгоградской области не зарегистрировано.

При работе в полевых условиях или же во время отдыха на природе чаще реализовался инокуляционный путь передачи инфекции, т. е. укус инфицированного клеща. В условиях хозяйственной деятельности в частных подворьях отмечался контаминационный путь, т. е. раздавливание клещей незащищенными руками во время снятия их с сельскохозяйственных животных или при стрижке овец.

Как показала практика (вспышка КГЛ 2000 года в Волгоградской области), уровень подготовки медицинских работников первичного звена был достаточно высокий, и предварительный диагноз «КГЛ» выставлялся большинству заболевших. Однако позднее обращение за медицинской помощью (29 % больных обращались в ЛПУ на 4-й день и в более поздние сроки), несоблюдение рекомендаций по индивидуальной защите от заражения вирусом свидетельствуют о недостаточном уровне знаний населения о мерах профилактики КГЛ, прежде всего среди жителей сельской местности, несмотря на развернутую санитарно-просветительную работу.

В Волгоградской области встречается 12 видов иксодовых клещей, наиболее массовыми являются: *Hyalomma scupense*, *Dermacenter marginatus*, *Dermacenter reticulatus*, *Rhipicephalus rossicus* и *Hyalomma marginatum*. Доминирующее по численности и встречаемости положение занимают клещи из рода *Hyalomma*, виды *H. scupense* (ИД=38,05 %) и *H. marginatum* (ИД=27,08 %). Субдоминантами в фауне иксодид Волгоградской области являются клещи

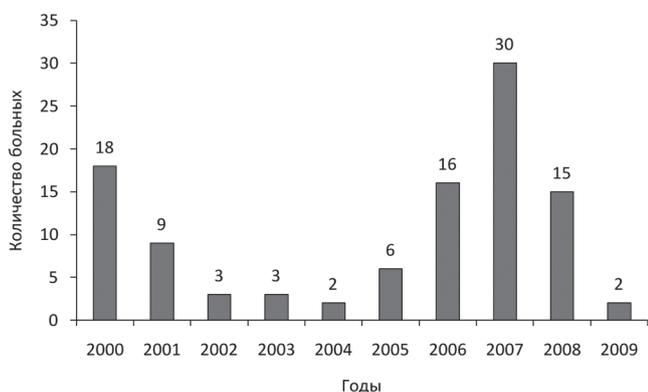


Рис. 1. Динамика заболеваемости КГЛ в Волгоградской области за 2000–2009 гг.

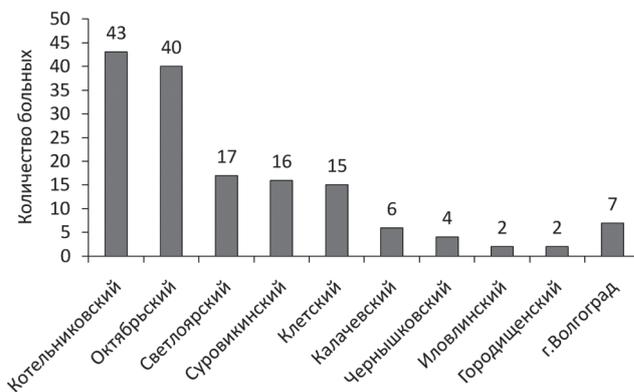


Рис. 2. Территориальное распределение больных КГЛ по районам области

из рода *Dermacentor* – *D. reticulatus* (ИД=14,14 %) и *D. marginatus* (ИД=14,03 %) [4].

Клещи *H. marginatus* в Волгоградской области одни из главных переносчиков КГЛ. Если в 1998 г. этот вид не встречался, то уже летом 1999 г. с крупного рогатого скота было собрано 159 экземпляров клеща *H. marginatus* (78 % – в Котельниковском, 18,2 % – в Октябрьском и 3,8 % – в Суровикинском районах). В тот период вирусофорные особи не обнаружены. Первые инфицированные вирусом КГЛ клещи стали обнаруживаться с 2000 г., тогда же и произошла первая вспышка этого опасного заболевания среди людей. Если в 2000 г. ареал распространения данного вида клеща охватывал лишь 6 юго-западных районов: Котельниковский, Октябрьский, Суровикинский, Калачевский, Клетский и Чернышковский, то в 2005 г. единичные находки отмечались и в Иловлинском, Городищенском, Серафимовичском и Светлоярском. С 2003 г. клещи данного вида стали обнаруживать и у жителей Волгограда, обратившихся за медицинской помощью. Из них 28,2 % отмечали посещение лесопарковых и садово-дачных зон южных окраин областного центра, но снятые с жителей Волгограда клещи *H. marginatus* не инфицированы вирусом КГЛ. Динамика численности клещей *H. marginatus*, собранных с людей и крупного рогатого скота, показана на рис. 3.

Обращает на себя внимание, что максимальная численность клещей *H. marginatus* зарегистрирована в 2000 и 2007 гг.; как раз в этот период наблюдалась наибольшая заболеваемость среди людей – 18 и 30 случаев соответственно. Кроме того, удалось проследить корреляцию вирусофорности основных переносчиков с уровнем заболеваемости.

Всего за период 2000–2009 гг. исследовано 5157 проб иксодовых клещей. Получено 152 положительных результата, из них 88,2 % от клещей *H. marginatus* и 11,8 % от клещей *Rh. rossicus*. Причем в 8 пробах исследовались клещи, снятые с людей, что свидетельствует о том, что *Rh. rossicus* вовлекается не только в эпизоотический, но и в эпидемический процесс. Находки антигена вируса КГЛ в клещах *Rh. rossicus*, по всей видимости, связаны с тем, что на прокормителях (крупный рогатый скот) одновре-

менно паразитировали несколько видов иксодид, в том числе и *H. marginatus*, который мог содержать вирус, и непосредственно через прокормителя инфицировались другие виды клещей. Однако, учитывая биологию клещей *Rh. rossicus*, они могут рассматриваться как транзитные носители вируса. При исследовании других видов клещей положительных результатов не было.

Пик вирусофорности приходился на 2006–2007 гг., предшествующие подъему заболеваемости и на период наибольшего подъема, затем вирусофорность снижается до 3,5 % в 2008 г. и 0,9 % (средняя за 10 лет – 2,9 %) в 2009, в этот же период снизилось и количество заболевших.

Известно, что показатели вирусофорности имаго и преимагинальных фаз *H. marginatus* свидетельствуют об активности циркуляции вируса в эпидемический сезон и, как и показатель заклещевленности скота *H. marginatus*, пропорциональны уровню заболеваемости. Высокие показатели вирусофорности преимагинальных форм клещей ранней осенью могут свидетельствовать о неблагоприятном эпидемиологическом прогнозе на следующий год, поскольку благодаря возможности трансфазовой и трансвариальной передачи возбудитель находит в клещах устойчивые условия существования, а длительное сохранение вируса в голодных имаго обеспечивает выживание вирусной популяции в межэпизоотический период [9, 10].

Более половины (54,6 %) положительных проб обнаружено на территории Котельниковского и Октябрьского районов, где регистрировалось наибольшее число случаев КГЛ. Максимальная вирусофорность клещей наблюдалась также на этих административных территориях: в 2006 г. в Котельниковском – 34 % и Октябрьском – 25,2 %.

Домашние и дикие животные являются прокормителями разных фаз развития иксодовых клещей-переносчиков вируса КГЛ. Мелкие дикие животные, как правило, прокармливают неполовозрелых клещей. Круг прокормителей имаго весьма широк и включает многие виды млекопитающих, которые могут воспринимать вирус при укусе инфицированных клещей, среди которых основное место занимают сельскохозяйственные животные.

На территории природного очага КГЛ в Волгоградской области содержится довольно большое количество голов крупного и мелкого рогатого скота. В 5 юго-западных районах области методом ТИФА выборочно исследовались сыворотки КРС на наличие специфических антител. Процент положительных проб у иммунных животных практически не изменялся во времени и колебался в пределах 2,8–3,5. Наибольшее число иммунных животных было выявлено в 2007 г. в Котельниковском (8 %) и Октябрьском (5 %) районах, где активность природного очага КГЛ была ярко выраженной. Это указывает на значение сельскохозяйственных животных как индикаторных видов при изучении очагов КГЛ и

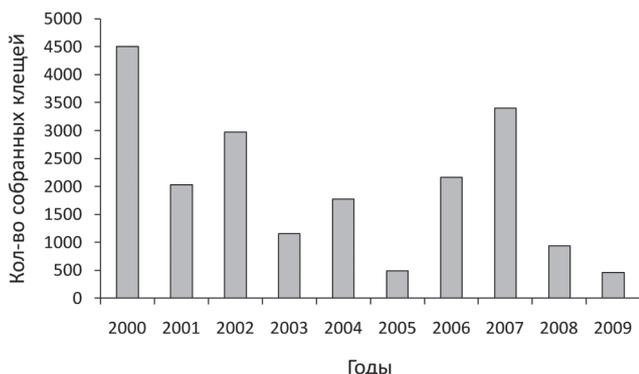


Рис. 3. Динамика численности клещей *H. marginatus*, собранных с людей и КРС

ареала распространения специфического вируса.

С целью изучения истинного уровня инфицированности различных групп населения и выявления иммунной прослойки в 2000–2009 гг. было проведено исследование сывороток крови работников животноводческих хозяйств, имеющих высокий риск инфицирования вирусом КГЛ, проживающих в Котельниковском, Октябрьском, Калачевском, Суворовинском и Чернышковском районах, а также практически здоровых доноров Волгограда.

Показатели иммунной прослойки среди выборочных групп населения в Волгоградской области с учетом ежегодной заболеваемости подтверждают активное состояние природного очага КГЛ, а также увеличение риска заражения сельского населения в юго-западном регионе. Положительные находки антител у здоровых доноров и работников животноводства говорят о частом контакте людей с вирусом этой опасной инфекции в природе.

Установлено, что эпицентром КГЛ в Волгоградской области являются 2 юго-западных района – Котельниковский и Октябрьский, с активным вовлечением в эпидемический процесс соседних административных территорий и лесопарковой зоны южных районов Волгограда. Зона высокого риска заражения КГЛ занимает территорию 1797,8 тыс. га, на которой проживает 1186300 человек. Зона среднего риска занимает территорию 2590,5 тыс. га, на которой проживает 256000 человек.

Таким образом, на территории Волгоградской области функционирует стойкий природный очаг КГЛ, который сформировался в 2000 году. Он является северной частью единого природного очага, охватывающего сопредельные регионы, т.к. установлено, что на территории юга России циркулируют генетически близкие географические варианты возбудителя КГЛ. Учитывая однотипность ландшафтно-географических и климатических характеристик на территориях, сопредельных с Волгоградской областью, общность биоценологических связей в зоне природной очаговости по КГЛ, можно полагать, что эпидемиологические проявления на разных ее участках были обусловлены ростом численности зараженных клещей *H. marginatum* и расширением их ареала возбудителя инфекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аристова В.А., Колобухина Л.В., Щелканов М.Ю., Львов Д.К. Экология вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки и особенности ее клиники на территории России и сопредельных стран. *Вопр. вирусол.* 2001; 4:7–15.
2. Богданова Е.Н. Процессы синантропизации клещей и их эпидемиологическое значение. В кн.: *Паразитология в XXI веке – проблемы, методы, решения: Матер. IV Всерос. съезда паразитол. об-ва при Рос. Акад. наук.* 2008. Т. 1. С. 80–4.
3. Бутенко А.М., Ларичев В.Ф. Влияние климата на активность и распространение очагов Крымской геморрагической лихорадки (КГЛ) в северной части ареала вируса КГЛ. В кн.: *Изменение климата и здоровье России в XXI веке.* М.: Адамант; 2004. С. 134–8.
4. Денисов А.А. Иксодовые клещи на территории Нижнего Поволжья. В кн.: *Паразитология в XXI веке – проблемы, методы, решения: Матер. IV Всерос. съезда паразитол. об-ва при Рос. Акад. наук.* 2008. Т. 1. С. 212–4.
5. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Антоненко А.Д. и др.

Актуальные вопросы эпиднадзора за Крымской геморрагической лихорадкой. *Пробл. особо опасных инф.* 2008; 1(95):5–9.

6. Лобанов А.Н., Савченко С.Т., Смелянский В.П. и др. Крымская геморрагическая лихорадка в Волгоградской области. В кн.: *Арбовирусы и арбовирусные инфекции: Матер. расширенного пленума пробл. комиссии «Арбовирусы» и науч.-практ. конф. «Арбовирусы и арбовирусные инфекции»;* 17–20 октября 2006 г.; Астрахань. Астрахань; 2007. С. 132–5.

7. Методические указания МУ 3.1.1.2488-09 «Организация и проведение профилактических и противоэпидемических мероприятий против Крымской геморрагической лихорадки» (утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 26 февраля 2009). М.; 2009. 44 с.

8. Онищенко Г.Г., Ефременко В.И., Бейер А.П. и др. Обстановка по Крымской геморрагической лихорадке в Южном Федеральном округе. *Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол.* 2006; 4:5–12.

9. Смирнова С.Е. Крымская-Конго геморрагическая лихорадка: этиология, эпидемиология и лабораторная диагностика [дис. д-ра мед. наук]. М; 2003. 121 с.

10. Смирнова С.Е. Мониторинг очага Крымской-Конго геморрагической лихорадки на территории Астраханской области в межэпидемический период. *Журн. эпидемиол. и вакцинопрофилактик.* 2006; 1(26):31–6.

11. Тохов Ю.М. Фаунистический комплекс *IXODIDAE* Ставропольского края (распространение, эпизоотологическое и эпидемиологическое значение, меры борьбы) [автореф. дис. ... д-ра биол. наук]. М.; 2009. 39 с.

12. Whitehouse C.A. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Research.* 2004; 64:145–60.

V.V.Manankov, V.V.Alekseev, V.P.Smelyanskiy, T.P.Pashanina, N.I.Pogasiy, E.V.Putintseva, A.L.Britanova, V.A.Antonov, V.V.Alekseeva, G.A.Tkachenko, S.T.Savchenko, N.V.Rusakova, G.I.Frolova, A.Yu.Frolov, E.A.Ionnidi, V.G.Bozhko, S.F.Popov

Epidemiological Monitoring of Crimean Hemorrhagic Fever Natural Focus in the Volgograd Region in 2000–2009

Volgograd Anti-Plague Research Institute, Center of Hygiene and Epidemiology in the Volgograd Region, Volgograd State Medical University

104 cases of Crimean hemorrhagic fever (CHF), including 9 lethal (8.6%) were registered in the Volgograd Region in 2000–2009. Dynamics of human incidence and its association with the level of infection in the main carrier and vector – *H. marginatum* tick were demonstrated. The expansion of this species habitat resulted in the natural focus borders extension. The data presented in the article allowed to make a conclusion that persistent actively functioning natural focus of CHF had been formed in the territory of the Volgograd Region. The epicenter of this focus is situated in 2 South-Western regions – Kotelnikovskiy and Oktyabrskiy, – and with neighboring administrative territories and green belt of the Volgograd Southern regions being actively involved in the epidemic process.

Key words: Crimean hemorrhagic fever, carriers and vectors of CHF virus, *H. marginatum*, natural focus, the Volgograd Region.

Об авторах:

Мананков В.В., Алексеев В.В., Смелянский В.П., Пашианина Т.П., Погосяй Н.И., Путинцева Е.В., Британова А.Л., Антонов В.А., Алексеева В.В., Ткаченко Г.А. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Савченко С.Т., Русакова Н.В., Фролова Г.И., Фролов А.Ю. Центр гигиены и эпидемиологии в Волгоградской области. 400049, Волгоград, ул. Ангарская, 13. E-mail: cgsnvolga@yandex.ru

Ионниди Е.А., Божко В.Г., Попов С.Ф. Волгоградский Государственный медицинский университет. 400066, Волгоград, Пл. Павших борцов, 1. E-mail: infdis@rambler.ru

Authors:

Manankov V.V., Alekseev V.V., Smelyanskiy V.P., Pashanina T.P., Pogasiy N.I., Putintseva E.V., Britanova A.L., Antonov V.A., Alekseeva V.V., Tkachenko G.A. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 400131, Volgograd, Golubinskaya St., 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Savchenko S.T., Rusakova N.V., Frolova G.I., Frolov A.Yu. Center of Hygiene and Epidemiology in the Volgograd Region. 400049, Volgograd, Angarskaya St., 13. E-mail: cgsnvolga@yandex.ru

Ionnidi E.A., Bozhko V.G., Popov S.F. Volgograd State Medical University. 400066, Volgograd, Pavshikh Bortsov Sq., 1. E-mail: infdis@rambler.ru

Е.А.Тюрин¹, С.А.Иванов¹, Л.И.Маринин¹, И.А.Дятлов¹, М.Н.Ляпин²

БОКСИРУЮЩИЕ УСТРОЙСТВА, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ РАБОТ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ АГЕНТАМИ I–II ГРУПП ПАТОГЕННОСТИ

¹ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk;

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

В соответствии с действующими санитарно-эпидемиологическими правилами важным условием соблюдения требований биологической безопасности является оснащение микробиологической лаборатории современными инженерно-техническими системами и оборудованием, которые, в совокупности с правилами и приемами безопасной работы с патогенными микроорганизмами, должны обеспечивать комплекс мер биологической безопасности для работающего в лаборатории персонала. Одним из средств дополнительной защиты служат боксы биологической безопасности второго и третьего классов. Рассмотрены конструктивные особенности, преимущества и выявлены некоторые недостатки различных боксов биологической безопасности, эксплуатируемых в лабораториях уровня BSL2–3.

Ключевые слова: биологическая безопасность, шкаф вытяжной, бокс биологической безопасности, уровни биологической безопасности.

Важнейшим компонентом профилактики и борьбы с инфекционными заболеваниями является их эффективный мониторинг, который включает своевременное выявление возбудителя болезни, его изучение в лабораторных условиях и обмен надежной информацией о выявленных вспышках инфекционных заболеваний [1]. Соответственно, работы по выявлению и изучению выделенных патогенных биологических агентов (ПБА) необходимо проводить в лабораториях, отвечающих российским и международным требованиям биологической безопасности [5, 6, 7, 11, 14].

Биологическая безопасность как система организационных, медико-биологических и инженерно-технических мероприятий направлена на защиту работающего персонала и окружающей среды от воздействия ПБА [7, 8], которые делятся на несколько групп в зависимости от степени патогенности (опасности).

Действующая нормативно-методическая документация определяет необходимые требования к использованию инженерно-технических средств обеспечения биологической безопасности, в том числе и к применению боксирующих устройств [7, 8]. Говоря о соблюдении требований биологической безопасности при работе с ПБА, нельзя не коснуться вопроса классификации микроорганизмов – возбудителей инфекционных болезней, так как в соответствии с ней формулируются требования к оснащению лабораторий инженерными средствами.

В нашей стране ПБА делятся на 4 группы патогенности от 1-й (самые опасные) до 4-й (опасность минимальная). Этим наша классификация отличается от принятых в США, Канаде и Японии и других странах ВОЗ, где за основу принято распределение микроорганизмов по уровням риска для человека и общества [5, 13, 14]. Так, к самому низкому 1-му уровню риска относятся микроорганизмы самой низкой патогенности, а к самому высокому 4-му – самые

опасные для человека и животных.

Боксирование операций и процессов в микробиологической лаборатории является 1-й линией защиты в системе биологической безопасности лаборатории [2]. Это необходимо помнить для создания и практической реализации технических возможностей безопасного выполнения диагностических и научно-исследовательских работ с ПБА, так как возможно образование профессиональных вредностей биологической природы – бактериальных аэрозолей. Материальными средствами для защиты персонала и удаления ПБА из рабочей зоны и служат микробиологические безопасные или защитные боксы [3, 5].

Бокс биологической безопасности – конструкция, используемая для физической изоляции (удержания и контролируемого удаления из рабочей зоны) микроорганизмов с целью предотвращения возможности заражения персонала и контаминации воздуха рабочей зоны и окружающей среды [3]. В некоторых источниках их называют кабинетами или шкафами биологической безопасности [10, 12–14]. Однако принципиальных отличий в этих названиях нет. Во всех конструкциях есть ламинарный направленный поток воздуха, установлены фильтры тонкой очистки. Обеспечена защита как продукта, так и оператора.

Современные микробиологические боксы представляют собой жесткие металлические конструкции из металла и стекла. Они выдерживают длительное воздействие дезинфицирующих растворов различной природы и концентрации. Выбор конструкции бокса определяется группой опасности микроорганизмов, с которыми работает исследователь, а также характером проводимых манипуляций.

Для работы с ПБА в микробиологических и вирусологических лабораториях различного уровня опасности в соответствии с рекомендациями ВОЗ используют боксы I, II и III классов безопасности [4, 5, 12–14]:

I класс (*cabinet class I*) – бокс с ламинарным потоком воздуха, обеспечивающий защиту диагностического материала от загрязнения в процессе обработки и посева;

II класс (*cabinet class II*) – бокс с ламинарным потоком воздуха, обеспечивающий одновременную защиту оператора и диагностического материала от загрязнения в процессе обработки и посева;

III класс (*cabinet class III*) – бокс обеспечивает самый высокий уровень персональной защиты. Рабочая камера БББ герметична. Доступ к рабочей поверхности осуществляется с помощью специальных служебных резиновых перчаток-рукавов, которые присоединены к отверстиям на передней панели кабинета.

Вытяжные шкафы, эксплуатируемые до настоящего времени в некоторых микробиологических лабораториях, в основном отечественного производства, отличает простота и надежность в эксплуатации, относительно низкая стоимость, наличие и возможность приобретения запасных частей, выполнение ремонта любой сложности своими силами без привлечения специалистов из фирм, выполняющих эти услуги. Для создания направленного воздушного потока на вытяжку шкафы необходимо подсоединять при помощи гибких гофрированных вставок к вытяжной системе вентиляции через один или два каскада фильтров тонкой очистки воздуха.

Боксы зарубежного производства надежны в эксплуатации, но сложны в техническом обслуживании, требуется специальная подготовка инженерно-технического персонала. Одним из требований фирмы-изготовителя является сертификация персонала, эксплуатирующего и непосредственно работающего на данном виде оборудования. Кроме того, инструкции по эксплуатации зарубежного образца требуют точного перевода для понимания терминологии. Еще один недостаток – они дороги, а запасные части можно приобрести только у фирм-производителей.

Нам представляется актуальным рассмотреть некоторые варианты имеющихся в лабораториях вытяжных шкафов и боксов, представить их характеристики и особенности для практического применения.

Цель настоящего исследования – провести анализ некоторых из конструкций вытяжных шкафов и боксов биологической безопасности, эксплуатируемых более 20 лет в нашей организации, для обеспечения требований биологической безопасности при проведении работ с ПБА.

Для решения поставленных задач были использованы материалы с описанием технических характеристик шкафов и боксов биологической безопасности, документы по контролю работы боксирующих устройств различных классов: протоколы сертификаций и акты проверок работоспособности, а также инструктивно-методические материалы по эксплуатации устройств и работе в них.

Вытяжной шкаф (прототип бокса биологической безопасности) представляет собой металлическую конструкцию с прозрачной передней панелью, которая может быть жестко закреплена, образуя строго определенное окно рабочей зоны, установленную на стол из металла или специальную подставку, покрытую материалом, устойчивым к воздействию агрессивной среды. При эксплуатации вытяжной шкаф всегда должен быть подсоединен к вытяжной системе вентиляции через каскад фильтров тонкой очистки.

Шкаф типа «ШНЖ» рассчитан на 1, 2 или 3 рабочих места (рис. 1). Шкаф прост и надежен в эксплуатации, относится к II классу безопасности. Используется для проведения радиобиологических исследований, выпускается в настоящее время фирмой «Изотоп». Изготавливается из нержавеющей стали. Имеет собственный фильтр для защиты от радионуклидов, переднюю прозрачную панель из органического стекла, которая поднимается и опускается по принципу гильотины, снабжается резиновыми рукавами-перчатками, одеваемыми на отверстия для рук. Эксплуатируется в микробиологических лабораториях как вытяжной шкаф после подключения к вытяжной системе вентиляции с фильтрами тонкой очистки, установленными в вентиляционной камере вне микробиологического бокса. Возможность выброса зараженного воздуха из рабочего объема в рабочее помещение при работе с опущенной панелью и надетыми рукавами-перчатками маловероятна. Шкаф используется для микробиологических работ, постановки серологических реакций, заражения мелких лабораторных животных, выделения клеточных структур, центрифугирования в малых объемах,

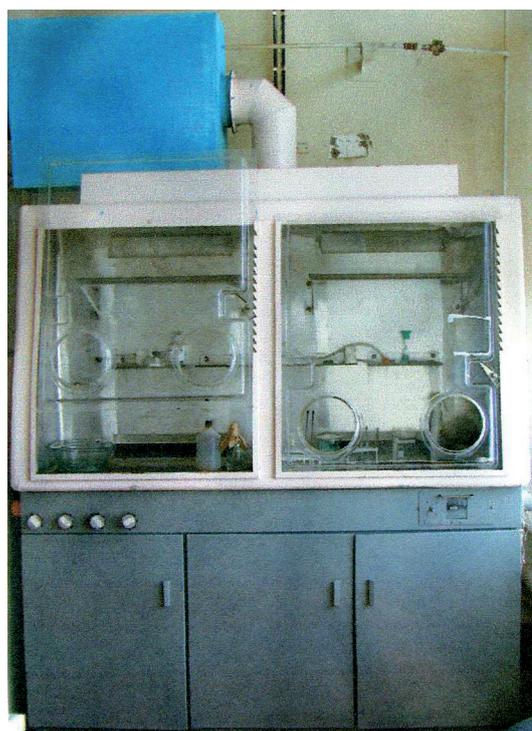


Рис. 1. Вытяжной шкаф типа ШНЖ

сублимационного высушивания культур микроорганизмов. К недостаткам можно отнести отсутствие контроля параметров потока воздуха и незащищенность предмета исследования.

Шкаф вытяжной рециркулярный ламинарный микробиологический (ШВРЛМ) разработан в СССР в 70-е годы XX века. Его уже можно считать прототипом современного бокса биологической безопасности. Шкаф рассчитан на одно рабочее место. Изготавливался из нержавеющей стали и относился к шкафам II класса безопасности. Передняя панель – стеклянная в металлическом обрамлении, поднимается откидыванием вверх. Имеется один плоский фильтр типа HEPA (High Efficiency Particulate Air filter – высокоэффективный фильтр очистки воздуха) над столешницей и два фильтра ФЭТО-750 (фильтр элемент тонкой очистки) из ткани Петрянова под столешницей. Воздушный поток направлен сверху вниз. Управление шкафом расположено вертикально сбоку справа на передней панели. Вентилятор располагается внизу, поэтому наблюдается устойчивый вертикальный поток воздуха в рабочей зоне. Надежность защиты персонала и продукта высокая. Может использоваться в рабочих помещениях как с отрицательным, так и с положительным давлением. Возможна эксплуатация шкафа со снятой передней панелью при условии работы персонала в полной защите. Использовался для рутинных микробиологических работ (посев ПБА на плотные питательные среды), постановки серологических реакций.

К недостаткам можно отнести отсутствие визуального контроля параметра входящего потока воздуха на рабочем месте, отсутствие приборного контроля сопротивления фильтров, невозможность регулирования режима в период непосредственно работы, рециркуляция воздушного потока, что делает нежелательным использование данной конструкции в лаборатории уровня BSL3 [6]. К отрицательным моментам также можно отнести работу персонала только в положении «стоя», используя в качестве защитной одежды противочумный костюм I типа. В настоящее время шкаф не выпускается.

Боксы биологической безопасности предназначены для того, чтобы защитить исследователя, лабораторное оборудование и рабочие материалы от воздействия инфекционных аэрозолей и брызг, которые могут возникнуть при работе с материалами, содержащими инфекционные агенты [5]. Бокс биологической безопасности предназначен для проведения диагностических и научно-исследовательских работ с микроорганизмами в лабораториях различного уровня опасности (BSL) от 1-го до 4-го и оборудованы элементами инженерных систем биологической безопасности.

Бокс перчаточный микробиологический на 1–2 рабочих места (4-БП-2М) относится к боксам III класса безопасности [3, 9] (рис. 2). Бокс разработан в СССР в 70-х годах XX века. Изготавливался из нержавеющей стали. Снабжался одной или двумя пе-

редаточными камерами (шлюзами), двумя фильтрами тонкой очистки ФТО-60 на притоке и вытяжке воздушного потока, двумя или четырьмя рукавами-перчатками. Режим работы надежен в любых условиях эксплуатации во всех лабораториях уровня BSL1–4. Имеет все элементы инженерного обеспечения (вентиляция с фильтрами тонкой очистки подаваемого и удаляемого воздуха, удаление жидких стоков с последующей обработкой, наличие ультрафиолетовых излучателей как в самом боксе, так и в передаточном шлюзе). Имеется визуальный контроль всех параметров (разрежение в боксе, направленность потоков). Персонал работает в положении «стоя» без дополнительной защитной одежды [7]. Бокс незаменим при проведении музейных работ с ПБА (вскрытие и засев ампул), манипуляций с мелкими лабораторными животными, выполнении генетических и молекулярных исследований. К недостаткам можно отнести высокое расположение смотровых стеклянных окон и громоздкость.

Кроме вытяжных шкафов и боксов отечественного производства для работы с ПБА используются боксы биологической безопасности, изготовленные различными зарубежными фирмами (рис. 3). Они изготавливаются по общему принципу, применяемому для боксов II или III класса биологической безопасности, и не имеют принципиальных отличий [3, 5, 9, 10, 11].

Боксы биологической безопасности, как уже было сказано, разработаны с целью защиты персонала лаборатории, окружающей среды и рабочих материалов от влияния инфекционных аэрозолей и попадания частиц, возникновения которых возможно при работе с материалами, содержащими инфекционные компоненты [4, 5]. Правильный выбор бокса биологической безопасности для лаборатории может быть чрезвычайно эффективным средством в предупреждении и предотвращении заражений персонала и



Рис. 2. Бокс биологической безопасности III класса 4-БП-2-М

перекрестных заражений культур за счет аэрозольных выделений.

Все боксы биологической безопасности рассчитаны на 1 рабочее место. Они сделаны из металла, имеют переднюю стеклянную панель гильотинного типа. Все управление и элементы контроля расположены на передней панели над стеклом горизонтально. Вентилятор расположен в нижней или верхней части бокса. Возможно присоединение биокабинета к вытяжной системе вентиляции.

Несомненным достоинством бокса биологической безопасности является автоматический контроль параметров входного воздуха. Воздушный поток направлен вертикально вниз. Возможна регулировка и поддержание параметров во время эксплуатации. Необходимо отметить простоту замены двух HEPA-фильтров, а также наличие звуковой сигнализации для контроля уровня поднятия передней панели. Используется для выполнения биохимических и серологических исследований, а также в качестве пересадочного бокса при работе с животными. Возможна установка более современных ULPA (Ultra Low Penetration Air – фильтр с крайне низким уровнем проникновения воздуха) фильтров, задерживающих частицы размером 0,12 мкм.

К недостаткам можно отнести некоторую сложность в техническом обслуживании, проведении наладки систем бокса, использовании в качестве дезинфектантов газообразных препаратов, для которых требуется полная герметизация бокса биологической безопасности и последующая дезактивация.

В последнее время на отечественном рынке появился ряд моделей боксов биологической безопасности, сделанных на отечественных фирмах.



Рис. 3. Бокс биологической безопасности II класса, тип В

Принципиально эти боксы не отличаются от боксов биологической безопасности, выпускаемых за рубежом. Они имеют достаточно низкую цену, поставка не требует таможенных процедур, комплектуются отечественными запасными частями.

Выбор соответствующих боксов биологической безопасности для работ с ПБА во многом зависит от тех задач, которые ставят перед собой исследователи, и нормативных документов, действующих в нашей стране [7, 8]. Это требует от службы эксплуатации знаний не только технического, но и биологического характера. Важная роль отводится службам биологического контроля, которые проверяют и контролируют исследовательские и диагностические работы в лаборатории, контаминацию рабочих поверхностей, выполнение дезинфекционных мероприятий, теоретические и практические знания исполнителей и обслуживающего персонала [5, 11, 14].

Эксплуатация различных боксирующих устройств в нашей организации показывает, что проведение работ с ПБА I–II групп патогенности и использование для этих целей боксов решает многие проблемы биологической безопасности.

Изоляция ПБА на рабочей поверхности столешницы бокса, направленность воздушных потоков в них, автоматическое поддержание и контроль параметров режимов их штатной работы в высокой степени обеспечивает защиту персонала от исследуемого материала (ПБА) и продукта от внешней среды при проведении экспериментальных и диагностических работ в микробиологических лабораториях различного уровня риска и опасности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Боровик Р.В., Дмитриев Г.А., Коломбет Л.В., Победимская Д.Д., Ремнев Ю.В., Тюрин Е.А. Основы биологической безопасности: принципы и практика. Учебно-методическое пособие. М.: «Медицина для вас»; 2008. 303 с.
2. Дроздов С. Г., Гарин Н. С., Джиндоян Л. С., Тарасенко В. М. Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях. М.: Медицина; 1987. 256 с.
3. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Биологическая безопасность. Термины и определения. Саратов: «Приволжское издательство»; 2006. 112 с.
4. Пальцев М.А., Гинцбург А.Л., Белушкина Н.Н. Биологическая безопасность. Глоссарий. М.: Издательский дом «Русский врач»; 2006. 448 с.
5. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях. 3 издание. Всемирная организация здравоохранения. Женева; 2004. 139 с.
6. Санитарные правила и нормы. «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности». СП 1.2.011-94. М.: Госсанэпиднадзор России; 1994. 149 с.
7. Санитарно-эпидемиологические правила. «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)». СП 1.3.1285-03. М.: Госсанэпиднадзор России; 2003. 82 с.
8. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». СП 1.3.2322-08. М.: Роспотребнадзор; 2008. 76 с.
9. Ставский Е.А., Черный Н.Б., Криницын Л.А., Едапин А.С., Нетесов С.В. Унифицированный бокс 3 класса биобезопасности для микробиологических и вирусологических исследований. В кн.: Проблемы биологической и экологической безопасности. Матер. междунар. науч. конф. Оболensk; 2000. С. 116.
10. Тюрин Е.А., Шишкина О.Б. К вопросу использования боксирующих устройств для работ с ПБА I–II групп патогенности в ФГУП ГНЦПМ. В кн.: Противочумные учреждения России и их роль в обеспечении эпидемиологического благополучия населения страны: Матер. конф., посв. 70-летию Противочум. центра. М.; 2004. С. 275–8.

11. Чекан Л.В., Тюрин Е.А. Шкафы биобезопасности – надежное средство профилактики внутрилабораторных заражений при работе с возбудителями ООИ. В кн.: Диагностика, лечение и профилактика опасных и особо опасных инфекционных заболеваний. Биотехнология: Матер. Всерос. конф., посв. 80-летию со дня основания ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России». Киров; 2008. С. 426–8.

12. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. U.S. Department of Health and Human services. 4-th Edition. Richmond J.Y., McKinney R.W., editors. Washington. 1999. 250 p.

13. Biological Safety: Principles and Practices. 4th ed. Fleming D.O., Hunt D.L., editors. Washington: ASM Press; 2006. 624 p.

14. Laboratory Biosafety Guidelines. 3rd ed. Canada; 2004. 113 p.

E.A.Tiurin, S.A.Ivanov, L.I.Marinin, I.A.Dyatlov, M.N.Lyapin

Biosafety Cabinets Used in the Work with Biological Agents of I–II Pathogenicity Groups

State Scientific Centre of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk; Russian Anti-Plague Research Institute “Microbe”, Saratov

At present, in compliance with sanitary and epidemiologic regulations in force, equipping of microbiological laboratory with modern engineering and technical systems and equipment is considered to be the important condition ensuring adherence with the biological safety requirements. The above-

mentioned systems and equipment, together with the rules and techniques of the safe work with pathogenic microorganisms, should provide the set of biological safety measures for the laboratory personnel. Biological safety cabinets of the second and the third classes serve as additional protection means. Considered are peculiarities of the design and benefits of different biosafety cabinets used in BSL 2–3 laboratories, and some of their shortcomings are determined.

Key words: Biological safety, exhaust hood, biological safety cabinet, biological safety levels.

Об авторах:

Тюрин Е.А., Иванов С.А., Маринин Л.И., Дятлов И.А. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Оболensk, Московская обл. E-mail: turin@obolensk.org

Ляпин М.Н. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Tiurin E.A., Ivanov S.A., Marinin L.I., Dyatlov I.A. State Scientific Centre of Applied Microbiology and Biotechnology. 142279, Obolensk, Moscow Region. E-mail: turin@obolensk.org

Lyapin M.N. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 08.10.09.

А.В.Гаева, Е.Г.Булгакова, М.Н.Киреев, Л.В.Анисимова, Л.А.Новичкова, В.В.Кутырев

**ВНУТРИВИДОВАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ
ОЧАГОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ШТАММОВ ЧУМНОГО МИКРОБА
МЕТОДОМ ВЫЧИТАЮЩЕГО РЕСТРИКЦИОННОГО ФИНГЕРПРИНТИНГА**

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

Проведено генетическое типирование штаммов чумного микроба методом вычитающего рестрикционного фингерпринтинга (ВРФ). Показана возможность внутривидовой дифференциации и определения очаговой принадлежности изученных штаммов чумного микроба. В некоторых очагах циркулируют штаммы с разными ВРФ профилями, что предполагает возможность использования данного метода генетического типирования при исследовании локальных вспышек.

Ключевые слова: возбудитель чумы, генетическое типирование, вычитающий рестрикционный фингерпринтинг, внутривидовые различия.

Генетическое типирование штаммов чумного микроба в настоящее время активно реализуется с привлечением различных подходов [2, 4, 5, 8]. Традиционные методы типирования чумного микроба характеризуются различной, не всегда удовлетворительной, разрешающей способностью [3, 9]. Поэтому актуален поиск оптимальных методов и выбор наиболее удачного сочетания методов, на основе которых будет создан банк молекулярных портретов, позволяющий получать индивидуальные генетические характеристики штаммов и максимально полную картину генетической variability возбудителя чумы. С помощью методов молекулярного типирования можно получить штамм-специфические характеристики микроорганизмов, которые при исследовании вспышек инфекционных заболеваний позволяют устанавливать различия между клонально родственными (эпидемическими) и не родственными (спорадическими) штаммами, реконструировать пути распространения инфекции, определять источник инфекции [11]. Вычитающий рестрикционный фингерпринтинг относится к методам, позволяющим проводить типирование на основе ДНК полного генома бактерий и сочетает в себе преимущества макрорестрикционного анализа и метода полиморфизма длин амплифицированных фрагментов (большое число разрешающих полос, высокая воспроизводимость). По данным V.Terletski *et al.* [12, 13], метод находит применение для распознавания изолятов и субклонов, дифференцирования близкородственных видов и подвидов бактерий. ВРФ успешно применен для исследования источников и распространения изолятов *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Agona* [7] и serovar *Derby* [6] в комплексной системе типирования, включающей определение плазмидного профиля, фаготипа, паттернов устойчивости к антибиотикам, *XbaI*- и *BlnI*-макрорестрикционных профилей. Показано, что разрешающая способность ВРФ сопоставима с таковой макрорестрикционного

анализа и зависит от выбора комбинации ферментов «детекции – вычитания» [10, 11, 13]. Высокие дискриминирующие свойства метода предполагают его перспективность для внутривидовой дифференциации штаммов чумного микроба.

Метод вычитающего рестрикционного фингерпринтинга основан на обработке геномной ДНК двумя ферментами рестрикции, последующим мечением концов фрагментов радиоактивными метками, избирательном захвате и удалении биотин меченных фрагментов ДНК стрептавидин-магнитными частицами (рис. 1).

«Детектирующий» фермент образует ТТАА концы, которые достраиваются дигоксигенин мечеными нуклеотидами для последующей детекции, в то время как «субтрактивный» («вычитающий») фермент образует GCGC концы, которые достраиваются биотинилированными нуклеотидами, что позволяет

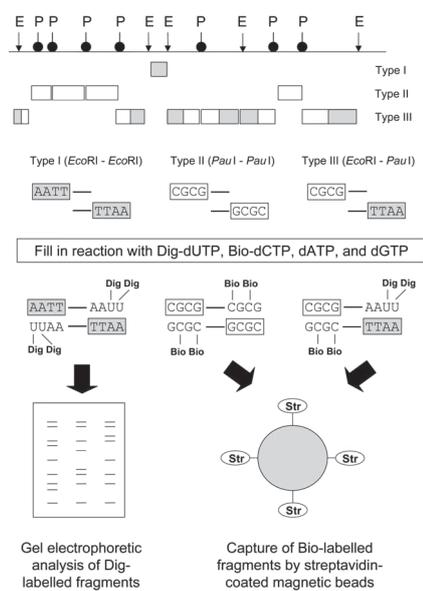


Рис. 1. Схема вычитающего рестрикционного фингерпринтинга (из статьи [11])

устранить данные фрагменты магнитными частицами со стрептавидином.

Обработка двумя рестриктазами, например, *EcoRI* (фермент детекции) и *Paul* (фермент вычитания) обеспечивает образование трех типов фрагментов, которые отличаются по их концам: фрагменты первого типа имеют только *EcoRI*-концы, фрагменты второго типа – *Paul*-концы, а фрагменты третьего типа несут с одного конца *Paul*-участок, с другого – *EcoRI*-участок. Следующий этап – заполнение «липких» концов полученных фрагментов ДНК. В образец добавляют смесь нуклеотидов рекомендованного состава и фермент Кленова. Фрагменты типа 2 и 3, имеющие, по крайней мере, один конец с последовательностью GCGC, включают биотинилированные dCTP и впоследствии удаляются связыванием со стрептавидиновыми магнитными частицами. Во фрагментах 1 типа оба конца помечены дигоксигенином. Эти фрагменты остаются в супернатанте после этапа связывания с магнитными частицами, далее разделяются электрофорезом в агарозном геле, и, после переноса на нейлоновую мембрану, детектируются иммунохимически анти-дигоксигениновыми антителами, конъюгированными со щелочной фосфатазой [11, 12].

Цель настоящей работы – выявление полиморфизма геномов штаммов чумного микроба разного происхождения методом вычитающего рестрикционного фингерпринтинга и получение их молекулярных портретов.

Материалы и методы

В работе использован 101 штамм *Yersinia pestis* разных подвидов, изолированных из природных очагов России и ближнего зарубежья. Штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб». Бактерии выращивали в течение 18 ч на агаре LB (pH 7,2) при 28 °С. Выделение ДНК проводили лизоцим-фенольным методом для грамотрицательных бактерий.

Обработку рестриктазами проводили согласно протоколу, представленному в статье [12]. Реакцию заполнения липких концов полученных фрагментов ДНК проводили добавлением фермента Кленова (0,4 ед.) и 2 µl смеси dNTP (40 µM dATP, 40 µM dGTP, 2 µM Dig-dUTP, 2 µM Bio-dCTP) при комнатной температуре в течение 10 мин. Не включившиеся нуклеотиды удаляли на колонках, заполненных Sephadex G-50 как описано [1]. Этап вычитания фрагментов рестрикции проводили с использованием стрептавидиновых магнитных частиц («Roche», Германия). Подготовка магнитных частиц, условия инкубирования реакционной смеси осуществляли согласно протоколу в статье [12]. После инкубирования микропробирки помещали в магнитную подставку («Amersham», Великобритания), отбирали супернатант. Далее образцы очищали от избытка солей на колонках, заполненных Sephadex G-50 и доводили до

объема 10 µl в аппарате для лиофилизации («Alpha I-5», ФРГ).

Образцы разделяли электрофорезом в пластинах 1,2 % агарозного геля, в качестве маркеров молекулярного веса использовали ДНК фага λ, обработанную ферментами *EcoRI* - *HindIII*. После электрофореза гель обрабатывали денатурирующим щелочным раствором, содержащим 1 M NaCl и 0,5 M NaOH и затем нейтрализовали раствором 1M NaCl и 0,5 M ТрисHCl до pH 7,5 в течение 30–40 мин.

Перенос фрагментов ДНК на нейлоновую мембрану Hybond N⁺ («Amersham», Великобритания) в течение 1 ч осуществляли с использованием 10x буфера SSC в приборе «Transvac» («Hoefel», США).

Детекцию дигоксигенин-меченных фрагментов на мембране проводили коммерческим набором DIG DNA Labeling and Detection Kit («Roche», Германия) согласно протоколу. Полученные изображения сканировали, сохраняли в формате TIFF.

Результаты и обсуждение

Нами изучена возможность генетического типирования штаммов чумного микроба методом вычитающего рестрикционного фингерпринтинга, позволяющим выявлять полиморфизм длины рестрикционных фрагментов полного генома бактерий.

Поскольку число фрагментов, оставшихся для электрофоретического разделения в геле, зависит от частоты расщепления ферментов детекции и вычитания, необходимо выбрать комбинацию ферментов рестрикции, которая потенциально пригодна для ВРФ типирования чумного микроба.

На первом этапе проведен поиск комбинации ферментов детекции и вычитания, дающей высокий индекс различия для штаммов чумного и псевдотуберкулезного микробов. Ферментом детекции была выбрана эндонуклеаза *EcoRI* по рекомендации авторов метода [11]. Определение количества сайтов узнавания для ферментов вычитания проводили на известных нуклеотидных последовательностях геномов штаммов чумного микроба биовара *orientalis* (CO92, AL 590842), биовара *medievalis* (KIM, AE 009952) и псевдотуберкулезного микроба IP32953 (NC_006155) (база данных NCBI GenBank). Для этого в программе Gene Runner выбрана функция Analysis/Nucleic acid/Restriction sites. Из представленного списка эндонуклеаз отобраны те, которые образовывали липкие концы из четырех нуклеотидов состава G/C. Всего было изучено 26 ферментов вычитания с различной частотой расщепления геномной ДНК чумного микроба. Теоретически близкое и приемлемое для разделения и анализа в агарозном геле количество фрагментов (от 30 до 50) дают комбинации ферментов *EcoRI* - *Cfr10I*, *EcoRI* - *Paul*, *EcoRI* - *MluI*, *EcoRI* - *Eco52I*, *EcoRI* - *Kpn2I*. Эти пары ферментов тестировали на 6 референтных штаммах чумного микроба: И3205 (основной подвид), 1146 (кавказский подвид), А1633 (гиссарский подвид), И2359 (алтайский под-

вид), И3069 (улегейский подвид), А1814 (таласская группа). Со всеми парами ферментов выявлены внутривидовые различия в количестве и расположении детектируемых полос. Однако при действии пары эндонуклеаз рестрикции *EcoRI* - *Cfr10I* наблюдали большое количество близко расположенных полос в треках, что затрудняло учет результатов, использование комбинации *EcoRI* - *Kpn2I* выявило незначительные различия между штаммами и также отмечалось большое количество фрагментов.

Для типирования расширенной выборки штаммов использовали комбинацию ферментов *EcoRI* - *PauI*, поскольку с данной парой рестриктаз получали оптимальную картину профилей. Анализировали четко дифференцируемые полосы в диапазоне 2000–400 п.н. Полученные картины фингерпринтов распределения фрагментов ДНК представлены в виде схемы (рис. 2, 3).

На следующем этапе исследования было проведено генетическое типирование 9 штаммов основного подвида (*Y. pestis ssp. pestis*) выделенных из 9 природных очагов (по одному штамму из очага): Аксайского высокогорного (231(708)), Забайкальского степного (И1270), Тувинского горного (И3205), Джейранчельского равнинно-предгорного (КМ872(С527)), Прикаспийского песчаного (С528), Центрально-Кавказского высокогорного (С631), Волго-Уральского песчаного (М956), Приаральско-Каракумского пустынного (А1763), Хэнтэйского аймака Монголии (И3102). Штаммы основного подвида образовали группу из девяти геновариантов, причем каждый геновариант соответствовал отдельному природному очагу (рис. 2). Различия ВРФ профилей штаммов основного подвида отмечаются в диапазоне 700–1300 п.н. Так, у штамма из Тувинского горного очага присутствовали два фрагмента размером 700 и 1100 п.н. (рис. 2, дорожка 3). ВРФ профиль штамма из Центрально-Кавказского высокогорного очага содержал фрагменты размером 1000 и 1200 п.н. и не обнаружил фрагмента 1300 п.н. (рис. 2, дорожка 4). Штамм из Аксайского высокогорного очага характеризовался наличием большего числа фрагментов в области 1000–1200 п.н. (рис. 2, дорожка 1). Штамм КМ872 из Джейранчельского равнинно-предгорного очага оказался близок к штаммам кавказского подвида по характеру распределения фрагментов в области 1400–1300 п.н. (рис. 2, дорожка 5, рис. 3, К). ВРФ профили штаммов Прикаспийского песчаного, Волго-Уральского песчаного и Приаральско-Каракумского пустынного очагов отличались незначительно (наличием/отсутствием фрагмента размером около 1000 и 500 п.н.) (рис. 2, дорожки 6, 7, 8). Штаммы из Монголии (рис. 2, дорожка 2) и Забайкальского степного очага (рис. 2, дорожка 9) различались ВРФ профилями в области 700–900 п.н. Штаммы алтайского подвида образовали два типа ВРФ-профилей: один геновариант включал штаммы из Алтайского горного очага (2183, 2817, И2998, И2359, И3000), второй геновариант – штамм из Монголии (И3086) – отлич-

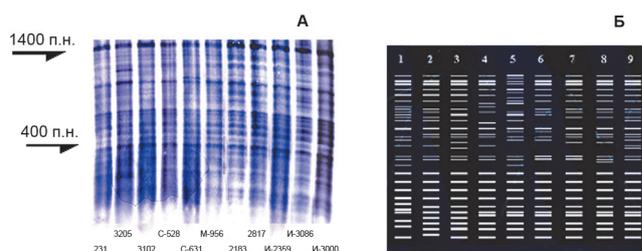


Рис. 2. ВРФ профили штаммов чумного микроба основного и алтайского подвида (А) и схема ВРФ паттернов штаммов основного подвида из разных природных очагов (Б):

1 – 231(708) (Аксайский), 2 – И3102 (Монголия), 3 – И3205 (Тувинский), 4 – КМ921(С631) (Центрально-Кавказский), 5 – КМ872 (С527) (Джейранчель), 6 – КМ873(С528) (Прикаспийский песчаный), 7 – М956 (Волго-Уральский песчаный), 8 – А1763 (Приаральско-Каракумский), 9 – И1270 (Забайкальский)

чался наличием дополнительного фрагмента около 850 п.н. (рис. 3, А). Геновариант штаммов улегейского подвида из аймака Убурхангай (И3068, И3069) отличался от геноварианта штаммов того же подвида из Южно-Гобийского аймака (И3130, И3071) отсутствием фрагмента 1300 п.н. (рис. 3, У). Штаммы кавказского подвида отличаются ВРФ профилем от штаммов остальных подвида иной картиной распределения фрагментов в области 1300–1600 п.н., при этом штамм из Зангезуро-Карабахского горного очага (1146) отличался ВРФ профилем от штамма из Приараксинского низкогорного очага (818) наличием фрагмента около 950 п.н. (рис. 3, К). Штаммы гиссарского подвида (6 штаммов) и таласские штаммы (3 штамма) показали мономорфность ВРФ – профилей и образуют по одному геноварианту (рис. 3, Г, Т).

Выявленные различия в геновариантах основного и кавказского подвида из разных природных очагов послужили основанием для исследования расширенной выборки штаммов, циркулирующих в разных природных очагах с целью изучения распространения в них ВРФ профилей. Штаммы основного подвида выбраны из очагов разных типов: пустынного (Мангышлакский, Муянкумский, Северо-Приаральский, Приаральско-Каракумский), равнинно-предгорного (Терско-Сунженский), высокогорного и горного (Верхненарынский, Сарыджазский, Аксайский, Алайский, Тувинский),

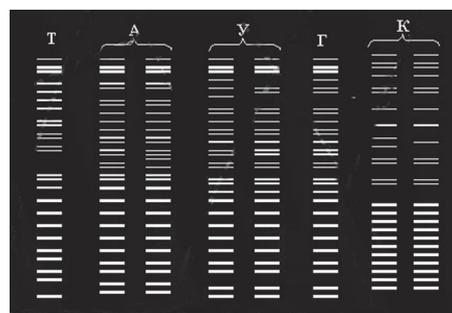


Рис. 3. Схема ВРФ паттернов штаммов чумного микроба неосновных подвида:

Т – группа таласских штаммов, А – алтайский подвид, У – улегейский подвид, Г – гиссарский подвид, К – кавказский подвид

степного (Прикаспийский песчаный). В выборку были включены штаммы кавказского подвида из Присеванского горного, Ленинанканского горного, Зангезуро-Карабахского горного очагов. При изучении распределения геновариантов нами определены вариации ВРФ профилей штаммов чумного микроба. Так, штаммы основного подвида, выделенные из различных природных очагов (Джейранчельский равнинно-предгорный, Тувинский горный, Сарыджазский высокогорный, Муонкумский пустынный, Прикаспийский песчаный), обнаружили различные геноварианты, соответствующие отдельно природному очагу. Штаммы Верхненарынского, Аксайского и Алайского очагов не различались и представляют отдельный геновариант. При генотипировании 6 штаммов из Терско-Сунженского очага нами выявлено два геноварианта: выделенные в 1970 г. штаммы от блох малого суслика (относятся к основному подвиду) отличались наличием фрагментов в областях 1300–1000 п.н. и 500–800 п.н. и отсутствием фрагмента 800 п.н. от штаммов, выделенных в 1979 г. от обыкновенной полевки (относятся к кавказскому подвиду). Дифференцировались по ВРФ профилю и штаммы кавказского подвида из Присеванского, Ленинанканского, Зангезуро-Карабахского горных очагов. В некоторых пустынных очагах выявлена гетерогенность ВРФ профилей: из четырех штаммов Приаральско-Каракумского очага два штамма (4635, 1252) были идентичны по генотипу, а два других (550, А1763) составили отдельные ВРФ профили, в Мангышлакском очаге штамм М489 отличался от остальных из данного очага по двум дополнительным фрагментам размерами около 900 п.н. и 800 п.н., в Северо-Приаральском очаге штамм 617 не имел фрагмента 1300 п.н. Таким образом, у штаммов Северо-Приаральского, Мангышлакского очагов выявлено по 2 геноварианта, а штаммов Приаральско-Каракумского очага – 3 геноварианта.

В результате проведенной работы показано, что каждому подвиду чумного микроба соответствуют строго определенные ВРФ профили. Более того, в большинстве случаев по ВРФ профилю можно установить очаговую принадлежность штамма. Приведенные результаты на молекулярно-генетическом уровне подтверждают справедливость деления штаммов чумного микроба на подвиды и показывают неоднородность подвидов, коррелирующую с очаговой принадлежностью. Необходимо отметить, что тестирование других комбинаций ферментов «детекции-вычитания» позволит повысить разрешающую способность метода и обеспечит получение молекулярных портретов штаммов из всех природных очагов и мезоочагов, что повысит эффективность эпидемиологического мониторинга при установлении источника распространения инфекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир; 1984. 479 с.
2. Guiyoule A., Grimont F., Itean L., Grimont P. A., Lefevre M., Carniel E. Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis* strains. J. Clin Microbiol. 1994; 32:634–41.
3. Huang X-Z., Chu M., Engelthaler D., Lindler L. Genotyping of a homogeneous group of *Yersinia pestis* strains isolated in the United States. J. Clin. Microbiol. 2002; 40(4):1164–73.
4. Kingston J., Tuteja U., Kapil M., Murali H. S., Batra H. V. Genotyping of Indian *Yersinia pestis* strains by MLVA and repetitive DNA sequence based PCRs. Antonie van Leeuwenhoek. 2009; DOI 10.1007/s10482-009-9347-2.
5. Li Y., Dai E., Cui Y., Li M., Zhang Y., Wu M. et al. Different region analysis for genotyping *Yersinia pestis* isolates from China. PLoS ONE. 2008; 3(5):e2166.
6. Michael G., Cardoso M., Rabsch W., Schwarz S. Phenotypic and genotypic differentiation of porcine *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Derby isolates. J. Vet. Microbiol. 2006; 118:312–8.
7. Michael G., Cardoso M., Schwarz S. Molecular analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Agona isolated from slaughter pigs. J. Vet. Microbiol. 2006; 112:43–52.
8. Pourcel C., Andre-Mazeaud F., Neubauer H., Ramiere F., Vergnaud G. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. BMC Microbiol. 2004; 4:22.
9. Revazishvili T., Rajanna C., Bacanidze L., Tsertsvadze N., Imnadze P., O'Connell K. Characterization of *Yersinia pestis* isolates from natural foci of plague in the Republic of Georgia and their relationship to *Y. pestis* isolates from other countries. J. Clin. Microbiol. Infect. 2008; 14(5):429–36.
10. San Millán R., Garaizar J., Bikandi J. In silico simulation of fingerprinting techniques based on double endonuclease digestion of genomic DNA. In Silico Biology. 2005; 5(3):341–6.
11. Terletski V., Michael G.B., Schwartz S. Subtracted restriction fingerprinting – a new typing technique using magnetic capture of tagged restriction fragments. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2004; 41:1–8.
12. Terletski V., Schwartz S., Carnwath J. Subtracted restriction fingerprinting – a tool for bacterial genome typing. BioTechniques. 2003; 34:304–13.
13. Terletski V., Schwarz S., Carnwath J., Niemann H. Typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars *Choleraesuis*, *Typhimurium*, Dublin and laboratory strains of *Escherichia coli* using subtracted restriction fingerprinting (SRF) Microbiol. Res. 2003; 158:135–42.

A.V.Gaeva, E.G.Bulgakova, M.N.Kireev, L.V.Anisimova, L.A.Novichkova, V.V.Kutyrev

Intra-Species Differentiation and Determination of the Focal Belonging of Plague Microbe Strains Using Subtracted Restriction Fingerprinting

Russian Anti-Plague Research Institute «Microbe», Saratov

Plague microbe strains were typed using subtracted restriction fingerprinting (SRF). Intra-species differentiation and determination of the focal belonging of the studied plague microbe strains was demonstrated. Strains with different SRF patterns circulate in some foci suggesting the possibility to use this genetic typing method for local outbreaks investigation.

Key words: plague agent, subtracted restriction fingerprinting, intra-species diversity.

Об авторах:

Гаева А.В., Булгакова Е.Г., Киреев М.Н., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Gaeva A.V., Bulgakova E.G., Kireev M.N., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe». 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Получена 10.09.10.

А.В.Иванова¹, Е.И.Казачинская¹, А.В.Качко¹, Е.Л.Субботина¹, А.В.Сорокин¹, И.А.Разумов¹,
С.В.Нетёсов², В.Б.Локтев¹

ПОЛУЧЕНИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ VP40 И NP ФИЛОВИРУСОВ

¹ФГУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово;
²ГОУ ВПО Новосибирский Государственный университет

Получены генетические конструкции, несущие полноразмерные гены матриксных белков VP40 вируса Эбола (ВЭ) и вируса Марбург (ВМ), а также нуклеопротеина (NP) ВЭ. Экспрессия этих генов в прокариотической системе *Escherichia coli* с последующей аффинной очисткой на Ni-NTA агарозе обеспечивала получение полноразмерных рекомбинантных белков VP40 и NP филовирусов. Исследование иммунологических свойств аффинно-очищенных полноразмерных белков показало, что они сохранили антигенные свойства, присущие нативным белкам филовирусов. Это делает перспективными их использование для совершенствования иммунодиагностики и конструирования экспериментальных вакцин против филовирусных инфекций.

Ключевые слова: вирус Марбург (ВМ), вирус Эбола (ВЭ), рекомбинантные белки.

Семейство *Filoviridae* включает в себя два рода: *Marburgvirus* и *Ebolavirus* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>). К роду *Ebolavirus* относятся четыре вида вирусов: *Zaire ebolavirus*, *Sudan ebolavirus*, *Reston ebolavirus*, *Ivory Coast ebolavirus* и, возможно, недавно описанный *Bundibugyo ebolavirus* [10, 12]. Род *Marburgvirus*, второй представитель семейства, включает в себя единственный вид *Lake Victoria marburgvirus*. Геном филовирусов представлен линейной одноцепочечной РНК негативной полярности, 18959 нуклеотидов для ВЭ и 19112 нуклеотидов для ВМ. Вирионы филовирусов имеют характерную сложную структуру, сформированную белками NP, VP30, VP40, VP35, L-белок, РНК-зависимая РНК-полимераза, – нуклеокапсид, и вирусная частица покрыта наружной липидной оболочкой, в которой локализуется 2 структурных белка (VP24 и гликопротеин (GP)) [9]. Филовирусы способны вызывать геморрагические лихорадки у человека с крайне тяжелым течением заболевания и высоким уровнем летальности (до 90 %) [22].

NP ВЭ кодируется геном 1, расположенным на 3'-конце генома [16] и является одним из трех мажорных компонентов нуклеокапсиды (NP – 27 %, белок VP40 – 37,7 %, белок VP35 – 24,5 % от общей массы вириона) [9]. Белок NP обладает способностью к самосборке и формированию спиральных структур, которые, однако, не идентичны вирусным нуклеокапсидам. NP подвергается посттрансляционным модификациям, включающим фосфорилирование и O-гликозилирование [10]. Показано его участие в репликации вирусного генома совместно с белками L и VP35 [16]. Филогенетический анализ известных нуклеотидных последовательностей гена NP показывает его эволюционный консерватизм [14]. Белок NP ВЭ является хорошим иммуногеном и основные иммуногенные детерминанты белка NP расположены в пределах 110 С-концевых аминокислотных остатков NP белка [19]. Кроме того, показано, что С-конец белка NP играет важную роль в формировании ви-

русного нуклеокапсида [15].

Белок VP40 филовирусов является основным компонентом матрикса вирионов и способен самостоятельно формировать вирусоподобные частицы [15]. Гидрофобные и положительно заряженные аминокислотные остатки С-концевого района VP40, по-видимому, важны для сборки вирусных частиц. N-концевая область VP40 обеспечивает взаимодействие с мембранами посредством содержащегося в нем кластера положительно заряженных аминокислот [18]. Структурные белки NP и VP40 индуцируют выработку протективных антител. Экспериментальная бивакцина на основе аденовирусного вектора, несущего гены белков ВМ и ВЭ, обеспечивает полную защиту обезьян от летальной инфекции. [21]. В природных очагах распространения филовирусов также регистрируется наличие специфических антител к этим белкам у обезьян и переболевших людей [7].

Белки VP40 и NP также были использованы для конструирования эффективных иммуноферментных тест-систем [11, 13] и исследования особенностей репликации филовирусов в клетках [17].

Ранее нами были исследованы некоторые иммунохимические свойства белков VP35 ВМ, ВЭ и NP ВМ. В данной работе мы описываем получение полноразмерных рекомбинантных белков NP, VP40 ВЭ и VP40 ВМ, а также их иммунохимические свойства.

Материалы и методы

Вирусная РНК. Вирусная РНК была изолирована из инактивированных препаратов ВЭ, вид Заир (штамм Mainga) и ВМ (штамм Popo), которые были получены, как описано ранее [5, 2]. Фрагменты генома ВЭ, кодирующие белки VP40 и NP, получили методом ОТ-ПЦР с использованием следующих праймеров:

для VP40:

5' – AAAAGGATCCATGAGGCGGGTTATATTGCCTAC – 3'

5' – AAAAAAGCTTTACTTCTCAATCACAGCTGGAA – 3'

для NP:

5' – AAAAGGATCCATGGATTCTCGTCCTCAGAAAATCTGG – 3'

5' – AAAAAAGCTTTCACGTGATGATGTTGCAGGATTG – 3'

Полноразмерные ДНК-копии генов VP40 и NP ВЭ после гидролиза эндонуклеазами *VamHI* и *HindIII* клонировали в составе вектора pQE-30 (QIAGEN). Подлинность полученных гибридных плазмид pQE30-VP40 и pQE30-NP проверяли рестриктивным анализом и секвенированием. Для сборки полноразмерной ДНК-копии гена белка VP40 ВМ использовали плазмиду pMBG 4-48 из библиотеки клонов *E. coli* (штамм JC5183), несущих рекомбинантные плазмиды со вставками ДНК-копий фрагментов геномной РНК ВМ [8]. Для создания прокариотической системы экспрессии гена VP40 ВМ использовалась векторная плаزمид pQE-31(QIAGEN).

Экспрессия и очистка рекомбинантных белков. Штамм *E. coli* JM 103, трансформированный плазмидной ДНК pQE30-VP40, pQE30-NP и pQE31-VP40, культивировали в 100 мл жидкой питательной среды LB с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) при 37 °С и перемешивании с частотой 160 об/мин. Индукцию синтеза рекомбинантных белков проводили добавлением изопропил-*D*-тиогалактозида (ИПТГ) и инкубированием в течение 4 ч при 30 °С до конечной концентрации 0,2 мМ. Очистку рекомбинантных белков проводили аффинной хроматографией на Ni-хелатной смоле согласно протоколу фирмы-производителя («QIAGEN», Германия). Электрофорез белков проводили по методу Лэммли в 10 % (для NP) и 15 % (для VP40) полиакриламидном геле. Концентрацию белка измеряли при помощи набора Protein Assay («Bio-Rad», США) в соответствии с рекомендациями производителя на спектрофотометре UVmini 1240 («Shimadzu», Япония) при длине волны 495 нм и оценивали по лабораторной калибровочной кривой, построенной для очищенных IgG крысы.

В работе использовали препараты эндонуклеаз рестрикции и ферментов модификации производства ТОО «СибЭнзим» (Новосибирск, Россия). Секвенирование плазмид проводили по методу, описанному в работе [20] на автоматическом секвенаторе ДНК Beckman CEQ2000XL (Beckman Coulter, США) согласно инструкции фирмы-производителя, маркеры молекулярных масс белков («Sigma», США).

Моноклональные антитела (МКА) и поликлональные сыворотки. В работе были использованы специфические гибридомные МКА к ВЭ и ВМ, полученные, как описано ранее [3]. Для очистки МКА из асцитических жидкостей мышей BALB/c использовали каприловую кислоту с последующим осаждением IgG в 50 % растворе сульфата аммония (рН 7,0). Концентрацию очищенных МКА определяли, как описано выше.

Препарат лошадиных иммуноглобулинов (против инфекционного ВЭ) (IgG-лошадь-ВЭ), очищенных из гипериммунных сывороток методом спиртового фракционирования на холоду по Кону, был получен из ВЦ НИИМ МО РФ (Сергиев Посад) [1]. Поликлональные мышинные и крысиные антисыворотки к ВЭ получены, как описано ранее [3]. Получение антисыворотки кро-

лика против ВЭ описано в работе [6]. Моносыыворотки к рекомбинантным белкам получали в результате 4-кратной внутрибрюшинной иммунизации мышей ICR с интервалом в 1 неделю. При первой иммунизации с полным, при второй – с неполным адьювантом Фрейнда в 0,9 % растворе натрия хлорида в соотношении 1:1 и без адьюванта при последующих иммунизациях (в общей концентрации рекомбинантных белков 100 мкг/мышь в объеме 0,5 мл).

В качестве референс-сыворотки против ВМ использовали сыворотку человека, переболевшего лихорадкой Марбург [4]. Мышиные и кроличьи антисыворотки против ВМ (АС-ВМ) получали, как описано ранее [3]. Коммерческий препарат лошадиных иммуноглобулинов против инфекционного ВМ (IgG-лошадь-ВМ), очищенных из гипериммунных сывороток методом спиртового фракционирования на холоду по Кону, был получен из ВЦ НИИМ МО РФ (Сергиев Посад).

Твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА). Для проведения непрямого ТИФА в качестве антигена использовали инактивированные препараты ВЭ и ВМ, полученные, как описано в [2, 5]. В каждую лунку полистироловых планшетов (ВНИИ Медполимер, Москва, «Costar», США) вносили антиген в концентрации 1000 нг/мл в объеме 100 мкл (антиген ВМ в карбонат-бикарбонатном буфере с рН 9,0; антиген ВЭ в 0,05 М двузамещенном Na-фосфатном буфере с рН 8,0; рекомбинантные филовиральные белки в растворе 4 М мочевины в 0,05 М двузамещенном Na-фосфатном буфере с рН 8,0) и выдерживали при 22 °С в течение 18 ч или 1 ч при 37 °С. Места для неспецифического связывания антител на планшетах насыщали 0,5 % раствором казеина в течение 30 мин при 37 °С в ТСБ-Т буфере (трис-солевой буфер с твином), содержащем 0,15 М NaCl; 0,02М трис-НСl рН 7,4; 0,05 % твин-20. Затем раствор казеина удаляли и инкубировали антиген с МКА или специфическими в течение 1 ч при 37 °С или 18 ч при 4 °С. После трехкратной отмывки ТСБ-Т буфером в лунки добавляли по 100 мкл пероксидазного конъюгата антивидовых антител. Инкубировали 1 ч при 37 °С. После трехкратной отмывки лунок ТСБ-Т буфером, проявляли специфическое связывание антител с антивидовыми антителами раствором О-фенилендиамина (1 мг/мл орто-фенилендиамина, 0,03 % перекиси водорода) в цитратно-фосфатном буфере (0,2 М лимонной кислоты, 0,5 М Na₂HPO₄, рН 5,0). Выдерживали планшеты 30 мин в темноте, останавливали реакцию добавлением 100 мкл на лунку 1 N HCl и измеряли оптическую плотность (ОП) образцов на спектрофотометре («Uniscan», Финляндия) при длине волны 492 нм. Положительным считали результат измерения ОП, превышающий в 2 раза таковой для лунки с отрицательным контролем. Для отрицательного контроля связывания антител с антигеном использовали нормальные сыворотки или очищенные иммуноглобулины человека, лошади, мыши, крысы и кролика, а также МКА, специфичные к гетерологичным антигенам.

Электрофорез и иммуноблоттинг. Электрофорез белков проводили по методу, описанному в ра-

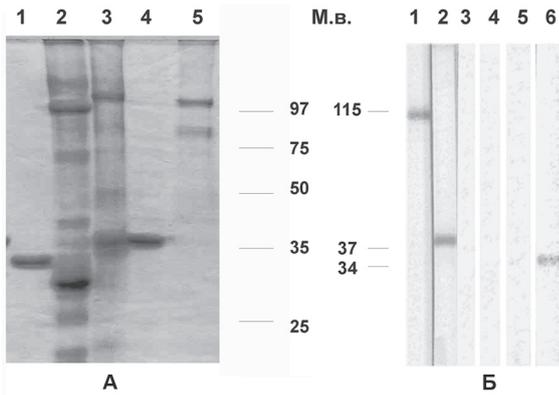


Рис. 2. А. Электрофореграмма вирионных белков и очищенных рекомбинантных белков филовирусов. Б. Иммуноблот. Взаимодействие филовирусных вирусных белков с антителами моносывороток, специфичными к рекомбинантным белкам:

А: 1 – рекомбинантный белок VP40 BM (5 мкл); 2 – препарат инактивированного ВМ (10 мкл); 3 – препарат инактивированного ВЭ (10 мкл); 4 – рекомбинантный белок VP40 ВЭ (5 мкл); 5 – рекомбинантный NP ВЭ (5 мкл). Б: 1 – ВЭ обработан антисывороткой к рекомбинантному белку NP ВЭ; 2 – ВЭ обработан антисывороткой к рекомбинантному белку VP40 ВЭ; 3 – лизат рQE обработан антисывороткой к рекомбинантному белку NP ВЭ (отрицательный контроль); 4 – лизат рQE обработан антисывороткой к рекомбинантному белку VP40 ВЭ (отрицательный контроль); 5 – лизат рQE обработан антисывороткой к рекомбинантному белку VP40 BM (отрицательный контроль)

вал рекомбинантный полипептид с расчетной молекулярной массой около 37 кДа. Электрофоретическая подвижность этого рекомбинантного полипептида по результатам электрофореза в 12 % ПААГ соответствовала расчетным данным (рис. 2, А).

Иммунохимическая характеристика полно-размерных рекомбинантных белков VP40, NP ВЭ и VP40 BM. Антигенные и иммуногенные свойства

рекомбинантных белков, полученных в экспрессионной системе *E. coli*, исследовали методами иммуноблоттинга и ТИФА. Данные иммуноблоттинга (рис. 2, Б) показывают, что антитела моносывороток, специфичные к рекомбинантным белкам, выявляют соответствующие им белки-аналоги в инактивированных вирусных препаратах. Это свидетельствует о подобии конформационно-независимых эпитопов на рекомбинантных и природных белках VP40, NP ВЭ и VP40 BM.

Исследование рекомбинантных белков VP40 и NP ВЭ было проведено с помощью панели противовирусных поликлональных и моноклональных антител методом ТИФА (таблица). Эти рекомбинантные белки эффективно взаимодействовали с антителами, специфичными к инактивированному ВЭ (гибридомными МКА, антителами сывороток иммунизированных мышей, кроликов) и IgG-лошадь-ВЭ. Кроме того, было показано, что специфические антитела не выявили антигенного перекреста между рекомбинантными белками, как это было обнаружено при использовании инактивированных вирусных препаратов в качестве антигенов в ТИФА.

Ранее, нами методом иммуноблоттинга было выявлено, что в сыворотке человека, переболевшего лихорадкой Марбург, в основном преобладают антитела против белков NP, VP40 и VP35 [3]. В данной работе показано, что рекомбинантный белок VP40 BM эффективно взаимодействует в ТИФА с антителами сывороток мышей и кроликов, иммунизированных инактивированным ВМ, с гибридными МКА, специфичными к белку VP40 инактивированного ВМ; антителами переболевшего лихорадкой Марбург человека и IgG-лошадь-ВМ (таблица).

Анализ специфичности рекомбинантных белков филовирусов

Антитела	Иммуноген	Концентрация белка, мг/мл	Белки-мишени в иммуноблоте	Титр антител (обратные величины)					
				ВЭ	VP40 ВЭ	NP ВЭ	ВМ	VP40 ВМ	pQE
IgG лошади	ВЭ	90	NP*, VP40*, VP35*	656100	656100	656100	24300**	<100	<100
АС кролика	ВЭ	90	NP*, VP40*, VP35*, VP30, VP24	218700	218700	656100	2700**	<100	<100
АС мыши	ВЭ	90	NP*, VP40*, P35*, VP30, VP24	218700	218700	218700	2700**	<100	<100
АС мыши	VP40-ВЭ	90	VP40	656100	1968300	<100	<100	<100	<100
АС мыши	NP-ВЭ	90	NP	656100	<100	1968300	<100	<100	<100
МКА 1Е5	ВЭ	6,3	NP	218700	<100	243000	<100	<100	<100
МКА 1В5	ВЭ	5,7	VP40	72900	656100	<100	<100	<100	<100
АСчеловека	ВМ	50	NP*, VP35*, P40*, VP30, VP24, GP	900**	<100	<100	24300	8100	<100
IgG лошади	ВМ	90	GP, NP*, VP35*, VP40*, VP30	2700**	<100	<100	218700	72900	<100
АС кролика	ВМ	18,5	NP*, VP35*, VP24, VP40*, VP30,	<100	<100	<100	24300	24300	<100
АС мыши	ВМ	50	NP*, VP35*, P40*, VP30, VP24, GP	300**	<100	<100	24300	24300	<100
АС мыши	VP40 ВМ	14	VP40	<100	<100	<100	72900	1968300	<100
МКА 7Н10	ВМ	8	VP40	<100	<100	<100	729000	729000	<100
Отрицательный контроль				<100	<100	<100	<100	<100	<100

Примечания: Концентрация антигенов 100 нг/лунка; АС – антисыворотки животных, иммунизированных инактивированными вирусными препаратами; АС-человека – сыворотка переболевшего лихорадкой Марбург [7], мг/мл – концентрация препаратов МКА, очищенных из 1 мл асцитной жидкости; * – мажорные полосы, выявляемые в вирусном препарате методом иммуноблоттинга; ** – перекрестное взаимодействие поликлональных антител с гетерологичными вирусными препаратами: [pQE] – клеточный лизат *E. coli* – JM103 (отрицательный контроль для рекомбинантных белков). Проводили обработку (истощение) исследуемых моноспецифических сывороток, специфичных к рекомбинантным белкам, в присутствии 1 % раствора лизата *E. coli* клеток 20 минут при 37 °С; в качестве отрицательного контроля использовали нормальные сыворотки человека (5 сывороток), лошади (1 сыворотка), мыши (5 сывороток). IgG лошади очищены методом спиртового фракционирования на холоду по Кону. МКА, АС кролика-ВМ и АС мыши к рекомбинантному белку VP40 ВМ очищены каприловой кислотой.

Таким образом, полученные нами в экспрессионной системе *E. coli* полноразмерные рекомбинантные белки VP40 ВЭ, NP ВЭ и VP40 ВМ содержат конформационно-независимые эпитопы, которые эффективно распознаются в иммуноблоттинге и ТИФА как противовирусными антителами поликлональных сывороток, так и МКА, специфичными к индивидуальным вирусным белкам. Иммунологическое тестирование рекомбинантных белков показывает возможность их использования при конструировании лабораторных тест-систем для диагностики филовиральных инфекций. Идентичность антигенной структуры также позволяет использовать рекомбинантные белки в качестве кандидатных вакцин против филовиральных заболеваний.

В дальнейшем мы планируем проведение более детального картирования эпитопов рекомбинантных белков с помощью панели МКА, делеционных вариантов этих белков, а также перекрывающихся пептидов. Это позволит выявить иммунодоминантные эпитопы на полноразмерных белках VP40 ВЭ, NP ВЭ и VP40 ВМ.

Работа выполнена при финансировании грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки ведущих научных школ НШ-387.2008.4 (руководитель – член-корр. РАН, д.б.н., профессор С.В.Нетесов). Авторы работы благодарят д.б.н. А.А.Чепурнова за любезно предоставленный инактивированный ВЭ и сыворотку иммунизированного ВЭ кролика и к.м.н. Е.Ф.Беланова за препарат инактивированного ВМ и сыворотку человека, переболевшего геморрагической лихорадкой Марбург.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борисевич И.В., Михайлов В.В., Краснянский В.П., Градоболев В.Н., Лебединская Е.В., Потрываева Н.В., Тиманькова Г.Д. Разработка и изучение свойств иммуноглобулина против лихорадки Эбола. *Вопр. вирусол.* 1996; 6(41):270–3.
2. Букреев А.А., Скрипченко А.А., Гусев Ю.М., Фролов В.Г., Кандрушин Е.В., Красницкая И.М. и др. Перспективный метод препаративной наработки и очистки вируса Марбург. *Вопр. вирусол.* 1995; 4:161–5.
3. Казачинская Е.И., Иванова А.В., Сорокин А.В., Качко А.В., Субботина Е.Л., Разумов И.А., Локтев В.Б. Моноклональные антитела и рекомбинантные белки филовиралов. Иммунохимические свойства и оценка возможности их использования для иммунодиагностики. *Медицинская иммунология.* 2010; 12(3):177–90.
4. Никифоров В.В., Туровской Ю.И., Калинин П.П., Акинфеева Л.А., Каткова Л.Р., Бармин В.С. и др. Случай лабораторного заражения лихорадкой Марбург. *Микробиология.* 1994; 3:104–10.
5. Чепурнов А.А., Мерзлякин Н.В., Рябчикова Е.И., Чепурнова Т.С., Волчков В.Е., Истомина Н.И. и др. Получение очищенного вируса Эбола. *Вопр. вирусол.* 1994; 6:254–7.
6. Чепурнов А.А., Мерзлякин Н.В., Чепурнова Т.С., Воробьева М.С. Получение кроличьих антисывороток к вирусу Эбола. *Вопр. вирусол.* 1994; 6(39):286–8.
7. Becker S., Feldmann H., Will C., Slenczka W.E. Avidence for occurrence of filovirus antibodies in humans and imported monkeys: do subclinical filovirus infections occur worldwide. *J Med Microbiol.* 1992; 181:43–55.
8. Bukreyev A.A., Volchkov V.E., Blinov V.M., Netesov S.V. The complete nucleotide sequence of the Popp (1967) strain of Marburg virus: a comparison with the Musoke (1980) strain. *Arch. Virol.* 1995; 140:1589–90.
9. Elliott L.H., Kiley M.P., McCormick J.B. Descriptive analysis of Ebola virus protein. *Virology.* 1985; 147:169–76.
10. Feldmann H., Geisbert T.W., Jahring P.B., Klenk H.D., Netesov S.V., Peters C.J. *Filoviridae*. In: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A., editors. *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of*

- Viruses*. London, UK: Elsevier Academic Press; 2004. P. 645–53.
11. Ikegami T., Niikura M., Saijo M., Miranda A.B., Calao M., Hernandez D.L. Antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of Reston Ebola virus nucleoprotein. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10(4):552–7.
12. Jonathan S., Towner Tara K. et al. Newly Discovered Ebola Virus Associated with Hemorrhagic Fever Outbreak in Uganda. *PLoS Pathog.* 2008; 4(11):e1000212.
13. Kalstrom G., Warfield K.L., Swenson D.L., Shannon M., Panchal R., Ruthel G. et al. Analysis of Ebola virus and VLP release using an immunocapture assay. *J. Virol. Meth.* 2005; 127(1): 1–9.
14. Leroy E.M., Souquière S., Rouquet P., Drevet D. Re-emergence of ebola haemorrhagic fever in Gabon. *Lancet.* 2002; 359(9307):712.
15. Licata J.M., Johnson R.F., Han Z., Harty R.N. Contribution of Ebola virus glycoprotein, nucleoprotein, and VP24 to budding of VP40 virus-like particles. *Virology.* 2004; 78(14):7344–51.
16. Muhlberger E., Lotfering B., Klenk H-D., Becker S. Three of the four nucleocapsid proteins of Marburg virus, NP, VP35, and L, are sufficient to mediate replication and transcription of Marburg virus-specific monocistronic minigenomes. *J. Virol.* 1998. 72(11):8756–84.
17. Noda T., Watanabe S., Sagara H., Kawaoka Y. Mapping of the VP40-binding regions of the nucleoprotein of Ebola virus. *J. Virol.* 2007; 81(7):3554–62.
18. Ruigrok R.W., Schoehn G., Dessen A., Forest E., Volchkov V., Dolnik O. et al. Structural characterization and membrane binding properties of the matrix protein VP40 of Ebola virus. *J. Mol. Biol.* 2000; 300:103–12.
19. Saijo M., Niikura M., Morikawa S., Ksiazek T.G., Meyer R.F., Peters C.J. et al. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Ebola and Marburg viruses using recombinant nucleoproteins. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(1):1–7.
20. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74(12):5463.
21. Swenson D., Wang D., Luo M., Warfield K.L., Woraratanadharm J., Holman D.H. et al. Complete protection of nonhuman primates against multistrain Ebola and Marburg virus infections. *Clin. Vaccine. Immunol.* 2008; 15(3):460–7.
22. Towner J.S., Khristova M.L., Sealy T.K., Vinscent M.J., Erickson B.R., Bawiec D.A. et al. Marburgvirus genomics and association with a large hemorrhagic fever outbreak in Angola. *J. Virol.* 2006; 80(13):6497–516.
23. Watanabe S., Noda T., Kawaoka Y. Functional mapping of nucleoprotein of Ebola virus. *J. Virol.* 2006; 80(8):3743–51.

A.V.Ivanova, E.I.Kazachinskaya, A.V.Kachko, E.L.Subbotina, A.V.Sorokin, I.A.Razumov, S.V.Netesov, V.B.Loktev

Obtaining and Immunologic Characterization of Filoviruses Recombinant Proteins VP40 and NP

State Scientific Center for Virology and Biotechnology, Koltsovo; Novosibirsk State University

Full-size genes coding matrix proteins VP40 of Ebola virus (VE) and Marburg virus (VM) and nucleoprotein (NP) of VE were cloned. These genes expression in *Escherichia coli* and purification of their products by affinity chromatography using Ni-NTA agarose permitted to obtain full-size recombinant VP40 and NP proteins of filoviruses. Immunological studies showed the recombinant polypeptides to possess antigenic properties similar to those of the native viral proteins. These proteins can be used for constructing of experimental vaccines against filoviruses and improving immunodiagnostic tests against filoviral infections.

Key words: Marburg virus (MV), Ebola virus (EV), recombinant proteins.

Об авторах:

Иванова А.В., Казачинская Е.И., Качко А.В., Субботина Е.Л., Сорокин А.В., Разумов И.А., Локтев В.Б. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл., р/п Кольцово. E-mail: ali@vector.nsc.ru
 Нетесов С.В. Новосибирский Государственный университет. Новосибирск. E-mail: nauka@nsu.ru

Authors:

Ivanova A.V., Kazachinskaya E.I., Kachko A.V., Subbotina E.L., Sorokin A.V., Razumov I.A., Loktev V.B. State Scientific Center for Virology and Biotechnology. 630559, Novosibirsk Region, Koltsovo E-mail: ali@vector.nsc.ru
 Netesov S.V. Novosibirsk State University. Novosibirsk. E-mail: nauka@nsu.ru

Поступила 19.08.10.

Г.М.Напалкова, И.И.Корсакова, Н.П.Храпова, Н.Н.Пивень, Л.В.Ломова, Т.В.Булатова**ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ И НЕПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ С ПОМОЩЬЮ РАКЕТНОГО ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗА**

ФГУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт»

Показана возможность быстрой дифференциации вирулентных штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа от авирулентных и близкородственных микроорганизмов по наличию антигенного комплекса 8 с помощью ракетного иммуноэлектрофореза с сывороткой, содержащей антитела к нему.

Ключевые слова: сап, мелиоидоз, буркхольдерии, ракетный иммуноэлектрофорез, дифференцирование.

Существует большое число штаммов буркхольдерий, фенотипически и генотипически близких к *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, но в обычных условиях непатогенных для человека и животных. К ним относятся *Burkholderia thailandensis*, *Burkholderia cepacia* и филогенетически им родственная *Pseudomonas allicola* [1].

Наиболее существенная роль в проявлении патогенных и иммуногенных свойств возбудителей мелиоидоза и сапа принадлежит антигену 8 (Ag8) – поверхностному капсульному биополимеру гликопротеиновой природы с молекулярной массой около 800 kDa и его структурному компоненту 200 kDa [3, 4]. Ранее установлено, что вирулентность *B. pseudomallei* и *B. mallei* проявляется за счет антифагоцитарной активности гликопротеина, эпитопы которого были обнаружены в составе капсулы [2], поэтому представляет интерес проводить первоначальный отбор штаммов сапных и мелиоидозных бактерий от других видов буркхольдерий по наличию данного антигена. Предложенная авторами схема поиска общих, видовых и перекрестно-реагирующих антигенов указанных выше микроорганизмов включает в себя перекрестные постановки иммунологических реакций с гомологичными и гетерологичными сыворотками [2].

Способ выявления перекрестно-реагирующих антигенов возбудителей мелиоидоза, сапа, чумы, туляремии, туберкулеза и *B. thailandensis* с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия с одновременным определением их основных физико-химических характеристик был описан в 2005 г. [5]. Данный методический подход позволяет выявлять у микробных клеток индивидуальные гликопротеиновые антигены, но не дифференцировать их друг от друга, хотя авторы указывают, что антигенный спектр близкородственных видов *B. mallei* и *B. thailandensis* весьма схож с таковым у *B. pseudomallei*.

Антиген 8 также выявляли при помощи сэндвич-варианта иммуноферментного метода, используя моноклональные антитела. Авторы указывали на различия интенсивности биосинтеза антигена 8 у разных штаммов патогенных буркхольдерий двух видов. Близкородственные микроорганизмы при этом не исследовались [6].

С помощью ракетного иммуноэлектрофореза

(РИЭФ) показано, что белки мелиоидозных и сапных микроорганизмов с гомологичными сыворотками формируют пики преципитатов как в катодной (4–5 пиков), так и в анодной (8–9 пиков) области геля [5]. Однако сведения об антигенных взаимоотношениях *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia* и *P. allicola* отсутствуют.

Целью работы являлась разработка быстрого способа дифференцирования патогенных возбудителей мелиоидоза и сапа от непатогенных для человека буркхольдерий и близкородственных микроорганизмов путем выявления в составе микробных клеток поверхностного комплекса (Ag8) в ракетном иммуноэлектрофорезе.

Для этого в составе микробных клеток выявляли поверхностный антигенный комплекс в РИЭФ с использованием иммунной сыворотки, содержащей антитела к данному антигену. В качестве антигенов использовали водно-солевые экстракты микробных клеток: *B. pseudomallei* 60913 (Ag8⁺), 51274 (Ag8⁺), 57576 (Ag8⁺), 100 (Ag8⁺), 100-6-1 (Ag8⁻), *B. mallei* B-120 (Ag8⁺), 10230 (Ag8⁺), 10230-11-2 (Ag8⁻), *B. thailandensis* 264, 251, 294, 295, *B. cepacia* 25416, 1234, *P. allicola* 8495.

Для постановки РИЭФ пластинку гель-бонд размером 8,5×10 см заливали 1 % агарозой фирмы «Calbiochem», приготовленной на барбитал-трисглициновом буфере с ионной силой равной 0,016, (pH 8,8). На расстоянии 3 см от края пластинки с анодной стороны пробивали ряд лунок диаметром 4 мм. Отступив 2 мм от лунок, вырезали полосу геля шириной 2,5 см. Гель растапливали на водяной бане, охлаждали до 48 °С, добавляли к нему 0,5–2 % по объему сыворотки, содержащей антитела к антигену 8, и снова заливали на пластинку. В лунки вносили исследуемый антигенный материал.

Электрофорез проводили при ионной силе буферного раствора в электродных отсеках 0,02 и 0,032, напряженности 9 В/см в течение 4 ч и температуре 12 °С. После остановки электрофореза пластинки просматривали. Наличие пиков преципитатов в катодной области геля свидетельствовало о присутствии антигенного комплекса 8 патогенных буркхольдерий мелиоидоза и сапа.

При использовании в электродных отсеках буферного раствора с ионной силой 0,032 с помощью ракет-

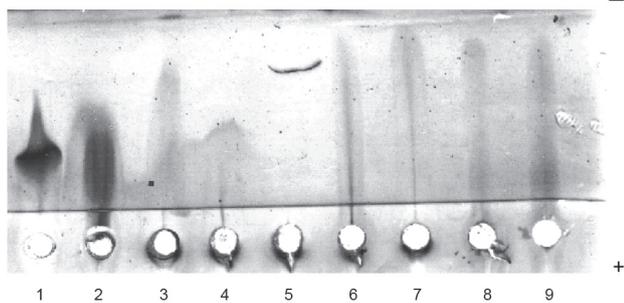


Рис. 1. Изучение патогенных и непатогенных буркхольдерий в ракетном иммуноэлектрофорезе при ионной силе буферного раствора в электродных отсеках 0,032:

1 – фракция А, содержащая антигенный комплекс 8, выделенная из *B. pseudomallei* 100 формамидом; 2 – ВСЭ *B. pseudomallei* 100; 3 – ВСЭ *P. allicola* 8495; 4 – ВСЭ *B. cepacia* 1934; 5 – ВСЭ *B. cepacia* 25416; 6 – ВСЭ *B. thailandensis* 295; 7 – ВСЭ *B. thailandensis* 294; 8 – ВСЭ *B. thailandensis* 251; 9 – ВСЭ *B. thailandensis* 264

ного иммуноэлектрофореза выявляли как патогенные, так и близкородственные буркхольдерии (рис. 1).

Применив в электродных отсеках буферный раствор с ионной силой 0,02, выявляли только вирулентные штаммы сапных и мелиоидозных микроорганизмов (рис. 2, 3).

Исследование штаммов по признаку наличия Ag8 с помощью ракетного иммуноэлектрофореза в данной модификации с антителами, полученными к антигену 8, может быть количественно использовано при изучении антигенного материала путем сравнения высоты пиков преципитатов исследуемого образца и контрольной пробы с известным содержанием Ag8 при лабораторной диагностике сапа и мелиоидоза.

Таким образом, установлено, что дифференцирование патогенных возбудителей мелиоидоза и сапа от их непатогенных вариантов и близкородственных буркхольдерий возможно с помощью ракетного иммуноэлектрофореза с сывороткой, содержащей антитела к антигенному комплексу 8.

Данный метод может применяться в комплексной диагностике сапа и мелиоидоза как дополнительный способ выявления патогенных *B. pseudomallei* и *B. mallei*.

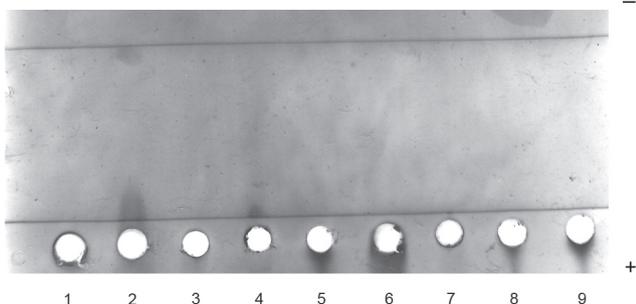


Рис. 3. Изучение патогенных и непатогенных буркхольдерий в ракетном иммуноэлектрофорезе при ионной силе буферного раствора в электродных отсеках 0,02:

1 – ВСЭ *B. cepacia* 1934; 2 – ВСЭ *B. pseudomallei* 100; 3 – ВСЭ *P. allicola* 8495; 4 – ВСЭ *B. mallei* 10230; 5 – ВСЭ *B. cepacia* 25416; 6 – ВСЭ *B. thailandensis* 295; 7 – ВСЭ *B. thailandensis* 294; 8 – ВСЭ *B. thailandensis* 251; 9 – ВСЭ *B. thailandensis* 264

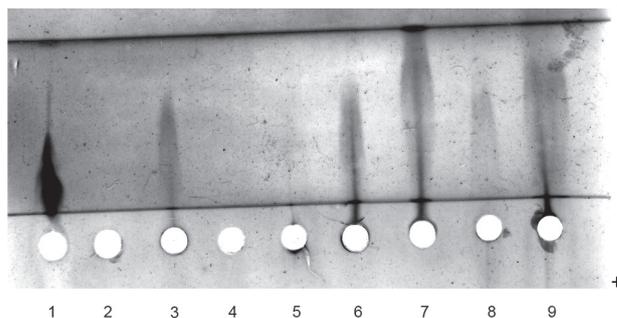


Рис. 2. Изучение патогенных и непатогенных буркхольдерий в ракетном иммуноэлектрофорезе при ионной силе буферного раствора в электродных отсеках 0,02:

1 – фракция А, содержащая антигенный комплекс 8, выделенная из *B. pseudomallei* 100 формамидом; 2 – ВСЭ *B. mallei* 10230-11-2; 3 – ВСЭ *B. mallei* 10230; 4 – ВСЭ *B. pseudomallei* 100-6-1; 5 – высушенные ацетоном клетки *B. pseudomallei* 57576; 6 – ВСЭ *B. pseudomallei* 100; 7 – ВСЭ *B. pseudomallei* 51274; 8 – высушенные ацетоном клетки *B. mallei* B-120; 9 – ВСЭ *B. pseudomallei* 60913

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Илюхин В.И., Сенина Т.В., Плеханова Н.Г., Антонов В.А., Меринова Л.К., Сеимова И.К. *Burkholderia thailandensis*: биологические свойства, идентификация и таксономическая позиция. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2002; 1:7–11.
2. Пивень Н.Н. Перспективы исследования общих, перекрестно-реагирующих и видовых антигенов у некоторых видов бактерий рода *Pseudomonas*. Микробиол. журн. 1987; 3:19–24.
3. Пивень Н.Н., Алексеев В.В., Попов С.Ф., Храпова Н.П., Прохвятилова Е.В., Викторов Д.В. и др. Ультраструктурно-иммунохимическое изучение капсулы патогенных буркхольдерий. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005; 5:19–24.
4. Пивень Н.Н., Илюхин В.И. Патогенность *Burkholderia pseudomallei* как функция его внеклеточных и поверхностных антигенов. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2000; 6:94–9.
5. Пивень Н.Н., Илюхин В.И., Тимошин В.В., Викторов Д.В., Абраменко А.В. Перекрестно-реагирующие антигены патогенных буркхольдерий и некоторых опасных возбудителей инфекционных заболеваний. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005; 2:14–9.
6. Самыгин В.М., Храпова Н.П., Спиридонов В.А., Степин А.А. Биосинтез антигена 8 в процессе культивирования *B. pseudomallei* и *B. mallei*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2001; 4:50–2.

G.M.Napalkova, I.I.Korsakova, N.P.Khrapova, [N.N.Piven'] L.V.Lomova, T.V.Bulatova

Differentiation of Pathogenic and Non-Pathogenic Burkholderias Using Rocket Immunoelectrophoresis

Volgograd Research Anti-Plague Institute

Demonstrated is the possibility to differentiate virulent strains of melioidosis and glanders etiological agents from avirulent ones and closely related microorganisms according to the presence of the antigenic complex 8, using rocket immunoelectrophoresis with the serum containing antibodies to this complex.

Key words: glanders, melioidosis, burkholderias, rocket immunoelectrophoresis, differentiation.

Об авторах:

Напалкова Г.М., Корсакова И.И., Храпова Н.П., Пивень Н.Н., Ломова Л.В., Булатова Т.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. 400131, г. Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Authors:

Napalkova G.M., Korsakova I.I., Khrapova N.P., Piven' N.N., Lomova L.V., Bulatova T.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 400131, Volgograd, Golubinskaya St., 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 16.03.10.

Е.Н.Стрельникова-Ааб, Л.Ф.Ливанова, А.А.Горяев, Н.Б.Челдышова, Н.И.Смирнова

АВИРУЛЕНТНЫЕ ШТАММЫ *VIBRIO CHOLERAЕ* O1 – ПРОДУЦЕНТЫ ПРОТЕКТИВНОГО O1-АНТИГЕНА: ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА

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

После пребывания 15 вирулентных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара эльтор сероваров Инаба и Огава в водной среде было обнаружено 6 штаммов, спонтанно утративших коровую область профага СТХф, включая структурные гены (*ctxAB*) холерного токсина. Установлено, что полученные *ctxA* мутанты не продуцировали холерный токсин и не вызывали специфической холерогенной реакции у зараженных внутрикишечно кроликов-сосунков, что указывает на их принадлежность к III группе патогенности. При изучении популяционного состава двух отобранных нетоксигенных штаммов M569A и 5/65A выявлены клоны, имеющие высокий уровень продукции O1 антигена сероваров Инаба или Огава. Полученные авирулентные штаммы предназначены для использования их в качестве продуцентов указанных протективных антигенов как при изготовлении химической холерной вакцины, так и при конструировании диагностических иммуноферментных тест-систем.

Ключевые слова: холерный вибрион, авирулентные штаммы, протективные антигены, химическая вакцина.

Распространение холеры во многих странах Азии, Африки, Южной Америки и огромная по масштабам миграция населения определяют реальную возможность ее завоза на территорию Российской Федерации [4]. Сложившаяся эпидемиологическая ситуация указывает на необходимость создания современных и надежных средств профилактики холеры. Одно из ведущих направлений специфической иммунопрофилактики холеры связано с созданием безопасных неживых вакцин. В настоящее время в Российской Федерации разработана и внедрена в производство лицензированная бивалентная химическая таблетированная холерная вакцина, содержащая основные протективные антигены *Vibrio cholerae* O1 классического биовара, вызвавшего шесть предыдущих пандемий азиатской холеры: холерный анатоксин, отвечающий за формирование антитоксического иммунитета, а также O1 антиген сероваров Инаба и Огава, определяющий образование антибактериального иммунитета при холере [1]. Данная вакцина безопасна, но из-за отсутствия биовароспецифических антигенов возбудителя текущей 7-й пандемии холеры (*V. cholerae* O1 биовара эльтор) не может обеспечить высокий уровень защиты от холеры эльтор. Более того, для производства указанной химической вакцины используют высоковирулентные штаммы, применение которых требует больших материальных затрат для обеспечения биологической безопасности. В этой связи одним из важных направлений исследований, связанных с разработкой и усовершенствованием современных химических вакцин против холеры, является конструирование авирулентных штаммов *V. cholerae* O1 биовара эльтор – продуцентов протективных антигенов.

Цель настоящего исследования состояла в получении авирулентных штаммов *V. cholerae* O1 биовара эльтор и оценки их способности к продукции O1 антигена сероваров Инаба или Огава, обеспечивающих формирование антибактериального иммунитета.

Материалы и методы

В работе использовали 15 природных штаммов *V. cholerae* серогруппы O1, типичных по культуральным, морфологическим, биохимическим и серологическим свойствам (табл. 1). Штаммы хранились в Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» в лиофилизированном состоянии. Бактериальные культуры выращивали при 37 °С с использованием жидкой и агаризованной сред LB (Luria-Bertani), а также жидкой среды АК1 (1,5 % бактопептона; 0,4 % дрожжевого экстракта Дифко; 0,5 % NaCl; 0,3 % NaHCO₃) [11].

Для изучения антигенных свойств применяли реакцию агглютинации с холерными O1, Инаба, Огава, RO антисыворотками. Развернутая реакция агглю-

Таблица 1

Использованные в работе природные токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 биовара эльтор

Штамм	Место выделения	Год выделения	Источник выделения	Серовар
M569	Мордовия	1974	Больной	Инаба
M886	Астрахань	1970	Больной	Инаба
M890	Астрахань	1970	Больной	Инаба
M1055	Астрахань	1970	Больной	Инаба
M1061	Астрахань	1970	Носитель	Инаба
M642	Астрахань	1975	Носитель	Инаба
M899	Астрахань	1970	Больной	Инаба
5/65	Иран	1965	Больной	Огава
M1062	Астрахань	1970	Носитель	Огава
28Афг	Афганистан	1965	Больной	Огава
M1244	Туркменистан	1986	Вн. среда	Огава
M1216	Туркменистан	1986	Вн. среда	Огава
M1259	Перм. обл.	1990	Больной	Огава
P17644	Ачинск	1997	Больной	Огава
P17645	Иркутск	1997	Больной	Огава

тинации в пробирках ставилась по общепринятому методу [3].

Продукцию холерного токсина определяли с помощью иммуноферментного метода GM₁ ELISA [13]. Для определения продукции холерного токсина (ХТ) клетки холерного вибриона выращивали в АКІ бульоне при 37 °С в течение 4 ч без аэрации и последующие 16 ч в условиях интенсивной аэрации [11]. При ИФА (GM₁ ELISA) в качестве положительного контроля и для определения чувствительности метода использовали очищенный препарат ХТ, полученный из эталонного высокотоксигенного штамма *V. cholerae* 569В классического биовара.

Вирулентность изучаемых штаммов определяли путем внутрикишечного заражения крольчат-сосунков по методу N.F.Dutta и M.F.Habbu [9]. Наблюдение за животными вели в течение 48 ч. Всех павших или усыпленных хлороформом крольчат вскрывали для оценки развития специфического инфекционного процесса.

Для тестирования различных генов использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР) со специфическими олигонуклеотидными праймерами, приведенными в работах А.В.Осина и соавт. и Н.И.Смирновой и соавт. [5, 6]. Продукты ПЦР фракционировали в 2 % агарозном геле (BioRad) и регистрировали в ультрафиолетовом свете.

Результаты и обсуждение

Согласно современным представлениям ключевым фактором вирулентности *V. cholerae* является холерный экзотоксин – термолабильный белок с молекулярной массой 84 кДа, вызывающий развитие тяжелой диареи – основного клинического симптома при холере [12]. Установлено, что биосинтез ХТ кодируют структурные гены *ctxA* и *ctxB*, входящие в состав профага СТХф. Типичный профаг СТХф размером 6,9 т.п.н. имеет две области – коровую и RS2. Коровая область профага, помимо генов *ctxAB*, содержит гены *zot*, *ace*, *orfU* и *cep*, продукты которых участвуют в морфогенезе и секреции фага. Кроме того, белки Zot и Ace одновременно являются дополнительными токсинами, вызывающими или способствующими развитию диареи. RS2-последовательность содержит гены *rstA*, *rstB*, контролирующие соответственно репликацию фага СТХф и интеграцию его в хромосому, а также ген *rstR*, кодирующий репрессор, запрещающий транскрипцию гена *rstA* [10]. Штаммы, содержащие профаг СТХф с генами *ctxAB*, относят к вирулентным. Однако геном профага СТХф является нестабильным, что выражается в появлении штаммов, утративших либо весь геном СТХф, либо отдельные гены его коровой области [7]. Показано, что возникновение нетоксигенных клонов из вирулентных штаммов *V. cholerae* могло быть обусловлено действием неблагоприятных факторов внешней среды во время пребывания возбудителя холеры в водной среде [2]. Эти сведения послужи-

ли основанием для проведения экспериментов по моделированию процесса пребывания холерных вибрионов в водной среде с целью получения из вирулентных штаммов *V. cholerae* биовара эльтор нетоксигенных клонов, которые могли быть в дальнейшем использованы в качестве продуцентов О1 антигена сероваров Инаба или Огава.

На первом этапе работы 15 природных штаммов *V. cholerae* биовара эльтор сероваров Инаба и Огава были проверены на наличие в их хромосомах генов, входящих в состав профага СТХф. С помощью ПЦР с использованием специфических пар праймеров установлено, что в геноме выбранных штаммов присутствовали 9 генов профага СТХф (*ctxA*, *ctxB*, *ace*, *zot*, *orfU*, *cep*, *rstA*, *rstB*, *rstR*). Исключение составлял лишь штамм 5/65, который отличался измененной структурой профага – в его составе отсутствовали три гена коровой области – *ace*, *zot*, *orfU*, при наличии генов *ctxA*, *ctxB*, *cep*. Присутствие оперона *ctxAB* свидетельствует о токсигенности изучаемых штаммов и, следовательно, о принадлежности их ко II группе патогенности [3]. Для получения атоксигенных вариантов необходимо было удалить из их генома профаг СТХф или его коровую область, содержащую гены холерного токсина. Для решения этой задачи бактериальные суспензии вирулентных штаммов *V. cholerae* вносили в стерильную речную воду до конечной концентрации 10⁷ кл./мл, поскольку ранее было показано, что голодание клеток по основным источникам питания может индуцировать реорганизацию генома профага возбудителя холеры [2]. При ПЦР-тестировании гена *ctxA* у 5400 изолированных колоний, получаемых через каждые 4 сут после высева речной воды на агар, обнаружили, что в популяции 6 штаммов (M569, M886, M890, M1055, M1061, 5/65) после пребывания в воде в течение 4–75 сут появились клоны *ctxA*⁻, утратившие способность к продукции ХТ. Частота образования таких клонов составила 4–25 % от общего числа проверенных изолированных колоний. ПЦР-анализ *ctxA*⁻ клонов показал отсутствие в их геноме не только гена *ctxA*, но и других генов, входящих в состав коровой области (*ctxB*, *ace*, *zot*) генома профага СТХф. Далее был проведен сравнительный анализ продукции холерного токсина исходными штаммами и клонами *ctxA*⁻ *ctxB*⁻ с использованием высокочувствительного иммуноферментного метода GM₁ ELISA. Установлено, что клоны, утратившие структурные гены *ctxAB*, действительно не продуцировали ХТ, тогда как у исходных штаммов был зарегистрирован биосинтез этого белка. Исключение составлял лишь исходный штамм 5/65, который при наличии оперона *ctxAB*, не продуцировал ХТ. Причины отсутствия экспрессии генов ХТ у данного *ctxA*⁺ штамма пока не известны и требуют дальнейшего изучения.

Утрата штаммами генов коровой области профага СТХф привела к изменению их вирулентности, которая была определена путем внутрикишечного заражения кроликов-сосунков клетками исходных

Таблица 2

Серологические и вирулентные свойства исходных штаммов *Vibrio cholerae* O1 и их нетоксигенных вариантов

Штамм	Серологические свойства*				Вирулентные свойства**				
					Количество животных				
	O1	Инаба	Огава	RO	зараженных	павших	с холерогенным эффектом	с энтеропатогенным эффектом	без изменений
M569 исх	(3200)	(800)	0	0	3	0	3	0	0
M569 <i>ctxA</i> ⁻	(3200)	(800)	0	0	5	0	0	0	5
M886 исх	(3200)	(400)	0	0	3	3	3	0	0
M886 <i>ctxA</i> ⁻	(3200)	(400)	0	0	3	0	0	0	3
M890 исх	(3200)	(400)	0	0	3	3	3	0	0
M890 <i>ctxA</i> ⁻	(3200)	(400)	0	0	3	0	0	0	3
M1055 исх	(3200)	(400)	0	0	4	3	4	0	0
M1055 <i>ctxA</i> ⁻	(3200)	(400)	0	0	3	0	0	1	2
M1061 исх	(3200)	(400)	0	0	2	2	2	0	0
M1061 <i>ctxA</i> ⁻	(3200)	(400)	0	0	3	0	0	0	3
5/65 исх	(3200)	0	(800)	0	5	0	0	0	5
5/65 <i>ctxA</i> ⁻	(3200)	0	(800)	0	5	0	0	0	5

*Цифры в скобках означают величины, обратные титрам.

**Характеристика экспериментальной холерной инфекции у кроликов-сосунков, зараженных исходными штаммами *V. cholerae* и их нетоксигенными вариантами.

штаммов и их нетоксигенных вариантов. Полученные результаты представлены в табл. 2. У всех кроликов, инфицированных клетками исходных *ctxA*⁺ штаммов, продуцирующих ХТ, наблюдалась выраженная холерогенная реакция – растяжение толстого и тонкого кишечника прозрачной бесцветной жидкостью, что указывало на вирулентность данных штаммов. У животных, инфицированных клонами *ctxA*⁻ *ctxB*⁻, никаких видимых изменений в кишечнике не выявлено.

На основе анализа всех представленных выше результатов полученные нетоксигенные клоны были отнесены к авирулентным штаммам, входящим в III группу патогенности.

На следующем этапе работы у авирулентных вариантов определяли уровень биосинтеза O1 антигена серовара Инаба и O1 антигена серовара Огава, которые относятся к ключевым протективным антигенам, обеспечивающим формирование антибактериального иммунитета при холере. Продукцию указанных антигенов оценивали с помощью развернутой реакции агглютинации в пробирках с холерными O1, Инаба, Огава, RO антисыворотками, результаты которой представлены в табл. 2. Установлено, что утрата мутантами генов коровой области профага СТХφ (*ctxA*, *ctxB*, *ace*, *zot*) не сопровождалась изменением продукции O1 антигена. Все полученные авирулентные штаммы *V. cholerae* O1 агглютиниро-

вались O1-антисывороткой в разведении 1:3200, не отличаясь по данному свойству от исходных. Также не наблюдалось различий между исходными штамми и их нетоксигенными производными относительно продукции серовароспецифических антигенов.

Для последующей работы было отобрано два следующих *ctxA*⁻ *ctxB*⁻ штамма *V. cholerae* O1, относящихся к разным сероварам: M569 Инаба и 5/65 Огава, получившие обозначения соответственно M569-A и 5/65-A. У этих штаммов было определено наличие в их хромосоме других генов, связанных с вирулентностью. В результате установлено, что отобранные штаммы, в отличие от исходных, не имели ни одного гена коровой области профага СТХφ. В то же время в их хромосоме присутствовали все тестируемые гены двух островов патогенности VPI-1 и VPI-2 (табл. 3).

Учитывая существующую фенотипическую гетерогенность бактериальной популяции, обусловленную различной экспрессией генов, был изучен популяционный состав отобранных штаммов M569-A и 5/65-A для выявления клонов с повышенной продукцией O1 антигена сероваров Инаба либо Огава. С этой целью после посева штаммов на плотной среде оценивали уровень биосинтеза указанных антигенов у полученных изолированных колоний с помощью развернутой реакции агглюти-

Таблица 3

Присутствие генов профага СТХφ и островов патогенности VPI-1 и VPI-2 в хромосоме исходных штаммов и их нетоксигенных вариантов, определенных с помощью ПЦР

Штамм	СТХφ						VPI-1		VPI-2		
	<i>ctxA</i>	<i>ctxB</i>	<i>ace</i>	<i>zot</i>	<i>orfU</i>	<i>cep</i>	<i>tcpA</i>	<i>mop</i>	<i>hel1760</i>	<i>nanH</i>	<i>rep1803</i>
M569 исх	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M569-A (M569 <i>ctxA</i> ⁻)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
5/65 исх	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
5/65-A (5/65 <i>ctxA</i> ⁻)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

нации в пробирках. В случае штамма М569-А Инаба среди 20 изученных колоний обнаружили 2 клон, клетки которых агглютинировались антисывороткой Инаба в разведении 1:3200, тогда как до проведенной работы клетки штамма М569 *ctxA*⁻ (или М569-А) агглютинировались этой антисывороткой в разведении 1:800 (табл. 2). Что касается штамма 5/65-А Огава, то из 35 проверенных колоний 3 имели повышенный уровень продукции О1 антигена серовара Огава, поскольку титр агглютинации их сывороткой Огава повысился в 2 раза, составляя 1:1600 (табл. 2).

Таким образом, в результате проведенных исследований получены авирулентные штаммы *V. cholerae* О1 биовара эльтор сероваров Инаба и Огава, отвечающие требованиям, предъявляемым к холерным вибрионам III группы патогенности. Высокий уровень продукции ими протективных антигенов О1 серовара Инаба и О1 серовара Огава указывают на возможность их использования в качестве продуцентов этих антигенов при изготовлении химической холерной вакцины, а также при создании иммуноферментных диагностических тест-систем.

Работа поддержана грантом РФФИ № 09-04-00217а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Джанпаридзе М.Н., Наумов А.В., Никитина Г.В., Мелещенко М.В., Доброва Г.В., Заворотных В.И. и др. Оральная химическая вакцина из гипертонических штаммов КМ-76 Инаба и КМ-68 Огава возбудителя холеры. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1991; 4:31–3.
2. Кульшань Т.А., Топорков А.В., Смирнова Н.И. Генетические изменения вирулентных штаммов холерных вибрионов биоваров эльтор при их обитании в водной среде. Пробл. особо опасных инф. 2006; 91:41–4.
3. Лабораторная диагностика холеры. Методические указания 4.2.2218-07. 4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы: изд. офиц. [утвержден Г.Г.Онищенко 31 марта 2007 г]. М: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007. 87 с.
4. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Федоров Ю.М. и др. Холера в начале XXI века, прогноз. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005; 3:44–8.
5. Осин А.В., Нефедов К.С., Ерошенко Г.А., Смирнова Н.И. Сравнительный анализ геномов холерных вибрионов эльтор, выделенных до начала и в разные периоды седьмой пандемии холеры. Генетика. 2005; 41(1):1–10.
6. Смирнова Н.И., Кириллина О.А., Челдышова Н.Б., Кутырев В.В. Изучение распространенности основных генов вирулентности среди различных штаммов *Vibrio cholerae* El-Tor для определения их эпидемической значимости. Мол. генет., ми-

кробиол. и вирусол. 2001; 3:23–8.

7. Смирнова Н.И., Осин А.В., Нефедов К.С., Кульшань Т.А., Заднова С.П., Ливанова Л.Ф. и др. Вариабельность генома профага CTXφ и ее роль в изменении вирулентных свойств *Vibrio cholerae* биовара эльтор. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 6:41–4.

8. Boyd E.F., Heilpern J., Waldor M.K. Molecular analyses of a putative CTXφ precursor and evidence for independent acquisition of distinct CTXφs by toxigenic *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol. 2000; 182(19):5530–38.

9. Dutta N.K., Habbu M.K. Experimental cholera in infant rabbits: a method for chemotherapeutic investigation. Brit. J. Pharmacol. 1955; 256(23):12252–56.

10. Faruque S.M., Asadulghani, Kamruzzaman M., Nandi R.K., Ghosh A.N., Nair G.B. et al. RS1 Element of *Vibrio cholerae* can propagate horizontally as a filamentous phage exploiting the morphogenesis genes of CTXφ. Infect. Immun. 2002; 70(1):163–70.

11. Iwanaga M., Yamamoto K., Higa N. et al. Culture conditions for stimulating cholera toxin production by *Vibrio cholerae* O1 El Tor. Microbiol. Immunol. 1986; 30:1075–83.

12. Kaper J.B., Morris J.G., Levine M.M. Cholera. Clin. Microbiol. Rev. 1995; 8 (1):48–86.

13. Svennerholm A.M., Holmgren J. Identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM₁-ELISA) procedure. Curr. Microbiol. 1978; 1:19–23.

E.N.Strelnikova-Aab, L.F.Livanova, A.A.Goryaev, N.B.Cheldyshova, N.I.Smirnova

***Vibrio cholerae* O1 Avirulent Strains – Producers of Protective O1 Antigen: Obtaining and Peculiarities**

Russian Anti-Plague Research Institute “Microbe”, Saratov

Among 15 *Vibrio cholerae* El Tor O1 virulent strains of Inaba and Ogawa serovars grown in sterile river water, 6 strains were found to lose spontaneously the core region of CTXφ prophage including structural genes (*ctxAB*) of cholera toxin. It was determined that the obtained *ctxA*⁻ mutants did not produce cholera toxin and did not cause specific cholera reaction in the intra-intestinally inoculated suckling rabbits suggesting that they belonged to the III^a pathogenicity group. Analysis of the population structure of two selected non-toxigenic strains M569A and 5/65A revealed clones with high level of O1 antigen of Inaba and Ogawa serovars production. The obtained avirulent strains can be used as producers of above-noted protective antigens both in production of chemical cholera vaccine and in constructing of diagnostic immunoenzyme test-systems.

Key words: cholera vibrio, avirulent strains, protective antigen, chemical vaccine.

Об авторах:

Стрельникова-Ааб Е.Н., Ливанова Л.Ф., Горяев А.А., Челдышова Н.Б., Смирнова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Strelnikova-Aab E.N., Livanova L.F., Goryaev A.A., Cheldyshova N.B., Smirnova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 31.03.10.

С.А.Бугоркова, С.Ю.Задумина, С.А.Пионтковский, Т.В.Бугоркова, Л.В.Самойлова

ХАРАКТЕРИСТИКА РЕАКЦИИ КЛЕТОК APUD-СИСТЕМЫ МОРСКИХ СВИНОК КАК МАРКЕР АДАПТАЦИОННО-КОМПЕНСАТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ АЭРОГЕННОЙ ИММУНИЗАЦИИ ПРОТИВ ЧУМЫ

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

Проведен морфометрический анализ реакции клеток APUD-системы (нейроэндокринных клеток – НЭК) у морских свинок при аэрогенном способе введения живой чумной вакцины (ЖЧВ). Результаты исследования сопоставлены с данными характеристики состояния внутренних органов биомодели. Установлено, что изменения морфофункционального состояния НЭК в легких и органах иммунитета носят фазный характер, свидетельствующий о заинтересованности элементов APUD-системы при ингаляционном способе поступления антигенного материала. Оценка реакции клеток APUD-системы позволяет косвенно судить о характере адаптационно-компенсаторных процессов у биомодели при противочумной вакцинации.

Ключевые слова: живая чумная вакцина, APUD-система, аэрогенная вакцинация.

Подкожное введение ЖЧВ не всегда защищает от ингаляционного заражения чумой [4], а аэрогенная иммунизация предохраняет животных как от подкожного, так и аэрозольного заражения вирулентными штаммами чумного микроба и уменьшает реактогенность вакцины при испытании на людях [3, 6]. Интерес к альтернативным схемам доставки антигенного материала обусловлен новыми данными о значении мукозальной системы иммунитета [7, 8] и связан с особой ролью клеток APUD-системы легких и лимфоидных органов, отвечающих за адаптационно-компенсаторные процессы в макроорганизме.

Целью работы был морфометрический анализ реакции апудоцитов (НЭК) у морских свинок при аэрогенном способе введения ЖЧВ.

Материалы и методы

Исследованию подвергнут архивный морфологический материал, подготовленный по общепринятой схеме [2] и хранившийся в парафиновых блоках. Морских свинок (33 особи массой 250–300 г) забивали через 1, 3, 7, 14, 21 и 45 сут после аэрогенной иммунизации (аспирационная доза на 1 животное – $5 \cdot 10^5$ ж.м.к.) взвесью в 10 % растворе лактозы двухсуточной агаровой культуры эталонного вакцинного штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ, выращенной при 28 °С. Контролем служили интактные морские свинки (ИК). Для морфологического исследования были взяты кусочки печени, сердца, легких, почек, надпочечников, а также органов лимфоидной системы – селезенки, регионарных (РЛУ – бифуркационных) и отдаленных (ОЛУ – подмышечных и паховых) лимфатических узлов. Полутонкие срезы окрашивали гематоксилином и эозином [1]. Среди НЭК легких и лимфоидных органов импрегнацией серебром по Массону в модификации Гамперля выявляли аргентаффинные (АГ) клетки, по Гримелиусу – аргиро-

фильные (АГ) клетки [5]. Готовые срезы просматривали в биологическом микроскопе Olympus CX 31 с видеокамерой JVC. Морфометрические характеристики оценивали с помощью денситоморфометрической программы аппаратно-программного комплекса МЕКОС-Ц (версия 2.1.0.0). О наличии и морфофункциональном состоянии АГ и АГ клеток судили по характеру распределения и количеству продукта гистохимической реакции. Вычисляли: в лимфоидных органах – количество фолликулов (в том числе со светлыми центрами) в срезе, их площадь (S); в легких – перфузионно-вентиляционное отношение (ПВО) = S альвеол/S капилляров на 1 $\mu\text{м}^2$ срез; в печени для светлых гепатоцитов – ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ) = S ядра/S цитоплазмы, а также деструктивный индекс (ДИ) – удельный вес элементов с проявлениями цитопатологии (на 1000 клеток); в почках – индекс функциональной активности (ИФАП) = S почечного тельца/S сосудистого клубочка на 1 $\mu\text{м}^2$ срез; в надпочечниках – стрессорный индекс ($I_{\text{стрес.}}$) = ширина коркового вещества/ширина мозгового вещества.

Результаты и обсуждение

При ингаляционном введении *Y. pestis* EV микробные клетки с 3-х суток вызвали развитие местной продуктивной реакции в верхних дыхательных путях (очаговый десквамативный бронхит) и в легочной ткани – в виде инфильтрации межальвеолярных перегородок гистиоцитами, мононуклеарами с примесью макрофагов. К 7-м суткам вокруг отдельных бронхиол и артериол формировались зоны гиперплазии лимфоидных и гистиоцитарных элементов. У отдельных животных обнаруживали участки серозно-десквамативной и серозно-геморрагической пневмонии (рис. 1, А) и немногочисленные эпителиоидноклеточные гранулемы, иногда с признаками распада

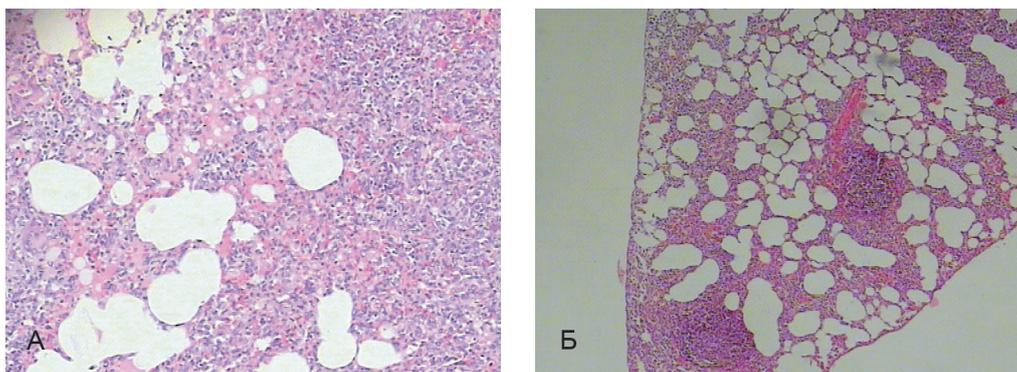


Рис. 1. Морская свинка. Легкое. 3-и сутки после аэрогенной иммунизации *Y. pestis* EV:

А – очаг серозно-геморрагической пневмонии, Б – эпителиоидно-клеточная гранулема в начальной стадии трансформации в «псевдоабсцесс». Окр. Г.Э. Ув. А – $\times 100$, Б – $\times 40$

и формированием «псевдоабсцессов» (рис. 1, Б). С 14-х суток отмечали постепенное стихание гиперпластических процессов и уменьшение количества гранул, но в гиперплазированных лимфоидных образованиях легких заметно увеличивалось число бластических элементов и плазматических клеток. Наличие множественных микроочагов ателектазов, участков резкого полнокровия капилляров в легочной ткани приводило с 7-х по 45-е сутки к резкому снижению показателя ПВО относительно ИК (6,8–8,4 и 17,6 соответственно). На протяжении всего периода наблюдения число НЭК в органе (таблица) было снижено за счет их опустошения (рис. 2, А).

В РЛУ незначительная гиперплазия лимфоидных элементов появлялась к 3-м суткам, в отдельных случаях отмечалась картина умеренного серозного лимфаденита. К 7-м суткам нарастала макрофагальная реакция. С 3-х по 14-е сутки увеличивалось число и площадь фолликулов (соответственно до 2,7 и 1,5 раз в сравнении с ИК) с нарастанием количества (в 2–2,5 раза) и активности их светлых центров. Гиперплазия паракортикальной зоны и мозгового вещества была связана, в первую очередь, с увеличением количества лимфоидных элементов, но с 7-х суток возрастало и число ретикулярных клеток. Максимальное развитие гиперпластических процессов в корковом веществе органа, существенно превышающих показатели ИК, приходилось на 14–21-е сутки и сохранялось вплоть до 45-х суток. Реакция НЭК (рис. 2, Б) в РЛУ находилась в прямой зависимости от выраженности воспалительного компонента: так, на фоне явлений сероз-

ного лимфаденита отмечали снижение числа АТ клеток вплоть до 21-х суток, а количество АГ элементов несколько превышало контрольные показатели в 1-е и на 14-е сутки, когда активизировались гиперпластические процессы (таблица).

В ОЛУ общая тенденция изменений была аналогичной, но развивалась с некоторой задержкой. Со стороны НЭК отмечали рост их числа до 7-х суток как признак активации процессов иммуногенеза в органе на фоне незначительно выраженного воспалительного компонента и последующее уменьшение количества этих элементов к 21-м суткам как следствие необходимости ограничения иммунологических сдвигов в организме. К 45-м суткам количество НЭК в ОЛУ практически возвращалось к контрольным значениям (таблица).

В селезенке через 3 сут после иммунизации обнаруживали участки серозного пропитывания капсулы и трабекул, умеренной инфильтрации красной пульпы лимфогистиоцитарными элементами с примесью единичных полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) и гиперплазию эндотелия синусов красной пульпы с частичным их сращиванием. С 7-х суток в органе регистрировали появление гранул (до 12 в срезе), но начинались и гиперпластические процессы в лимфатических фолликулах с увеличением их числа и S (соответственно до 2,8 и 1,5 раз по сравнению с ИК) и с увеличением количества (в 1,7–2,8 раза) и активности их светлых центров, а также гиперплазия ретикулярных клеток красной пульпы. Нарастание количества бластических элементов одновременно

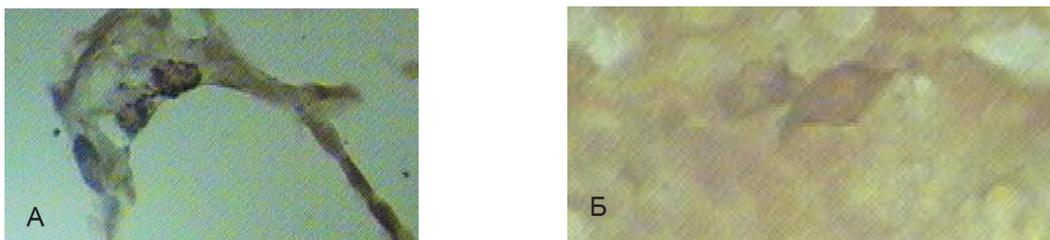


Рис. 2. Морская свинка. 7-е сутки после аэрогенной иммунизации *Y. pestis* EV:

НЭК: А – легкое, Б – РЛУ. Импрегнация серебром по Массону в модификации Гамперля. Ув. $\times 400$

Динамика реакции НЭК (апудоцитов) морских свинок при аэрогенной иммунизации вакцинным штаммом чумного микроба EV линии НИИЭГ (M±m)

Вид НЭК	Наблюдение, сут						ИК
	1-е	3-е	7-е	14-е	21-е	45-е	
Легкие							
АТ-клетки	2,7±0,5	2,1±0,1	2,4±0,5	2,5±0,5	2,6±0,7	2,7±0,7	3,4±0,7
АГ-клетки	2,2±0,5	2,3±0,7	1,6±0,2*	3,1±1,0	2,3±0,5	2,2±0,9	3,7±1,6
ПЛУ							
АТ-клетки	3,3±0,9	1,7±0,2*	2,9±0,5	2,5±0,3	0,6±0,1*	2,1±0,1	3,6±1,2
АГ-клетки	4,8±1,2	2,8±0,5	2,6±0,6	4,1±1,5	2,5±0,5	2,6±2,0	3,3±0,9
ОЛУ							
АТ-клетки	6,1±1,7*	4,3±1,5	5,1±1,1*	2,5±0,3	1,8±0,5*	2,5±0,3	3,1±0,6
АГ-клетки	4,1±1,0	3,4±1,9	6,1±1,5*	3,3±0,2	2,7±0,4	3,1±1,0	3,3±0,8
Селезенка							
АТ-клетки	3,8±1,1	4,8±1,0	5,9±1,5	6,1±3,5*	4,3±0,2	2,8±1,0*	3,9±1,0
АГ-клетки	5,5±1,8	5,1±1,1	2,6±0,5	4,5±1,0	7,0±1,2*	5,3±0,9	4,5±1,3

* Достоверность $p < 0,05$ по отношению к ИК.

в пульпе и лимфатических фолликулах активно происходило с 14-х суток. Умеренная активация НЭК, начинающаяся с 3-х суток, достигала максимума со стороны АТ клеток к 14-м, а АГ – к 21-м суткам. В последующие сроки количество НЭК снижалось, но число АГ клеток сохранялось на более высоком, чем у ИК, уровне вплоть до 45-х суток (таблица).

Во внутренних органах животных наблюдали гемодинамические нарушения и дистрофические процессы. В печени с 3-х по 14-е сутки наблюдали образование гранул (до 3–8 в срезе), а к 21-м суткам – их трансформацию в «псевдоабсцессы». Функциональное напряжение светлых гепатоцитов центра долек проявлялось уменьшением S их ядер и показателя ЯЦИ, увеличением ДИ. В отдельных случаях эти изменения приводили к очаговому некробиозу клеток. В органе достаточно часто встречались междольковые лимфогистиоцитарные инфильтраты от 3–5 клеток до 20 и более. Умеренная пролиферация клеток РЭС печени наблюдалась к 21-м суткам.

В почках имело место неравномерное полнокровие сосудов мозгового и коркового вещества, умеренная дистрофия эпителия извитых канальцев. Отмечали незначительную гиперплазию эндотелия капилляров и умеренную пролиферацию мононуклеаров в сосудистых клубочках, приводящих к достоверному, по сравнению с ИК, увеличению площадей почечных телец (в 4,6–6 раз), сосудистых клубочков (в 3,8–6 раз) и возрастанию ИФАП.

Максимум стресс-реакции макроорганизма, характеризующейся по изменению состояния различных зон надпочечников, был отмечен на 3-и сутки. С 1-х по 7-е сутки на фоне умеренной гиперплазии коркового вещества, особенно выраженной на 3-и сутки, наблюдали гипоплазию их клубочковой зоны и рез-

кое снижение феохромии мозгового вещества с его гипоплазией на 3–7-е сутки. В этот же период $I_{сmpc}$ превышал контрольное значение в 3,2–1,6 раза.

Таким образом, реакция организма морских свинок на аэрогенное введение вакцинного штамма *Y. pestis* EV сопровождалась образованием гранул в легких и в других внутренних органах. В лимфоидных органах уровень активации апудоцитов коррелировал с выраженностью воспалительных и гиперпластических процессов. При этом динамика изменений морфофункционального состояния НЭК в легких и органах иммунитета носила фазный характер, что свидетельствовало о заинтересованности элементов APUD-системы при ингаляционном способе поступления антигенного материала. Полученные данные о реакции клеток APUD-системы в организме позволили косвенно судить о характере адаптационно-компенсаторных процессов у биомодели при противочумной вакцинации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир; 1969. 645 с.
2. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. М.: Медицина; 1969. 423 с.
3. Николаев Н.И., Самойлова Л.В. Изучение в эксперименте эффективности аэрозольной иммунизации регидротированной чумной живой сухой вакциной EV института «Микроб». Пробл. особо опасных инф. 1968; 1:47–50.
4. Самойлова Л.В. Динамика развития иммунитета к чуме после прививки живой вакциной и особенности иммуногенеза при этой вакцинации [автореф. дис. ... канд. мед. наук]. Саратов; 1968. 22 с.
5. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника: руководство. М.: Медицина; 1996. С. 375–418
6. Чичерин Ю.В., Евстигнеев В.И., Романов В.Е. и др. Эффективность чумной живой сухой вакцины ГИИС при различных способах иммунизации павианов гамадрилов в отношении подкожного заражения возбудителем чумы. В кн.: Акт. вопр. профилакт. опасных инф. забол.: Тез. докл. межведомственной научн. конф. Киров; 1991. С. 125–6.
7. Alvarez M.L., Pinyerd H.L., Crisantes J.D. et al. Plant-made

subunit vaccine against pneumonic and bubonic plague is orally immunogenic in mice. *Vaccine*. 2006; 24(14):2477–90.

8. Jones T., Adamovicz J.J., Cyr S.L. et al. Intranasal Protollin/F1-V vaccine elicits respiratory and serum antibody responses and protects mice against lethal aerosolized plague infection. *Vaccine*. 2006; 24(10):1625–32.

S.A.Bugorkova, S.Yu.Zadumina, S.A.Piontkovskiy, T.V.Bugorkova,
L.V.Samoylova

**Characteristic of Cells' Reaction of APUD-System
of Guinea Pigs as Marker of Adaptive-Compensatory Processes
under Aerogenic Immunization against Plague**

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Carried out was morphometric analysis of cells' reaction of APUD system (neuroendocrinal cells) of guinea pigs immunized with live plague vaccine by aerogenic method. The results of investigations were compared with characteristics of the state of biomodel's internal organs. Elucidated was that

the changes of morphofunctional state of neuroendocrinal cells in lungs and organs of immunity were of phase character suggesting the involvement of APUD system elements in the inhalant method of antigenic material intake. Assessment of APUD-system cell's reaction enables to estimate indirectly the nature of adaptive and compensatory processes in biomodel in the course of anti-plague vaccination.

Key words: live plague vaccine, APUD system, aerogenic vaccination.

Об авторах:

Бугоркова С.А., Задумина С.Ю., Пионтковский С.А., Бугоркова Т.В., Самойлова Л.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Bugorkova S.A., Zadumina S.Yu., Piontkovskiy S.A., Bugorkova T.V., Samoylova L.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 27.01.10.

А.А.Бывалов¹, В.В.Кутырев²**ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АНТИГЕНОВ *YERSINIA PESTIS* ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ЧУМНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ**¹Учреждение Российской академии наук Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар;²ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

В обзоре рассматриваются вопросы истории и современного состояния проблемы разработки чумной химической вакцины. Представлены данные литературы о протективности ряда «моноантигенов» *Yersinia pestis*, иммуногенных свойствах комплексных антигенных препаратов. Оцениваются возможность и целесообразность создания соответствующих вакцинных препаратов, их предполагаемое место и значимость в противозидемической практике применения средств специфической профилактики чумы.

Ключевые слова: чума, химическая вакцина, антиген, протективность, иммунизация.

Впервые идею создания химических вакцин выдвинул обосновал Н.Ф.Гамалея, исходивший из того, что лишь ограниченное число антигенов микробной клетки может индуцировать формирование иммунитета, остальные компоненты бактерии являются балластом или даже тормозят развитие резистентности. Использование в качестве иммунизирующей субстанции лишь очищенных протективных антигенов без примесей инертных или токсичных веществ позволило бы обеспечить защитную эффективность и минимальную реактогенность вакцинного препарата. Практическая реализация этой идеи в последующие десятилетия привела к созданию вакцин нового типа – химических (молекулярных, субъединичных), к которым можно отнести и анатоксины. К настоящему времени в России и за рубежом получены или находятся в стадии экспериментальной проверки молекулярные вакцины против многих инфекционных заболеваний бактериальной, вирусной и иной природы. Многочисленные исследования, направленные на разработку чумной химической вакцины, до настоящего времени не увенчались успехом.

Конструирование химической вакцины предполагает проведение комплексных исследований, направленных, в первую очередь, на выбор антигенной основы препарата, отработку формы, схемы применения и технологии его приготовления. Первая из указанных задач применительно к созданию чумной химической вакцины является наиболее важной и сложной.

Несмотря на то, что к настоящему времени выявлено уже не менее 6–8 антигенов *Yersinia pestis*, которые в той или иной мере признаются протективными в отношении экспериментальной чумы лабораторных животных, целенаправленные исследования по созданию чумной химической вакцины проводились с использованием лишь некоторых из них.

Многолетний опыт идентификации, выделения и изучения иммунобиологических свойств антигенов чумного микроба указывает на необходимость включения в состав названного вакцинного препарата фракции I (F1-антигена), впервые выделенной в очищенном виде и охарактеризованной американ-

скими исследователями под руководством К.Ф.Мeyer [13, 18, 19, 22, 23]. Ими были изучены иммуногенные свойства фракции I на экспериментальных животных [13, 18, 19], а также на добровольцах [22, 23]. Были показаны протективность F1-антигена для мышей, крыс и, в существенно меньшей степени, морских свинок и низших приматов, его способность вызывать выраженный гуморальный ответ, а также возможность пассивной защиты мышей с помощью комплементарных антител. Кроме того, этими исследователями решающим фактором эффективности иммунизации убитой чумной вакциной признавалось наличие в препарате достаточного (2–3 мг) количества фракции I, а живой вакциной – способность к продукции антигена F1 в таком количестве *in vivo* [23]. Вышеприведенные данные, а также высокий авторитет К.Ф.Мeyer среди исследователей, занимавшихся чумой в 50–60-е годы прошлого века, позволили считать целесообразным создание чумной химической вакцины, предназначенной для первичной иммунизации, на основе F1-антигена. Однако последующий анализ уже имевшегося экспериментального материала и результаты проводившихся позднее исследований поставили под сомнение эту точку зрения. Против создания такого препарата говорили следующие факты: необходимость многократного введения антигена для создания достаточно напряженного иммунитета (исключение – мыши), низкая эффективность для предупреждения первично легочной чумы [17], получение новых прямых (идентификация и установление протективности V-антигена [20]) и косвенных (высокая иммуногенность живых культур чумного и псевдотуберкулезного микробов, не продуцирующих F1-антиген) доказательств сложности, многокомпонентности механизмов иммуногенеза к возбудителю чумы. По этим причинам от идеи создания чумной химической вакцины с использованием в качестве протективной основы лишь фракции I в конце концов пришлось отказаться.

Вместе с тем известно, что сложно добиться повышения уровня иммунитета посредством повторной прививки живой чумной вакцины в ранние сроки после первичной иммунизации вследствие

низкой приживаемости в организме микробов вакцинного штамма [9]. До настоящего времени нет единого мнения о схеме иммунизации людей живой вакциной в той или иной эпидемической ситуации. Ревакцинация экспериментальных животных с помощью отдельных антигенных препаратов, содержащих фракцию I *Y. pestis*, напротив, может существенно усилить грунд-иммунитет, обусловленный прививкой живой чумной вакцины [1, 9]. Кроме того, специфическая резистентность к инфекции, в том числе и к чумной, в случае иммунизации протективными антигенами развивается быстрее, чем при введении жизнеспособных клеток соответствующего вакцинного штамма [10], что имеет большое значение при необходимости в сжатые сроки обеспечить невосприимчивость к тому или иному заболеванию определенного контингента людей. Эти и иные обстоятельства послужили основанием для проведения работ по созданию чумной химической вакцины, предназначенной для ревакцинации людей, первично привитых живой чумной вакциной.

Такие исследования проводились в нескольких лабораториях России. Специалистами РосНИПЧИ «Микроб» предложен сухой несорбированный стерилизованный с помощью ионизирующего облучения препарат, включающий фракцию I и основной соматический антиген (ОСА). Необходимость включения ОСА в состав препарата авторы обосновывают его способностью стимулировать иммуногенность фракции I, а также собственной протективностью антигена для морских свинок [4, 5]. Выраженные ревакцинирующие свойства комплексного препарата F1+ОСА были показаны для морских свинок [5] и обезьян павианов гамадрилов [6], грундиниммунизированных живой вакциной. В ходе клинических испытаний были установлены иммуногенность (по такому косвенному показателю, как концентрация сывороточных антител к фракции I), а также меньшая по сравнению с живой вакциной реактогенность (по уровню общих и местных реакций) препарата F1+ОСА, введенного волонтерам подкожно через 6 мес после иммунизации живой вакциной [7].

В отличие от вакцины, предлагаемой специалистами РосНИПЧИ «Микроб», в 48 ЦНИИ Минобороны России разрабатывался препарат, включавший из числа антигенов *Y. pestis* лишь фракцию I. Ревакцинация адъювантной формой F1-антигена морских свинок [9] и павианов гамадрилов [1], первично привитых живой чумной вакциной, обеспечивала резкую стимуляцию специфической невосприимчивости животных к чуме. Так, подкожное введение 2 мг фракции I на геле гидроксида алюминия через 6 месяцев после ингаляционной прививки живой вакцины повысило напряженность иммунитета к первично легочной чуме по показателю LD₅₀ приблизительно в 4 и 2 раза больше по сравнению с бустерной иммунизацией живой вакциной ингаляционным и подкожным способами соответственно [1].

Специалистами РосНИПЧИ «Микроб» и 48

ЦНИИ Минобороны России были проведены сравнительные испытания иммуногенности двух вышеуказанных препаратов химических вакцин. Ревакцинация павианов гамадрилов, первично ингаляционно привитых живой чумной вакциной, показала, что наилучший защитный эффект в отношении аэрогенного заражения культурой возбудителя чумы достигается при подкожном бустерном введении живой и химической вакцин, изготовленных в 48 ЦНИИ Минобороны России [6]. Меньший бустерный эффект комплексного антигенного препарата (F1+ОСА) объясняется, по-видимому, несколькими причинами: более низким содержанием в препарате фракции I, отсутствием адъюванта (моноантигенный препарат был сорбирован в геле гидроксида алюминия), использованием для стерилизации ионизирующего облучения, а не микрофльтрации, применением более «жесткого» способа выделения F1-антигена по ранее описанному методу [14]. Два последних обстоятельства могли вызывать получение F1-антигена в более деполимеризованной, а значит и менее иммуногенной форме.

Несмотря на вышеизложенное, способность указанных препаратов (F1 или F1+ОСА) вызывать приемлемый уровень иммунитета лишь для животных (и, по-видимому, для человека), грундиниммунизированных живой вакциной, их неэффективность в отношении бескапсульных вариантов *Y. pestis*, а также, хотя и редко, выделяются в природных очагах чумы [8] и могут вызывать заболевание человека [29], а также появление новых данных, свидетельствующих о возможности создания химической вакцины, которая бы могла использоваться в том числе и для первичной иммунизации, остановили дальнейшие исследования в этом направлении.

В настоящее время внимание исследователей, занимающихся проблемами вакцинопрофилактики чумы, привлечено к созданию химической вакцины, пригодной для первичной иммунизации людей и включающей наряду с фракцией I другие протективные антигены. Частичная защита мышей от чумы по выживаемости или срокам гибели показана для ряда антигенов (кроме F1), в том числе V, Yop D, Ypk A, Ysc F, Yad C, Opp A [21]. Среди них особое место занимает V-антиген (Lcr V), идентифицированный и выделенный в относительно чистом виде в 50–60-х годах прошлого века [16, 20]. Как показали результаты исследований последних лет, Lcr V как фактор патогенности иерсиний характеризуется широким спектром биологического действия на организм хозяина. Этот антиген, являясь одним из основных структурно-функциональных компонентов инъектосомы, формируемой чумным микробом при попадании в инфицируемый организм, участвует в транслокации в эукариотическую клетку-мишень (дендритные клетки, нейтрофилы, макрофаги) эффекторных белков. С помощью этой системы секреции III типа чумной микроб ингибирует фагоцитарную реакцию хозяина путем нарушения механизмов сигнализации,

препятствует защитным цитоскелетным перестройкам и др. [21]. Кроме того, сам по себе антиген Lcr V в условиях *in vitro* способен нарушать хемотаксис нейтрофилов [28], активировать опосредованное Toll-подобным рецептором TLR-2 продуцирование противовоспалительного цитокина IL-10, тем самым оказывая иммуносупрессорное действие на клеточный иммунитет [15, 25].

Возможность инактивации иммунным макроорганизмом указанной активности чумного микроба определяет целесообразность включения Lcr V в состав разрабатываемой химической вакцины. В опытах на лабораторных животных была установлена способность Lcr V вызывать активную защиту мышей, а поли- или моноклональных антител – пассивную защиту от чумной инфекции.

Экспериментальные данные, свидетельствующие о высокой значимости антигенов F1 и V в иммуногенезе и патогенезе чумы, послужили основанием для конструирования химической вакцины на основе двух указанных антигенов. Такие разработки проводятся в нескольких лабораториях Западной Европы и США. Антигены F1 и V, используемые в составе вакцинных препаратов, получают из культур чумных микробов, рекомбинантных штаммов бактерий, в виде белков слияния. Получены убедительные доказательства протективности препаратов, включающих антигены F1 и V, для мышей, морских свинок [27], макак циномогус [цит. по 26], причем, защитный эффект показан в отношении как бубонной, так и первично легочной чумы, вызываемой дикими штаммами возбудителя. Кроме того, за счет V-антигена комплексный препарат индуцирует защиту и от инфицирования культурой бескапсульного штамма *Y. pestis* [11].

Результаты доклинического изучения препаратов на основе антигенов F1 и V позволили разработчикам перейти к клиническим испытаниям, в ходе которых должны быть отработаны схема, способ введения, одна человеко-доза, состав финальной формы препарата [26]. Предположительно, первичная иммунизация людей должна включать двукратную инъекцию вакцины с интервалом в три недели [27]. Однако уже на стадии разработки данного препарата можно говорить о вероятных ограничениях в эффективности его применения на людях. Во-первых, показана вариабельность структуры V-антигена у различных вирулентных штаммов *Y. pestis*, определяющая пониженную протективность V-антигена или V-антител в отношении возбудителя чумы с иным серовариантом данного антигена [12, 24]. Во-вторых, выявлена маловыраженная протективность комплекса антигенов F1 и V для африканских зеленых мартышек, использованных разработчиками в качестве одного из модельных видов животных. Вместе с тем сейчас нет оснований утверждать, что приматы этого вида являются менее адекватной моделью человека при оценке патогенеза заболевания по сравнению с обезьянами *M. cynomolgus*, для которых препарат F1+V

является эффективным иммуногеном.

В-третьих, конструирование всех препаратов химической вакцины на основе отдельных «моноантигенов» *Y. pestis* связано с неопределенными ожиданиями в отношении выраженности их иммунизаторного действия на организм человека. Как было указано выше, даже среди полипептидов чумного микроба выявлено уже не менее 6 антигенов, в той или иной мере вызывающих защиту мышей от чумы. И вопрос о наличии в вакцинном препарате достаточного количества антигенов F1 и V или целесообразности изменения (расширения) его состава для индукции необходимого уровня специфической невосприимчивости к чуме у человека может быть решен после экспериментального обоснования надежных косвенных критериев напряженности иммунитета. Такие исследования в настоящее время проводятся.

Второй разрабатываемый препарат чумной химической вакцины, предназначенной для первичной иммунизации, включает антигены F1 и Б. Б-антиген представляет собой высокомолекулярный антиген, способный экскретироваться в питательную среду при глубинном культивировании микробов *Y. pseudotuberculosis*, но не *Y. pestis*. В его состав входят полисахаридная, липидная и полипептидная составляющие, достаточно прочно связанные между собой, как показали результаты исследования препаратов Б-антигена, выделенных аффинной колоночной хроматографией с использованием в качестве лиганда иммуноглобулинов истощенной Б-антисыворотки или моноклональных антител к антигену. Б-антиген протективен для морских свинок (но не белых мышей), зараженных культурами капсулообразующего и бескапсульного штаммов *Y. pestis* [2]. Первичная иммунизация комплексом антигенов F1 и Б индуцирует защиту от бубонной чумы мышей, а также морских свинок и обезьян павианов гамадрилов от аэрогенного инфицирования возбудителем чумы [2, 3]. В настоящее время проводятся доклинические исследования, связанные с дальнейшей оценкой биохимических и иммунобиологических (эпитопная оснащенность, побочное действие и др.) свойств Б-антигена.

Таким образом, создание чумной химической вакцины признается одним из основных направлений совершенствования системы специфической профилактики чумы. На сегодняшний день выявлены и выделены несколько антигенов, активная иммунизация препаратами которых вызывает развитие специфической невосприимчивости к чуме у экспериментальных животных. Результаты доклинических и клинических исследований разрабатываемых на их основе химических вакцин покажут, смогут ли они по совокупности потребительских качеств вытеснить применяющиеся живые и убитые чумные вакцины, станут они альтернативным средством вакцинопрофилактики чумы или будут использоваться в сочетании с принятыми вакцинами во вновь обоснованных схемах иммунизации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бывалов А.А., Паутов В.Н., Чичерин Ю.В. и др. Эффективность ревакцинации павианов гамадрилов чумной живой сухой вакциной НИИС и фракцией чумного микроба. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1984, 4:74–6.
2. Бывалов А.А., Дармов И.В., Евстигнеев В.И., Пименов Е.В. Идентификация и выделение антигена, защищающего морских свинок от экспериментальной чумы. Пробл. особо опасных инф. 2005; 3(89):54–8.
3. Бывалов А.А., Дубровин М.Ю., Елагин Г.Д. и др. Зависимость между уровнем сероперестройки вакцинированных животных и напряженностью иммунитета к экспериментальной чуме. Клин. лабораторная диагн. 2007; 7:48–51.
4. Дальвадяню С.М., Пономарев Н.Г., Зубова М.В. Некоторые данные родства основного соматического антигена R-форм бактерий чумы и псевдотуберкулеза. Пробл. особо опасных инф. 1971; 3(19):81–4.
5. Дальвадяню С.М., Пономарев Н.Г., Белобородов Р.А. и др. Использование фракции I и основного соматического антигена для активации противочумного иммунитета у морских свинок. В кн.: Состояние и перспективы профилактики чумы. Тез. докл. на Всесоюз. конф. Саратов, 1978. С. 158–9.
6. Дальвадяню С.М., Дубровин М.Ю., Бывалов А.А. и др. Исследования по иммунизации против чумы. Сообщение 3. Ревакцинирующие свойства живой чумной вакцины и препаратов чумных химических вакцин для павианов гамадрилов. Пробл. особо опасных инф. 2005, 1(89):62–7.
7. Дальвадяню С.М., Дятлов И.А., Еремин С.А. и др. Исследования по иммунизации против чумы. Сообщение 4. Опыт ревакцинации волонтеров «химической» и живой чумной вакцинами. Пробл. особо опасных инф. 2006; 1(91):57–61.
8. Кондрашкина К.И., Лапина Н.Ф., Кураев И.И. и др. О возможности циркуляции в природе некоторых атипичных штаммов чумного микроба. Пробл. особо опасных инф. 1971; 3(19):63–9.
9. Лебединский В.А., Чичерин Ю.В., Паутов В.Н. и др. Опыт использования фракции I чумного микроба для ревакцинации экспериментальных животных. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1982; 5:60–3.
10. Шмеркевич Д.Л. Эффективность различных иммуногенных препаратов чумного микроба для белых мышей и морских свинок. Пробл. особо опасн. инф. 1968; 3:52–7.
11. Anderson G.W.Jr., Leary S.E.C., Williamson E.D. et al. Recombinant V antigen protects mice against pneumonic and bubonic plague caused by F1-capsule-positive and -negative strains of *Yersinia pestis*. Infect. Immun. 1996; 64(11):4580–5.
12. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. Clin. Microbiol. Rev. 2004; 17(2):434–64.
13. Baker E.E., Sommer H., Foster L.E. et al. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1947; 64:139–45.
14. Baker E.E., Sommer H., Foster L.E. et al. Studies on immunization against plague. I. The isolation and characterization of the soluble antigen of *Pasteurella pestis*. J. Immunol. 1952; 68(2):131–45.
15. Brubaker R.R. Interleukin-10 and inhibition of innate immunity to *Yersinia*: roles of Yops and LcrV (V antigen). Infect. Immun. 2003; 71(7):3673–81.
16. Burrows T.W., Bacon G.A. The basis of virulence in *Pasteurella pestis*: an antigen determining virulence. Br. J. Exp. Pathol. 1956; 37(5):481–93.
17. Burrows T.W. Virulence of *Pasteurella pestis* and immunity to plague. Ergeb. Microbiol. Immunitätsforsch Exp. Ther. 1963; 37:59–113.
18. Chen T.H., Foster L.E., Meyer K.F. Comparison of the immune response to three different *Yersinia pestis* vaccines in guinea pigs and langurs. J. Infect. Dis. 1974; 129 (Suppl.):S53–61.
19. Ehrenkranz N.J., Meyer K.F. J. Infect. Diseases. 1955; 96, 138–44.
20. Lawton W.D., Erdman R.L., Surgalla M.J. Biosynthesis and purification of V and W antigen in *Pasteurella pestis*. J. Immunol. 1963; 91:179–84.
21. Li B., Yang R. Interaction between *Yersinia pestis* and the host immune system. Infect. Immun. 2008; 76(5):1804–11.
22. Meyer K.F., Foster L.E. Measurement of protective serum antibodies in human volunteers inoculated with plague prophylactics. Stanford Med. Bull. 1948; 6(1):75–9.
23. Meyer K.F. Recent studies on the immunity response to administration of different plague vaccines. Bull. WHO. 1953; 9(5):619–36.
24. Roggenkamp A., Geiger A.M., Leitritz L. et al. Passive immunity to infection with *Yersinia spp.* mediated by anti-recombinant V antigen is dependent on polymorphism of V antigen. Infect. Immun. 1997; 65(2):446–51.
25. Sing A., Rost D., Tvardovskaia N. et al. *Yersinia* V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. J. Exp. Med. 2002; 196(8):1017–24.
26. Smiley S.T. Current challenges in the development of vaccines for pneumonic plague. Expert Rev. Vaccines. 2008; 7(2):209–21.
27. Titball R.W., Williamson E.D. Second and third generation plague vaccines. Adv. Exp. Med. Biol. 2003; 529:397–406.
28. Welkos S., Friedlander A., McDowell D. et al. V antigen of *Yersinia pestis* inhibits neutrophil chemotaxis. Microb. Pathog. 1998; 24(3):185–96.
29. Winter C.C., Cherry W.B., Moody M.D. An unusual strain of *Pasteurella pestis* isolated from a fatal human case of plague. Bull. WHO. 1960; 23:408–10.

A.A.Byvalov, V.V.Kutyrev

The Experience of Application of *Yersinia pestis* Antigens for Plague Chemical Vaccine Development

Institute of Physiology, Komi Science Centre, the Urals Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar; Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

The review presents data on history and current status of the problem of chemical plague vaccine development. Literature data about protective activity of some *Yersinia pestis* "monoantigens" as well as immunogenic properties of complex antigen preparations are summarized. The possibility and expediency of development of the appropriate vaccine preparations are evaluated, including their potential role and significance for the specific plague prophylaxis as the anti-epidemic measure.

Key words: plague, chemical vaccine, antigen, protective activity, immunization.

Об авторах:

Бывалов А.А. Учреждение Российской академии наук Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар.

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

Authors:

Byvalov A.A. Institute of Physiology, Komi Science Centre, the Urals Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar.

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

Поступила 20.08.10.

**В.И.Дубровина, С.А.Татарников, Ж.А.Коновалова, В.В.Войткова, А.В.Мазепа, С.В.Лукьянова,
В.Н.Рычкова, А.И.Бельков, Т.Т.Шкаруба**

ВЛИЯНИЕ ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА РАЗНЫХ ПОДВИДОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

ФГУЗ «Научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск

На основании проведенных исследований молекулярно-биологических механизмов пато-, иммуно- и морфогенеза показана роль бактерицидных механизмов (кислород-, нитроксидзависимых и кислороднезависимых) фагоцитоза туляремиального микроба клетками иммунофагоцитарной системы. С применением праймеров *pdpD-1F*, *pdpD-1R*, *pdpA1*, *pdpA2* в ПЦР показано, что структура островков патогенности FPI штаммов *F. tularensis* разных подвидов, зависит от подвидовой принадлежности и, вероятно, связана с вирулентностью туляремиального микроба. При оценке реакции макроорганизма на внедрение туляремиального микроба разных подвидов получены данные, имеющие прогностическое значение для характеристики течения инфекционного процесса и для разработки критериев ответной реакции со стороны лимфоидных органов в патологическом и адаптивном процессах.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, макрофаги, полиморфонуклеарные лейкоциты, лимфоциты, цитокины, бактерицидные системы фагоцитов, иммунокомпетентные органы.

В настоящее время большое внимание уделяется заболеванию, вызванному бактерией *Francisella tularensis*, из-за возможности его применения в террористических актах. В связи с увеличившимся интересом к этой инфекции стали проясняться многие, ранее не понятные, факты. Однако отдельные вопросы еще остаются не изученными. К приоритетным направлениям исследований относится раскрытие механизмов функционирования иммунофагоцитарной системы, обеспечивающей устойчивость организма к воздействию инфекционных патогенов. Способность многих патогенных бактерий к паразитированию в фагоцитах, в том числе и туляремиального микроба, играет важную роль в патогенезе инфекции. В связи с этим сопоставление свойств *F. tularensis* разных подвидов и вирулентности в аналогичных условиях взаимодействия позволит внести некоторую ясность в понимание закономерностей взаимоотношений «хозяин-паразит».

Цель исследования – выяснение особенностей бактерицидных механизмов фагоцитоза клеток иммунофагоцитарной системы и морфофункциональных изменений в иммунокомпетентных органах экспериментальных животных в динамике инфекционного процесса, вызванного *F. tularensis* разных подвидов.

Проведено изучение патогенеза и иммуногенеза туляремии, отдельных структурных элементов генетического аппарата, особенностей влияния *F. tularensis* разных подвидов на бактерицидные функции клеток иммунофагоцитарной системы и на макроорганизм с точки зрения патоморфологических, патогистологических и восстановительно-компенсаторных изменений в иммунокомпетентных органах.

Материалы и методы

Опыты *in vivo* проводили с использованием 415 беспородных морских свинок (массой 300–350 г) и 230 белых мышей (18–20 г). Для воссоздания экс-

периментального инфекционного процесса морским свинкам вводили подкожно туляремиальный микроб в дозе 100 КОЕ, белым мышам – 1 КОЕ. Животных выводили из эксперимента воздушной эмболией сосудов сердца в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (2003 г.).

В качестве объекта исследования использовали 10 штаммов возбудителя туляремии – вакцинный *F. tularensis* 15 НИИЭГ (*F. tularensis* subsp. *holarctica*); *F. tularensis* subsp. *tularensis* И-163 (Schu); *F. tularensis* subsp. *holarctica* И-94 (401), И-250 (306), И-335 (4), И-366 (1049); *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* И-357 (А-120), И-385 (А-61); *F. tularensis* subsp. *novicida* И-383 (F 6168), И-384 (Utah 112).

Вирулентность и подвидовые различия штаммов определяли на лабораторных животных (белых мышак и морских свинках) по биохимическим свойствам и различию в строении геномных областей *pdpD* и *pdpA* острова патогенности (FPI) по методу F.E.Nano [6]. Фрагмент *pdpD* (720 п.н.) у всех штаммов амплифицировали методом ПЦР с праймерами: *pdpD-1F*, 5'-TGC TTT TAG TGG GTC ATG GA-3', и *pdpD-1R*, 5'-CTA CGG CAT AAA TGG CTG GT-3'; фрагмент *pdpA* (307 п.н.) – с праймерами *pdpA1*, 5'-CAA GTG CTT GTT GGT GGT AA-3' и *pdpA2*, 5'-TGA TGT TTG ACC TGA ATT AGT GG-3'. Олигонуклеотиды производства ЗАО «Синтол» (Москва).

Активность NO-синтазы (NOS) определяли по методу L.C.Green [5] в нашей модификации [1] и выражали в мкМ/10⁶ фагоцитов.

В качестве продуцента цитокинов использовали перитонеальные макрофаги белых мышей. Индуктором цитокинов (ИЛ-1 α , ФНО- α , ИФН- γ , ИЛ-10) служили туляремиальные микробы разных подвидов. Влияние туляремиального микроба на цитокин-продуцирующую активность изучали в ИФА с помощью моноклональных антител (Bender MedSystems GmbH, Вена, Австрия). Для гистологических ис-

следований забирали регионарные лимфатические узлы и селезенку. Использовали методы обзорной микроскопии с окраской гематоксилином-эозином, метиловым зеленым-пиронином [3]. Забор материала на исследование производили на 3, 6, 9 и 18-е сутки. Контролем служили перитонеальные макрофаги и регионарные лимфатические узлы, селезенка интактных животных.

Все полученные материалы обработаны статистически стандартными параметрическими методами с использованием t-критерия Стьюдента и с применением стандартного пакета программ «Statistica», версия 6 (Copyright©Stat Soft, Inc 19842001, ИПЧИ 31415926535897) и программы Microsoft Excel (2003 г.) корпорации Microsoft. Достоверными оценивали различия при уровне значимости $p < 0,05$, $p < 0,01$.

Результаты и обсуждение

Ранее при изучении влияния *F. tularensis* разных подвидов на иммунокомпетентные клетки экспериментальных животных в условиях *in vitro* нами было показано, что туляремийный микроб подвидов *tularensis* и *mediaasiatica* снижает фагоцитарную способность фагоцитов, что, в свою очередь, приводит к незавершенности фагоцитоза [2]. Подтверждением тому является снижение функциональной активности нейтрофилов и макрофагов при взаимодействии с туляремийным микробом подвидов *tularensis* и *mediaasiatica* в большей мере, чем с представителями других исследованных подвидов *F. tularensis*. Низкие показатели содержания катионного белка и угнетение активности NOS, возможно, связаны с потерей активности фермента и катионного белка в процессе фагоцитоза туляремийного микроба.

Данные, полученные при использовании праймеров для амплификации внутренних фрагментов «острова патогенности» *rdpA*, *rdpD* в ПЦР, демон-

стрируют сходную структуру FPI в штаммах *F. tularensis* подвида *tularensis* и *novicida*. Ген, кодирующий белок *rdpD*, отсутствует в штаммах *F. tularensis* подвида *holarctica*, в том числе и в *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Установлено, что ген, кодирующий белок *rdpA*, присутствует во всех исследованных штаммах, кроме *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* И-385. Возможно, это связано с утратой вирулентности в процессе хранения штамма. Результаты амплификации представлены на рис. 1.

Установлено, что при инфицировании морских свинок туляремийным микробом разных подвидов так же, как и *in vitro*, в фагоцитах происходит стимуляция продукции NO (рис. 2). В наибольшей степени образование монооксида азота, характеризующее активацию NOS, имело место при взаимодействии туляремийного микроба подвида *novicida* (И-384). Снижение активности NOS фагоцитов, выявленное у морских свинок, инфицированных *F. tularensis* subsp. *tularensis*, возможно, объясняется тем, что у туляремийных бактерий этого подвида обнаружен ген, продукты которого являются антагонистами монооксида азота и могут противодействовать антимикробной активности фагоцита при внутриклеточной инфекции [4].

Показано, что фагоциты животных, инфицированных франциселлами разных подвидов, по сравнению с контролем, продуцируют как провоспалительные, так и противовоспалительные цитокины на 3, 6, 9-е сутки наблюдения ($P < 0,05$). Максимальные уровни провоспалительных цитокинов: ИЛ-1 α и ИФН- γ зарегистрированы на 6-е, а ФНО- α на 3-и сутки наблюдения. В макрофагах белых мышей, зараженных *F. tularensis*, всех исследованных подвидов продукция ФНО- α зарегистрирована на 3, 6 и 9-е сутки наблюдения, а в случае *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* И-385 также и на 18-е сутки (рис. 3).

Туляремийный микроб неарктического подвида оказывал наиболее выраженный стимулирующий эффект на продукцию этих цитокинов. Наименьшие показатели цитокинпродуцирующей активности фа-

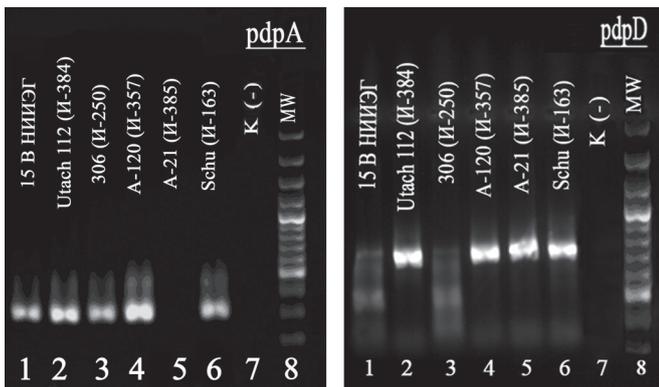


Рис. 1. Результаты амплификации генов *rdpA* и *rdpD* с помощью ПЦР в структуре острова патогенности штаммов *F. tularensis* разных подвидов:

1 – Вакцинный аттенуированный штамм *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15 НИИЭГ; 2 – *F. tularensis* subsp. *novicida* И -384 (Utah-112); 3 – *F. tularensis* subsp. *holarctica* И -250 (306); 4 – *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* И-357 (A-120); 5 – *F. tularensis* subsp. *mediaasiatica* И -385 (A-61); 6 – *F. tularensis* subsp. *tularensis* И -163 (Schu); 7 – отрицательный контроль; 8 – маркер молекулярного веса 100 bp («Fermentas», Латвия)

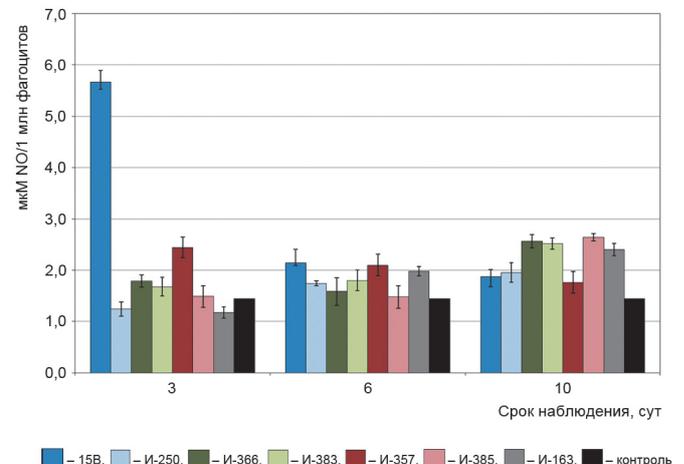


Рис. 2. Активность NOS перитонеальных макрофагов в динамике инфекционного процесса, вызванного туляремийным микробом разных подвидов ($M \pm m$)

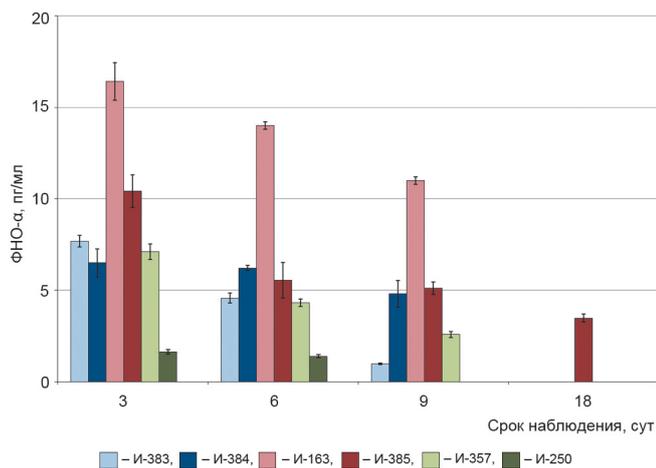


Рис. 3. Показатели продукции ФНО- α фагоцитами мышей, зараженных *F. tularensis* разных подвидов ($M \pm m$)

гоцитов зарегистрированы в группе животных, зараженных туляремиальным микробом голарктического и среднеазиатского подвидов.

Установлено, что достоверное ($P < 0,05$) увеличение продукции ИЛ-10 фагоцитами животных, зараженных *F. tularensis*, разных подвидов происходит на 6-е сутки, при этом уровень этого цитокина в образцах, полученных от белых мышей, инфицированных *F. tularensis*, подвидов *novicida* и *mediaasiatica* И-357 был в 1,6–2,3 раза выше, по сравнению с другими группами животных ($P < 0,05$).

Таким образом, с помощью предложенных F.E.Nano [6] праймеров *rdpD-1F*, *rdpD-1R*, *rdpA1*, *rdpA2* удалось охарактеризовать структуру FPI в двухпраймерной ПЦР штаммов *F. tularensis* разных подвидов и установить межподвидовые различия. Показана взаимосвязь генетической структуры острова патогенности туляремиального микроба с вирулентностью и его подвидовой принадлежностью.

Показано, что выявленные различия в функционировании механизмов неспецифической защиты макроорганизма (активность NOS фагоцитов и продукция цитокинов), а также иммунная перестройка организма (реакция клеток иммунокомпетентных органов) в ответ на внедрение патогена зависят от подвидовой принадлежности туляремиального микроба. Полученные нами данные могут способствовать пониманию механизма патогенеза туляремиальной инфекции на молекулярном уровне, выявлению дефектов в функционировании механизмов защиты макроорганизма и поиску способов коррекции этих нарушений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дубровина В.И., Коновалова Ж.А., Колесникова О.Б., Татарников С.А., Витязева С.А., Войткова В.В. и др. Определение функционального состояния фагоцитов в качестве показателя неспецифической защиты организма (методические рекомендации). Иркутск; 2008. 9 с.
2. Дубровина В.И., Татарников С.А., Коновалова Ж.А., Мазепа А.В., Витязева С.А., Бельков А.И. и др. Функционально-метаболическая активность фагоцитов при взаимодействии с туляремиальным микробом разных подвидов. Мед. паразитол. и паразитарн. бол. 2008; 2:17–21.
3. Лили Р. Патологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир; 1969. 645 с.
4. Broekhuijsen M., Larsson P., Johansson A., Bystrom M., Eriksson U., Larsson E. et al. Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the highly virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. J. Clin. Microbiol. 2003; 41(7):2924–31.
5. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N] in biological fluids. Anal. Bioch. 1982; 126(1):131–8.
6. Nano F.E., Zhang N., Cowley S.C., Klose K.E., Cheung K.M., Roberts M.J. et al. A *Francisella tularensis* pathogenicity island required for intramacrophage growth. J. Bacteriol. 2004; 186(19):6430–36.

V.I.Dubrovina, S.A.Tatarnikov, Zh.A.Konvalova, V.V.Voitkova, A.V.Mazepa, S.V.Lukiyanova, V.N.Rychkova, A.I.Belkov, T.T.Shkaruba

Influence of Tularemia Microbe of Different Subspecies on the Functional Activity of Immunocompetent Cells of Experimental Animals

Anti-Plague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk

Analysis of molecular-biological mechanisms of patho-, immuno- and morphogenesis allowed to determine the role of bactericidal mechanisms (oxygen-, nitroxide-related and oxygen-free) of tularemia microbe phagocytosis by immunophagocytic system cells. Using PCR with primers *rdpD-1F*, *rdpD-1R*, *rdpA1*, *rdpA2* it was shown that the structure of pathogenicity islands (FPI) in *F. tularensis* strains of different subspecies depended upon what subspecies the strain belonged to, and was probably associated with tularemia microbe virulence. The macroorganism reaction to the introduction of tularemia microbe of different subspecies was evaluated. The obtained data were of prognostic significance for characterization of infectious process course and for the development of criteria for lymphoid organs response in pathologic and adaptive processes.

Key words: *Francisella tularensis*, macrophages, polymorphonuclear leukocytes, lymphocytes, cytokines, bacterial systems of phagocytes, immunocompetent organs.

Об авторах:

Дубровина В.И., Татарников С.А., Коновалова Ж.А., Войткова В.В., Мазепа А.В., Лукьянова С.В., Рычкова В.Н., Бельков А.И., Шкаруба Т.Т. Научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. 664047, Иркутск, Трилицера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Authors:

Dubrovina V.I., Tatarnikov S.A., Konvalova Zh.A., Voitkova V.V., Mazepa A.V., Lukiyanova S.V., Rychkova V.N., Belkov A.I., Shkaruba T.T. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 664047, Irkutsk, Trilissera St., 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Поступила 15.03.10.

Е.Г.Абрамова, А.К.Никифоров, М.Н.Киреев, Н.Н.Кочкалова, С.В.Генералов, А.Г.Селезнева,
Л.В.Савицкая, Ю.В.Иванов

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПАРАМЕТРОВ ПРЕПАРАТА ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИИ

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

Представлены данные по изучению молекулярных параметров гетерологичного антирабического иммуноглобулина производства РосНИПЧИ «Микроб». Отмечается, что оптимальная система очистки позволяет получать препарат, состоящий из 100 % фракции мономеров. В процессе хранения иммуноглобулина появляется фракция фрагментов, однако содержание ее незначительно. Фракция агрегатов не зарегистрирована ни на момент выпуска препарата, ни после его хранения в течение 5 лет. По степени сохранения молекулярных параметров выявлено преимущество лиофилизированной формы препарата по сравнению с жидкой.

Ключевые слова: антирабический иммуноглобулин, фрагментация, агрегация, гель-фильтрация.

Одним из главных критериев качества антивиральных иммуноглобулинов является стабильность их физико-химических свойств в процессе хранения. Основными процессами, ухудшающими качество препаратов иммуноглобулина при хранении, являются агрегация и фрагментация белковых молекул [3, 13]. Фрагментация, обусловленная действием сывороточных протеиназ, приводит к снижению специфической активности антител и ускоренному выведению иммуноглобулина из организма [1]. Расщепление белковых молекул происходит с образованием как крупных фрагментов, ведущих себя как моновалентные антитела, так и более мелких иммунологически неактивных фрагментов – низкомолекулярных пептидов и аминокислот. Фрагменты и целые молекулы могут агрегировать с образованием слаборазрываемых высокомолекулярных комплексов, обладающих антикомплементарной активностью. Одной из причин агрегации белковых комплексов может быть свободнорадикальное перекисное окисление липидов (ПОЛ), обусловленное присутствием в препаратах лабильных липопротеидов и прооксидантов [3, 9]. Продукты ПОЛ могут агрегировать белки, образуя межмолекулярные сшивки. Наличие остаточного спирта также может способствовать агрегации молекул иммуноглобулина [5]. Внутримолекулярные сшивки, свободнорадикальное окисление сульфгидрильных групп с образованием дисульфидных связей изменяют конформацию белковых молекул, снижают их устойчивость в растворах и повышают доступность пептидных связей действию протеиназ. Известно, что именно агрегаты в препаратах иммуноглобулина способствуют проявлению побочных анафилактических реакций [2].

Следовательно, говоря о безопасности препарата антирабического иммуноглобулина, можно выделить один из ее критериев – отсутствие или минимальное содержание фрагментов и агрегатов. Фармакопейная статья предприятия на гетерологич-

ный антирабический иммуноглобулин предусматривает контроль готового препарата по 15 показателям, характеризующим физико-химические и биологические свойства препарата. В этот перечень не входит такой показатель, как молекулярные параметры, отражающий количественное содержание в препарате фрагментов, мономеров, димеров и агрегатов. Этот тест обязателен для гомологичных иммуноглобулинов для внутривенного и внутримышечного введения и является одним из основных показателей качества и безопасности этих препаратов. Согласно требованиям Европейской Фармакопеи (2007 г.) в гомологичных иммуноглобулинах для внутримышечного применения суммарное количество мономеров и димеров должно быть не менее 85 %, полимеров и агрегатов – не более 10 %, фрагментов – не более 5 % [10]. Соответствующие данные, касающиеся гетерологичных иммуноглобулинов, в нормативной документации отсутствуют. В связи с инициацией проведения в РосНИПЧИ «Микроб» исследований молекулярно-массового состава антирабического иммуноглобулина экспертами ГИСК им. Л.А.Тарасевича были предоставлены ориентировочные данные по содержанию вышеуказанных фракций в препарате: на момент выпуска и в течение срока годности содержание мономеров и димеров должно быть не менее 80 %, полимеров и фрагментов – не более 20 %.

В изученной литературе практически нет современных работ, касающихся исследований молекулярно-массового состава гетерологичных иммуноглобулинов. Изучение молекулярных параметров гетерологичного антирабического иммуноглобулина проводилось в 70-х годах прошлого столетия исследователями Томского НИИ вакцин и сывороток и их результаты представлены в единичных работах [11, 12].

Высокий уровень современных технологий, применяемых в настоящее время при ведении баромембранных процессов по очистке жидкого имму-

ноглобулина в РосНИПЧИ «Микроб», намного эффективнее по сравнению с традиционными видами фильтрации 70-х годов прошлого века при производстве препарата в Томском НИИ вакцин и сывороток. Безусловно, это должно положительно отразиться как на фракционном составе препарата на момент выпуска, так и на сохранении молекулярных параметров антирабического иммуноглобулина в течение срока годности.

Исследование молекулярных параметров гетерологичного антирабического иммуноглобулина не является просто увлекательной научной задачей. Работа в данном направлении имеет и практическое значение, поскольку эксперты Научного центра экспертизы средств медицинского применения рекомендовали по мере накопления данных включить раздел «Молекулярные параметры» в Фармакопейную статью предприятия на антирабический иммуноглобулин.

Целью исследований явилась оценка уровня содержания мономеров, фрагментов и агрегатов в препарате гетерологичного антирабического иммуноглобулина на момент выпуска и в процессе хранения, а также сравнение данных показателей в препаратах жидкой и лиофилизированной форм.

Материалы и методы

В работе по определению молекулярных параметров препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина были использованы 12 образцов экспериментально-производственных серий, хранившихся от одного месяца до 5 лет. Были изучены образцы как жидкой формы, так и лиофилизата. Значения основных физико-химических и биологических параметров препарата сухой формы на момент получения полностью соответствовали требованиям фармакопейной статьи на жидкий антирабический иммуноглобулин.

Содержание агрегатов и фрагментов в препаратах иммуноглобулина определяли методом гель-фильтрации [15], основанном на разделении препарата на фракции в зависимости от размера и молекулярной массы белковых компонентов. При проведении фракционирования иммуноглобулина использовали хроматографическую колонку размером 25×2,6 см (LKB, Швеция). Молекулярный вес антирабического иммуноглобулина обусловил применение в качестве наполнителя ультрагеля трисакрил GF 2000M (IBF, Франция) с областью разделения глобулярных белков от 120 до 15000 кДа. Объем внесения анализируемой пробы – 1 мл. Препарат разводили 0,9 % раствором хлорида натрия до концентрации 5 % и добавляли глицин, используемый в производстве препарата как стабилизатор, до конечной концентрации 2,25 %. Фракционирование проводили в течение 2 ч со скоростью потока 0,8 мл/мин. Величину оптической плотности каждой фракции определяли при длине волны 280 нм на проточном спектрофотометре «Увикорд СИ» (LKB, Швеция). Запись профилей элю-

ции проводили на двухканальном самописце модели 2210 (LKB, Швеция). Для количественного анализа хроматограммы применяли метод нормировки [6].

Статистическую обработку результатов исследования проводили с помощью программы «STATISTICA».

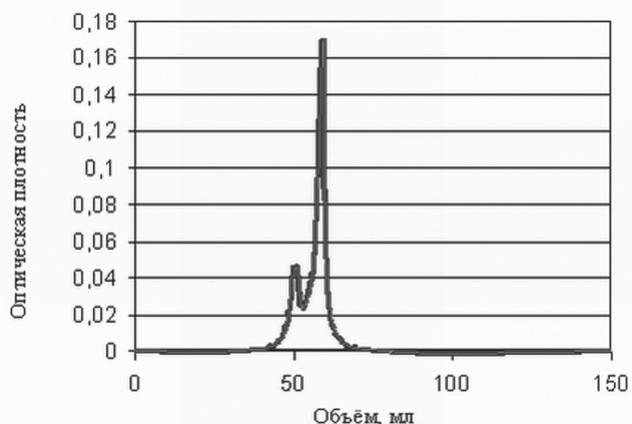
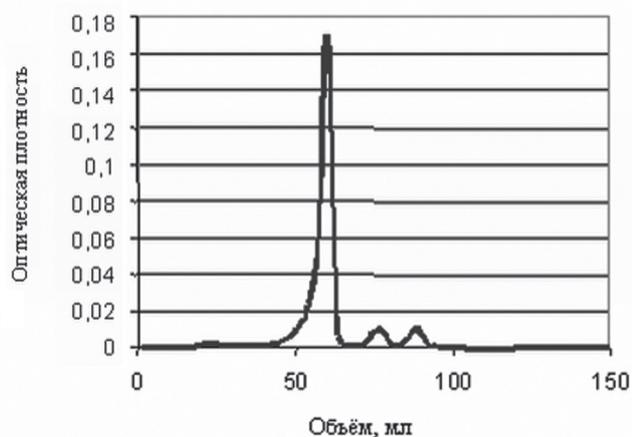
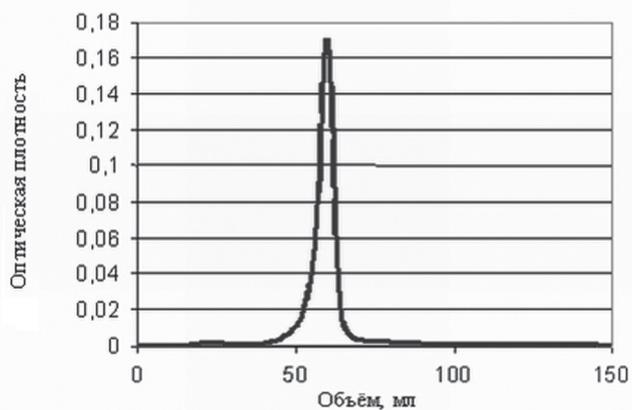
Результаты и обсуждение

В препарате гетерологичного антирабического иммуноглобулина, полученного риванол-спиртовым методом из сыворотки крови гипериммунизированных лошадей, могут иметь место процессы фрагментации и агрегации. Воздействие на белковый раствор температуры и спирта в процессе фракционирования, а также наличие остаточного спирта в готовом препарате могут вызывать агрегацию белковых молекул. Расщепление основного компонента иммуноглобулина на низкомолекулярные фрагменты под действием сывороточного фибринолизина может приводить к его фрагментации. Указанные процессы ухудшают качество иммуноглобулина, способствуя снижению титра противовирусных антител, сокращению сроков циркуляции иммуноглобулина в организме, повышению его реактогенных свойств [5].

При аранжировке опыта по изучению молекулярных параметров антирабического иммуноглобулина нами были использованы опубликованные данные исследователей Томского НИИВС [11, 12]. Антирабический иммуноглобулин, фракционированный методом гель-фильтрации, делится на 2–4 пика: один или два первых пика меньшего размера соответствуют агрегатам, затем следует основной пик мономерной фракции. В процессе хранения иммуноглобулина появлялся дополнительный пик после мономерной фракции,двигающийся более медленно, – пик фрагментов. В препарате антирабического иммуноглобулина производства Томского НИИВС на момент выпуска содержание агрегатов – наиболее реактогенной молекулярной фракции – составляло 3,8 %, после двух лет хранения эта величина возросла до 27,9 %. Фракция фрагментов соответственно составила 0,9 и 14,8 %. Столь значительное содержание нежелательных для иммуноглобулина фракций, безусловно, объясняется несовершенными методами очистки, применяемыми в то время при выпуске препарата специалистами Томского НИИВС.

При хроматографическом молекулярном разделении иммуноглобулина производства РосНИПЧИ «Микроб» наблюдали один пик мономерной фракции в случае изучения свежеприготовленного препарата (рисунок, А) и 2 пика – при исследовании препарата после хранения в течение 5 лет (рисунок, Б).

Распределение отдельных фракций в изученных сериях иммуноглобулина производства РосНИПЧИ «Микроб» выглядело следующим образом. Серии препарата № 68–72 на момент выпуска содержали 100 % фракцию мономеров. После хранения препарата в течение 5 лет в условиях, соответствующих



Профили элюции гетерологичного антирабического иммуноглобулина:

А – на момент выпуска; В – через 5 лет после хранения;
 В – испытанного при стресс-условиях

СП 3.3.2.1248-03 [14], в образцах серий № 07, 09, 012, 19 появился дополнительный пик, соответствующий фракции фрагментов – их содержание в среднем составило $(3,15 \pm 0,16) \%$. Несмотря на пятилетний срок хранения препарата, агрегатов не наблюдали ни в одной из серий, что говорит о высоком качестве очистки иммуноглобулина от остаточного спирта.

Хранение АИГ в течение срока годности (1 год 6 мес.) в условиях, соответствующих СП 3.3.2.1248-03, не привело к изменению молекулярно-массового

состава иммуноглобулина, о чем свидетельствуют результаты изучения препарата антирабического иммуноглобулина серии № 36 жидкой формы. На хроматограмме после завершения гель-фильтрации наблюдали 100 % фракцию мономеров.

Тем не менее, дополнительный пик, соответствующий фракции агрегатов (рисунок, В), был зарегистрирован при исследовании иммуноглобулина жидкой формы серии № 68, помещенного в стресс-условия (56°C в течение 1 ч). Данный тест применим при изучении стабильности иммуноглобулинов [7], и подобные условия, как показали результаты гель-фильтрации, резко ухудшили качество препарата, вызвав образование агрегатов в количестве 15,4 %. Следовательно, жидкая форма иммуноглобулина не является совершенной и требуется оптимизация потребительской формы выпуска препарата. Самым надежным способом предотвращения фрагментации и агрегации белков в процессе хранения, безусловно, является сублимационное высушивание [4, 7, 8].

Изучение фракционного состава лиофилизированного препарата подтвердило преимущество сухой формы относительно жидкой в сохранении физико-химических свойств препарата – в лиофилизированном препарате экспериментальной серии № 012 после 5 лет хранения при оговоренных в СП 3.3.2.1248-03 условиях наблюдали только присутствие мономеров.

Таким образом, проведены первые исследования молекулярных параметров гетерологичного антирабического иммуноглобулина, выпускаемого в РосНИПЧИ «Микроб». Выявлено, что препарат на момент выпуска характеризуется 100 % содержанием мономеров. В процессе хранения в течение 5 лет в препарате жидкой формы происходит частичная фрагментация (расщепление) белковых молекул до уровня $(3,15 \pm 0,16) \%$, что многократно ниже ориентировочных показателей, при отсутствии агрегатов. Данные свидетельствуют о высоком качестве очистки иммуноглобулина, позволяющей свести к минимуму содержание нежелательных примесей, влияющих на процессы фрагментации и агрегации иммуноглобулина. Кроме того, выявлено преимущество лиофилизированной формы антирабического иммуноглобулина в поддержании стабильности препарата в процессе хранения (срок наблюдения – 5 лет).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анастасиев В.В., Короткова Т.В., Крайнова Т.А., Ефремова Л.М. Разработка производственной технологии получения иммуноглобулина для внутривенного введения нового поколения – имбиоглобулина. В кн.: Матер. юбил. конф. посв. 75-летию образования Нижегородского НИИ эпидемиологии им. акад. И.Н.Блохиной МЗ РФ. Н.Новгород; 2009. С. 332–40.
2. Атангулова Р.Г., Исрафилов А.Г., Воронин С.С. Определение молекулярно-массового состава препаратов внутривенного иммуноглобулина разных производителей методом HPLC. В кн.: Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology: Матер. Междунар. науч. конф. Томск; 2006. С. 331–32.
3. Благородов С.Г., Шепелев А.П., Дмитриева Н.А. и др. Стабилизация физико-химических свойств препаратов иммуноглобулинов при хранении. В кн.: Иммунобиологические препараты. М.; 1989. С. 38–43.
4. Давыдкин В.Ю., Гаврин А.Г., Алешкин В.А. и др. Отработка процесса сублимационного высушивания комплексного иммуноглобулинового препарата. Пробл. инф. бол. М.;

2000. Ч. 2. С. 61–5.

5. *Змачинская Т.Б., Анастасиев В.В.* Оптимизация технологической схемы получения препаратов иммуноглобулинов для внутримышечного введения. Вестник Нижегородского ун-та им. Н.И.Лобачевского. 2001; 1:70–3.

6. *Золотов Ю.А., Дорохова Е.Н., Фадеева В.И.* и др. Основы аналитической химии. М.: Высшая школа; 1996. Кн. 1. С. 319–25.

7. *Исрафилов А.Г., Кудашева Г.Б., Корнилова И.А.* и др. Иммунонин – первая отечественная стабильная лиофилизированная форма внутривенного иммуноглобулина в Российской Федерации. В кн.: Медицинские иммунобиологические препараты в XXI веке: разработка, производство и применение: Матер. Всерос. конф. Уфа, 2005. Ч. 2. С. 5–12.

8. *Исрафилов А.Г., Алсынбаев М.М., Кудашева Г.Б.* и др. Социально-ориентированная система возмещения затрат на препарат внутривенного иммуноглобулина в США. Вестник инфектологии и паразитологии [Электронный ресурс]. <http://www.infectology.ru/publik/stat57.aspx> (дата обращения от 10.03.09).

9. *Короткова Т.В., Анастасиев В.В.* Влияние различных факторов на содержание димеров в препарате иммуноглобулинов. В кн.: Вакцинология 2006: Матер. Всерос. науч.-практ. конф. М.; 2006. С. 52.

10. *Краснопольский Ю.М., Борщевская М.И.* Биотехнология иммунобиологических препаратов. Харьков: Изд-во «Фармитэк»; 2008. 312 с.

11. *Пилявская Е.А.* Определение фрагментации и агрегации белка в гетерогенном антирабическом иммуноглобулине. В кн.: Научные основы производства гипериммунных сывороток. Томск; 1979. С. 60–1.

12. *Пилявская Е.А., Киселева З.Ф., Явья А.Р.* Характеристика качества гетерологичных антивирусных иммуноглобулинов в процессе хранения. В кн.: Вирусные и бактериальные препараты: сборник научных трудов. Томск; 1984. Т. 33. С. 82–6.

13. *Ситник Н.П.* Разработка высокоочищенного препарата иммуноглобулина антирабического из плазмы крови лошади [автор. дис. ... канд. биол. наук]. Уфа; 2007. 23 с.

14. Условия транспортирования и хранения медицинских иммунобиологических препаратов. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.3.2.1248-03. М.: Минздрав России; 2003. 19 с.

15. Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологи-

ческих препаратов. Фармакопейная статья ФС 42-3874-99. М.: Фармакопейный государственный комитет; 2000. 77 с.

E.G.Abramova, A.K.Nikiforov, M.N.Kireev, N.N.Kochkalova, S.V.Generalov, A.G.Selezneva, L.V.Savitskaya, Yu.V.Ivanov

Determination of the Molecular Parameters of Heterologous Anti-Rabies Immunoglobulin Using Gel-Filtration

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Presented are the data of analysis of molecular parameters of heterologous immunoglobulin produced by the Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". It is noted that the optimal system of rectification enables to obtain a preparation composed of 100% fraction of monomers. The fraction of fragments appears in the process of immunoglobulin storage, however its content is insignificant. The fraction of aggregates is not registered at the date of preparation delivery nor after its storage during 5 years. Lyophilized preparation is determined to be advantageous in comparison with the liquid one as regards molecular parameters integrity.

Key words: anti-rabies immunoglobulin, fragmentation, aggregation, gel-filtration.

Об авторах:

Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Киреев М.Н., Кочкалова Н.Н., Генералов С.В., Селезнева А.Г., Савицкая Л.В., Иванов Ю.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Abramova E.G., Nikiforov A.K., Kireev M.N., Kochkalova N.N., Generalov S.V., Selezneva A.G., Savitskaya L.V., Ivanov Yu.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила: 24.12.09.

Т.В.Аленкина¹, Г.Г.Красичков¹, Г.М.Фомина¹, О.А.Лобовикова¹, Н.П.Миронова¹, О.С.Пуденкова¹,
А.К.Никифоров¹, Л.В.Саяпина², А.Н.Малахаева²

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СЫВОРОТОК ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЧУМНЫХ АНТИФАГОВЫХ, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ РАЗНЫХ ВИДОВ ПРОДУЦЕНТОВ

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

²ФГУН «Государственный институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича», Москва

Отработана технология получения бараньих гипериммунных сывороток к чумному бактериофагу Покровской, изучена их стабильность в процессе хранения. Полученные сыворотки были использованы в качестве сырья для изготовления трех экспериментальных серий сыворотки диагностической чумной антифаговой бараньей сухой. Сравнительная оценка физико-химических свойств, специфической активности и специфичности разработанного препарата с аналогичным коммерческим, изготовленным из лошадиной сыворотки, показала их сходство по всем испытываемым параметрам, что позволило рекомендовать сыворотку диагностическую чумную антифаговую баранью к применению.

Ключевые слова: сыворотка антифаговая чумная лошадиная и баранья, бактериофаг чумной Покровской, индикаторный штамм *Y. pestis* EV.

Сыворотка диагностическая чумная антифаговая предназначена для нейтрализации чумного бактериофага, который может находиться в исследуемом материале и препятствовать выделению чумного микроба.

Сыворотка была разработана и внедрена в практику в начале 50-х годов XX века [6], однако и в настоящее время входит в перечень обязательных препаратов, применяемых для лабораторной диагностики чумы [5]. В 2007 г. сыворотка диагностическая чумная антифаговая получила регистрацию в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения и социального развития в качестве изделия медицинского назначения (Регистрационное удостоверение № ФСР 2007/00879). Препарат представляет собой сыворотку крови лошади, гипериммунизированной бактериофагом чумным Покровской (П). До 90-х годов XX века все диагностические препараты выпускались и реализовывались на основании плана Министерства здравоохранения СССР. В связи с этим объемы их производства исчислялись десятками литров, а ежегодное производство чумной антифаговой сыворотки составляло в среднем 18–22 л. В настоящее время, при отсутствии государственного планирования, сыворотка чумная антифаговая выпускается на основании заявок противоэпидемических и лечебно-профилактических учреждений Российской Федерации, поэтому годовые объемы производства и реализации резко снизились и практически не превышают 1 л. Несмотря на это препарат продолжает быть востребованным в различных регионах нашей страны, что без сомнения свидетельствует о необходимости его выпуска. В условиях мелкосерийного производства антифаговой сыворотки вполне естественно возникает вопрос об экономической нецелесообразности использования в качестве продуцентов лошадей, накопления больших запасов полученного

от них сывороточного сырья, срок хранения которого строго регламентирован. Следовательно, возникает необходимость подбора животного-продуцента более адекватного по объему получаемого сырья. По способности индуцировать антитела на антигенное раздражение и количеству отбираемой одновременно крови наиболее подходящими продуцентами являются бараны и овцы. Изготовление чумной антифаговой сыворотки на основе бараньих (овечьих) сывороток, на наш взгляд, позволит решить возникшую проблему и повысить экономическую эффективность ее производства. Получаемые небольшие объемы бараньих сывороток вполне могут обеспечить потребность производства в настоящее время и исключить необходимость уничтожения больших запасов нереализованного сырья. Помимо этого, содержание барана обходится гораздо дешевле, чем содержание лошади.

Целью нашей работы было отработать технологическую схему получения бараньей чумной антифаговой сыворотки и провести сравнительную оценку ее физико-химических и биологических свойств с коммерческим препаратом.

Материалы и методы

В качестве животных-продуцентов были использованы бараны 2-летнего возраста весом 52–54 кг, статуса К-1, закупленные в Саратовской области.

Иммунизацию баранов осуществляли бактериофагом диагностическим чумным Покровской (П) в концентрации $n \cdot 10^8$ – $n \cdot 10^9$ БОЕ/мл. Грундирование проводили однократно через 7 дней после пробного отбора крови, необходимого как для стимуляции ретикуло-эндотелиальной системы, так и для определения уровня естественных антител [7]. Основной цикл иммунизации начинали через 3 месяца после

первичного введения антигена. Схема иммунизации баранов была аналогичной схеме иммунизации лошадей, указанной в Промышленном регламенте [6]. Дозы антигена на инъекцию были уменьшены в соответствии с весовыми характеристиками продуцентов, однако в процессе иммунизации осуществлялась дополнительная корректировка дозы в зависимости от реакции организма продуцента на введение антигена (температура, общее состояние).

Динамику нарастания титров антифаговых антител в сыворотке крови животных-продуцентов, а также уровень специфической активности готовых препаратов антифаговой сыворотки (титр сыворотки) определяли в реакции нейтрализации с бактериофагом диагностическим чумным Покровской (П) сер. 013 по модифицированному методу Адамса [1, 2, 3]. Сыворотки разводили в бульоне Хоттингера (рН 7,2±0,1), начиная с 1:50 до 1:500. Разведенные сыворотки предварительно инкубировали с бактериофагом чумным Покровской (П) в рабочем разведении (смесь 1:10) в течение 15 мин при температуре (20±2) °С. Затем смесь репликатором или бактериологической петлей наносили на газон, подготовленный из 0,5 мл взвеси 24-часовой культуры индикаторного штамма с концентрацией 4·10⁹ м.к./мл в 5 мл 0,7 % агара Хоттингера. Посевы инкубировали при (28±1) °С. Учет результатов осуществляли через (19±1) ч.

При изучении свойств трех экспериментальных серий бараньей чумной антифаговой сыворотки в качестве препарата сравнения были использованы три коммерческие серии сыворотки диагностической чумной антифаговой, лиофилизата для диагностических целей – сер. 22, 30, 54.

Определение специфичности проводили методом «дорожки» [1], используя бактериофаги диагностический чумной Л-413С сер. 013 и псевдотуберкулезный сер. 014.

Серийный выпуск всех вышеперечисленных препаратов осуществляется в ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Препараты испытывались в период их срока годности.

В качестве индикаторного штамма использовали 24-часовую культуру вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, выращенного при температуре 28 °С. Указанный штамм был получен в ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича. Свойства экспериментальных и коммерческих серий чумных антифаговых сывороток оценивали в соответствии с Техническими условиями [8].

Результаты и обсуждение

После первого года иммунизации уровень антифаговых антител достиг значения 1:100, после второго – 1:200. Таким образом, после двух лет иммунизации активность сывороток баранов-продуцентов достигла регламентированного уровня, и они стали пригодными для производства препарата. Через 3 года иммунизации уровень специфических антител

достиг значений 1:400. Следует отметить, что при иммунизации лошадей-продуцентов титр специфических антител 1:200 достигается через 1–1,5 года, в зависимости от индивидуальной иммунореактивности продуцента, однако антигенная стимуляция при этом характеризуется более высокими дозами. Максимальный уровень антифаговых антител у лошадей составляет обычно 1:300 и лишь у редких продуцентов достигает уровня 1:500.

Основным преимуществом гипериммунных сывороток является способность сохранять свои свойства при хранении в течение длительного периода. Изучение рН и специфической активности бараньих антифаговых сывороток, хранившихся при температуре от 2 до 8 °С, выявило стабильность указанных параметров в течение всего срока наблюдения (3 года). Свойства сывороток чумных антифаговых, полученных от лошадей-продуцентов, сохранялись в течение 18 лет наблюдения (табл. 1).

Из полученного сырья были изготовлены 3 экспериментальные серии лиофилизированных препаратов сыворотки диагностической чумной антифаговой бараньей 001, 002, 003, которые прошли комиссионные испытания с участием специалистов института «Микроб» и ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича.

При определении физико-химических свойств

Таблица 1

Стабильность свойств чумной антифаговой сыворотки (сырье) в процессе хранения

Вид продуцента	Дата получения сыворотки, даты последующего контроля	рН	Специфическая активность
Баран	08.02.2005 г.	8,48	1:100
	08.02.2006 г. (через 1 год)	8,48	1:100
	07.02.2007 г. (через 2 года)	8,47	1:100
	13.02.2008 г. (через 3 года)	8,48	1:100
	29.01.2009 г. (через 4 года)	8,47	1:100
Баран	09.11.2006 г.	8,52	1:100
	20.11.2007 г. (через 1 год)	8,53	1:100
	18.11.2008 г. (через 2 года)	8,52	1:100
Баран	25.12.2006 г.	8,45	1:200
	19.12.2007 г. (через 1 год)	8,43	1:200
	24.12.2008 г. (через 2 года)	8,44	1:200
Баран	21.05.2007 г.	8,50	1:200
	27.05.2008 г. (через 1 год)	8,51	1:200
	29.01.2009 г. (через 2 года)	8,49	1:200
Баран	02.11.2007 г.	8,51	1:200
	05.11.2008 г. (через 1 год)	8,51	1:200
Баран	24.09.2008 г.	8,60	1:400
	28.01.2009 г. (через 4 мес.)	8,60	1:400
Лошадь	22.12.1988 г.	-	1:300
	11.04.2007 г. (через 18 лет)	8,4	1:300
Лошадь	22.12.1988 г.	-	1:300
	13.12.2006 г. (через 18 лет)	8,25	1:300
Лошадь	02.02.1989 г.	-	1:300
	27.04.2007 г. (через 18 лет)	8,37	1:300

Примечание. «-» – ранее данный параметр не подлежал контролю, в связи с этим сведения отсутствуют.

Показатели физико-химических свойств и специфической активности сывороток диагностических чумных антифаговых

Наименование сыворотки (вид продуцента)	№ серии	Растворимость Норма по НД – 10 мин	pH Норма по НД – от 7,2 до 8,8	Потеря в массе при высушивании. Норма по НД – не более 2 %	Специфическая активность Норма по НД – не менее 1:100
Сыворотка диагностическая чумная антифаговая сухая (баранья)	001	3–6	7,9	0,6	1:100
Сыворотка диагностическая чумная антифаговая сухая (баранья)	002	3–6	8,15	0,8	1:300
Сыворотка диагностическая чумная антифаговая сухая (баранья)	003	3–6	8,33	0,7	1:100
Сыворотка диагностическая чумная антифаговая сухая (лошадиная)	22	6–8	8,2	0,52	1:300
Сыворотка диагностическая чумная антифаговая сухая (лошадиная)	30	6–8	8,1	1,2	1:500
Сыворотка диагностическая чумная антифаговая сухая (лошадиная)	54	6–8	7,39	1,2	1:200

установлено, что сухие препараты сыворотки диагностической чумной антифаговой бараньей сер. 001, 002, 003 представляли собой аморфную массу серовато-розового цвета, а сухие образцы препарата сравнения сер. 22, 30 и 54 – аморфную массу серовато-белого цвета.

Содержимое ампул экспериментальных сывороток полностью растворялось в 1 мл дистиллированной воды при встряхивании в течение 3–6 мин при температуре (20 ± 2) °С, в то время как сыворотка диагностическая чумная антифаговая лошадиная сер. 22, 30 и 54 растворялась при тех же условиях в течение 6–8 мин. В соответствии с нормативной документацией (НД) допустимое время растворения сухих препаратов из сыворотки лошади составляет 10 мин. После растворения экспериментальные образцы представляли собой прозрачную слегка опалесцирующую жидкость желто-коричневого цвета, препараты сравнения – желтого цвета.

Значения pH бараньей антифаговой сыворотки сер. 001, 002, 003 составляли соответственно 7,80, 8,36, 8,33, а pH сер. 22, 30, 54 препарата сравнения – 8,40, 8,30, 7,39, что соответствовало пределам значений pH по НД – от 7,2 до 8,8.

Одним из важных показателей, определяющих стабильность препаратов при хранении, является содержание остаточной влаги. В условиях минимального ее содержания снижается вероятность протекания химических реакций, которые приводят к необратимым изменениям препаратов. По мнению ряда авторов, оптимальная величина остаточной влажности (или потеря в массе при высушивании) сывороток и сывороточных препаратов не должна превышать 1 % [4]. В соответствии с НД потеря в массе при высушивании в препаратах сыворотки диагностической чумной антифаговой лошадиной – не более 2 %. При испытаниях потеря в массе при высушивании в сериях 22, 30 и 54 коммерческого препарата составила со-

ответственно 0,52, 1,2, 1,2 %, а в экспериментальных сериях 001, 002, 003 – 0,6, 0,8, 0,7 %, что свидетельствует о правильно подобранном режиме лиофилизации для бараньих сывороток.

Показатели физико-химических свойств экспериментальных сывороток и образцов препарата сравнения приведены в табл. 2.

К биологическим свойствам антифаговых сывороток относятся специфическая активность и специфичность. Определение специфической активности представленных к испытанию экспериментальных сер. 001, 002, 003 сыворотки диагностической чумной антифаговой бараньей и сер. 20, 33, 54 препарата сравнения исследовали в разведениях от 1:100 до 1:500.

Специфическая активность бараньих антифаговых сывороток сер. 001, 002, 003 составила 1:100, 1:300, 1:100, специфическая активность образцов препарата сравнения сер. 20, 33, 54 – 1:300, 1:500 и 1:200 (табл. 2).

Контроль количества бляшкообразующих единиц в рабочем разведении бактериофага чумного Покровской (П), проводимый одновременно с контролем специфической активности сывороток, свидетельствовал о правильности определения фагнейтрализующего титра сывороток: при разведении 1:100 тыс. на 2 чашках Петри с пластинами агара Хоттингера (pH 7,2) фаг образовывал 7 и 11, а при разведении 1:20 тыс. – 43 и 43 литических пятна, при норме по НД – 7–13 и 35–65 литических пятен соответственно.

При изучении специфичности экспериментальных (сер. 001, 002, 003) и контрольных (сер. 20, 33 и 54) серий чумных антифаговых сывороток у всех образцов выявлена фагнейтрализующая активность только в отношении гомологичного бактериофага чумного Покровской (П). Сыворотки не взаимодействовали с гетерологичными бактериофагами чумным Л-413С и псевдотуберкулезным, что свидетельствовало о высокой специфичности препаратов.

Таким образом, по отработанной нами технологии из стабильных гипериммунных бараньих сывороток были получены экспериментальные серии лиофилизированного препарата сыворотки диагностической чумной антифаговой. Сравнительное изучение свойств экспериментальных серий и коммерческого препарата, проведенное комиссионно, показало, что по физико-химическим и биологическим свойствам испытуемые образцы бараньих сывороток соответствовали образцам препарата сравнения – сыворотки диагностической чумной антифаговой лошадиной. Чумные антифаговые сыворотки независимо от вида продуцента характеризовались высокой специфичностью и не давали перекрестных реакций с чумным Л-413 С и псевдотуберкулезным бактериофагами. По заключению комиссии сыворотка диагностическая чумная антифаговая, изготовленная из гипериммунных сывороток баранов-продуцентов, может применяться наряду с сывороткой диагностической чумной антифаговой, изготавливаемой из лошадиной сыворотки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамс М. Бактериофаги. М.: Медицина; 1961.
2. Анохина С.В., Анисимова Т.И., Голубева В.К. Усовершенствование метода титрации чумных антифаговых сывороток. В кн.: Матер. ежегодной науч. конф., посв. памяти Л.А.Тарасевича, по вопросам штаммов, новых методов контроля, стандартизации биологических препаратов, бактериофагии и антибиотиков. М.; 1964. С. 256.
3. Бессель М.М., Сидорова Н.К., Заболотняя О.С. Модификация метода определения титра чумных антифаговых сывороток. В кн.: Профилактика особо опасных инфекций. Эпизоотология, микробиология и специфическая профилактика чумы. 1976; 1:65–8.
4. Бланков Б.И., Клебанов Д.Л. Применение лиофилизации в микробиологии. М.: Медгиз; 1961.
5. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика особо опасных инфекционных болезней. М.: ОАО «Издательство «Медицина», издательство «Шико»; 2009.
6. Промышленный регламент № 01898109-06-06 на производство «Сыворотка диагностическая чумная антифаговая, лио-

филизат для диагностических целей». Утвержден 06.02.06.

7. Смирнов В.В., Чаплинский В.Я., Андреева З.М. и др. Научные основы производства диагностических препаратов. Киев: Наукова думка; 1980.

8. Технические условия ТУ 8955-004-01898109-2007 «Сыворотка диагностическая чумная антифаговая, лиофилизат для диагностических целей». Утверждены 02.04.2007 г.

T.V.Alenkina, G.G.Krasichkov, G.M.Fomina, O.A.Lobovikova,
N.P.Mironova, O.S.Pudenkova, A.K.Nikiforov, L.V.Sayapina,
A.N.Malakhayeva

Comparative Analysis of Diagnostic Plague Antiphage Sera Received from Producers of Different Types

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov;
L.A.Tarasevich State Institute for Standardization and Control
of Medical Biological Preparations, Moscow

Manufacturing process of ovine hyperimmune sera against Pokrovskaya plague bacteriophage was worked out. Their stability in the process of storage was studied. Sera received were used as raw material to produce three experimental series of diagnostic plague antiphage ovine dry serum. Physicochemical properties, specific activity and specificity of the developed preparation were evaluated in comparison with similar commercial preparation produced from the equine serum. Similarity of all test parameters was revealed that enabled to recommend diagnostic plague antiphage ovine serum for application.

Key words: antiphage plague equine and ovine sera, Pokrovskaya plague bacteriophage, *Y. pestis* EV indicator strain.

Об авторах:

Аленкина Т.В., Красичков Г.Г., Фомина Г.М., Лобовикова О.А., Миронова Н.П., Пуденкова О.С., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Саяпина Л.В., Малахаева А.Н. Государственный институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича. 119002, Москва, ул. Сивцев Вражек, 41.

Authors:

Alenkina T.V., Krasichkov G.G., Fomina G.M., Lobovikova O.A., Mironova N.P., Pudenkova O.S., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Sayapina L.V., Malakhayeva A.N. L.A.Tarasevich State Institute for Standardization and Control of Medical Biological Preparations. 119002, Moscow, Sivtsev Vrazhek, 41.

Поступила 25.05.09.

Д.С.Янов, С.Н.Клинова, А.В.Миронин, И.В.Живов, И.П.Погорельский, В.И.Дробков, Ю.Н.Федоров, Я.А.Кибирев

РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКОГО ПОДХОДА К СОЗДАНИЮ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА СУБЪЕДИНИЦЫ В ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА

ФГУ «48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации», Киров

Представлены результаты экспериментов по конструированию штамма *Escherichia coli* Top10 (pTrcSuB), перспективного для разработки рекомбинантной холерной вакцины для перорального применения. Полученный штамм обладает индуцибельной экспрессией субъединицы В холерного токсина. Изучены особенности экспрессии клонированного гена в штамме-продуценте, а также условия поддержания штамма. Предлагаемый подход позволит получить эффективные и безопасные холерные вакцины.

Ключевые слова: рекомбинантная вакцина, индуцибельная экспрессия, субъединица В холерного токсина, вектор.

Холера – широко распространенное в мире заболевание из числа особо опасных инфекций бактериальной природы. Проблема холеры по-прежнему актуальна для многих стран мира, в том числе и для России [3]. Реальная возможность внезапного возникновения эпидемических вспышек требует от соответствующих служб постоянной готовности к экстренному проведению мероприятий по локализации и ликвидации очагов холеры. В этих условиях специфическая иммунопрофилактика по-прежнему сохраняет важное значение в общей системе противоэпидемических мероприятий при холере. Однако существующие к настоящему времени холерные вакцины вследствие высокой реактогенности, низкой эффективности и непродолжительности поствакцинального иммунитета уже не рассматриваются как надежное средство защиты населения от холеры и требуют существенного совершенствования [5]. Согласно имеющимся данным, они обеспечивают защиту в среднем не более 50–60 % привитых людей в течение 3–6 месяцев [4]. В то же время результаты клинических, серологических и бактериологических исследований, полученные на добровольцах, повторно зараженных возбудителем холеры через 3 года после болезни, свидетельствуют о выработке довольно напряженного и продолжительного иммунитета, что указывает на возможность создания высокоэффективной противохолерной вакцины [4].

В последние годы особое внимание исследователей привлекает конструирование рекомбинантных живых вакцин для перорального применения. Рекомбинантные вакцины безопасны и безвредны для вакцинируемых, имеют высокие протективные свойства. Они могут быть использованы для разработки комплексных вакцин, создающих иммунитет одновременно против нескольких инфекций. Рекомбинантная вакцина позволяет использовать серологические методы дифференциальной диагностики для того, чтобы с высокой вероятностью отличать поствакцинальный иммунитет от иммунного от-

вета, развивающегося в случае естественного инфицирования [7, 8]. Пероральный способ вакцинации не вызывает отрицательных эмоций у прививаемых, при этом способе отсутствует опасность передачи инфекций [2].

Основными задачами при создании рекомбинантной вакцины являются идентификация и клонирование генов протективных белков возбудителей, разработка генно-инженерных конструкций, обеспечивающих необходимый уровень экспрессии протективных антигенов, изготовление лекарственных форм, проведение лабораторных и клинических испытаний.

Однако серьезной проблемой на пути создания рекомбинантной вакцины является быстрое снижение или полная утрата экспрессии протективных антигенов с конститутивным синтезом рекомбинантными штаммами, в результате чего такие штаммы уже не могут использоваться как вакцинные. В этой связи представлялось целесообразным создание рекомбинантного штамма с индуцируемой экспрессией протективного антигена, перспективного для последующего использования в качестве вакцинного. Предлагаемая стратегия индуцированного синтеза антигенов рекомбинантным вакцинным штаммом позволит регулировать антигенную нагрузку, выбрать оптимальную схему иммунизации с учетом индивидуальных особенностей вакцинируемого.

Образование антител к холерному экзотоксину рассматривается как важнейший фактор эффективности любой холерной вакцины [9]. Поэтому в качестве модели для клонирования был выбран ген *ctxB*, ответственный за синтез субъединицы В холерного токсина. Субъединица В отвечает за связывание холерного токсина с рецепторными зонами энтероцитов, но не обладает, без субъединицы А, токсичностью.

Для проведения работ по конструированию рекомбинантной плазмиды был использован вектор с промотором P_{trc} (гибридный промотор, являющийся-

ся более эффективным, чем исходные регуляторные участки). Практическое применение этой векторной системы не привязано к одному штамму кишечной палочки и допускает использование штаммов дикого типа, так как индуцибельная экспрессия с него может осуществляться в любом генетическом окружении.

Цель настоящего исследования – получить рекомбинантный штамм *E. coli* с индуцибельной экспрессией субъединицы В холерного токсина, изучить особенности экспрессии клонированного гена, условия поддержания штамма, возможности использования его в перспективе в качестве вакцинного.

Материалы и методы

В экспериментах использовали штаммы *Vibrio cholerae cholerae* 569В (серотип Инаба), *E. coli* Top10, *E. coli* Top10 (pTrcHis2С). Штаммы хранятся в коллекции микробных культур «48 ЦНИИ Минобороны России» в лиофильно высушенном состоянии под вакуумом при температуре минус 20 °С.

В качестве питательных сред использовали LB-бульон и агар. При необходимости в питательную среду добавляли антибиотики в следующих концентрациях: стрептомицин – 50 мкг/мл, ампициллин – 100 мкг/мл.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в микропробирках вместимостью 0,6 мл на программируемом термостате «Терцик» (ДНК-технология, Россия). Хромосомную ДНК *V. cholerae cholerae*, штамм 569В (серотип Инаба), используемую для амплификации, выделяли по методу Мармура [1]. При постановке ПЦР использовали следующие реагенты: фермент Таq-полимеразу активностью 2–5 ед./мкл и дезоксирибонуклеозидтрифосфаты производства фирмы «СибЭнзим», деионизированную воду, минеральное масло производства фирмы «Sigma», праймеры suB1 – 5'-CCT CCT GGA TCC GAT TAA ATT AAA ATT TGG TG и suB2 – 5'-CCT CCT GAA TTC TTA ATT TGC CAT ACT AAT TGC, фланкирующие последовательность гена *ctxB* и содержащие специфические сайты узнавания рестриктаз BamHI и EcoRI соответственно. Дополнительные участки CCT CCT с 5'-концов праймеров включены для стабилизации двунитевой структуры концов амплификата. ПЦР проводили по следующей программе 94 °С – 5 мин; 35 циклов: 94 °С – 30 с, 50 °С – 30 с, 72 °С – 30 с; 72 °С – 10 мин. Продукты ПЦР фракционировали в 1,5 % агарозном геле и регистрировали результаты в ультрафиолетовом свете.

Для конструирования плазмид использовали рестриктазы BamHI, EcoRI и препарат ДНК-лигазы фага T4 производства фирмы «Sigma».

Трансформацию *E. coli* плазмидной ДНК, гидролиз ДНК рестриктазами, скрининг плазмид, электрофорез ДНК в агарозном геле осуществляли, как описано в работе [1].

Секвенирование проводили на автоматическом ДНК-секвенаторе ABI Prism 310 производства

Applied Biosystems с парой праймеров для секвенирования из набора поставки вектора pTrcHis2.

Белковый электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия ставили по У.К. Laemmli (ЭФ в ПААГ с ДСН) [10].

Для оценки индуцируемой экспрессии субъединицы В холерного токсина в 50 мл бульона LB, содержащего 50 мкг/мл ампициллина, инокулировали 1,0 мл исследуемой культуры. Бульонную культуру выращивали при температуре 37 °С при интенсивном встряхивании до оптической плотности 0,6 при длине волны 600 нм (клетки находятся в середине логарифмической фазы роста). После этого добавляли изопропил-d-тиогактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1 ммоль и продолжали культивирование. Пробы отбирали через каждый час в течение 10 ч от начала индукции. Клетки собирали центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин при температуре 4 °С, и готовили образцы для постановки белкового ЭФ в ПААГ с ДСН.

Реакцию двойной радиальной иммунодиффузии ставили по Оухтерлони [6]. В работе применяли сыворотку кроличью поликлональную против холерного токсина и препарат холерного токсина производства фирмы «Sigma».

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования нами была сконструирована плазида, состоящая из вектора pTrcHis2С и амплификата, полученного с парой праймеров SuB1 и SuB2, предназначенными для клонирования субъединицы В холерного токсина с сигнальной последовательностью и стоп-кодоном. Схема конструирования рекомбинантной плазмиды представлена на рис. 1.

Отобранные после трансформации клоновые культуры изучали с использованием скрининга на на-

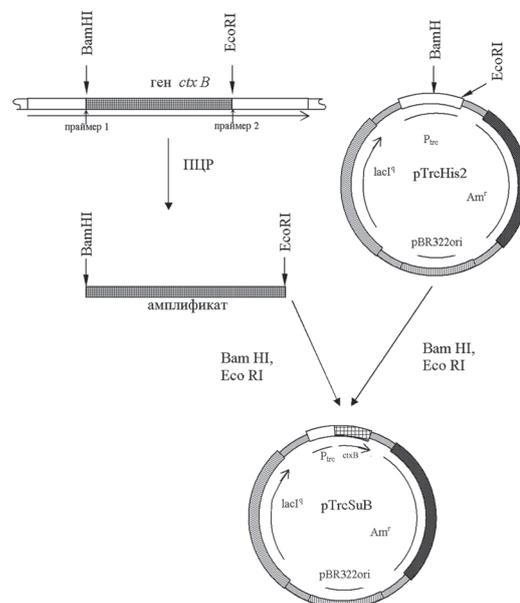


Рис.1. Схема конструирования рекомбинантной плазмиды

личие в них плазмид расчетного размера, а также с помощью ПЦР с праймерами, использовавшимися для клонирования. По результатам последующего секвенирования клонированного фрагмента среди прошедших отбор трансформантов были выбраны клоны с запланированной молекулярной конструкцией.

Экспрессию субъединицы В оценивали методом ЭФ в ПААГ с ДСН. По результатам электрофореза была установлена продукция белка с молекулярной массой 11,0–12,0 кДа. Это соответствует молекулярной массе субъединицы В холерного токсина – 11,6 кДа. Продукция рекомбинантного белка началась через 1 ч после добавления ИПТГ и достигала максимума к 5-му часу (рис. 2).

Для подтверждения того, что синтезируемый белок является субъединицей В холерного токсина использовалась реакция двойной радиальной иммунодиффузии по Оухтерлони (рис. 3).

Полученные результаты подтверждают, что под воздействием ИПТГ в штамме *E. coli* Top10 (pTrcSuB) происходит синтез субъединицы В холерного токсина.

Важной характеристикой полученного штамма-продуцента является стабильность рекомбинантной плазмиды pTrcSuB в неселективных условиях поддержания. Для изучения стабильности рекомбинантной плазмиды штамм пересевали на LB-бульоне без добавления в среду культивирования ампициллина. Затем производили бактериальный высев культуры на чашки Петри с LB-агаром как с антибиотиком, так и без него, и подсчитывали процент клеток, утративших устойчивость к ампициллину и, следовательно, плазмиду pTrcSuB. Было установлено, что стабильность плазмиды тесно связана с ее формой в бактериальной клетке. Мономерная форма плазмиды стабильно наследовалась в неселективных условиях. Однако при многочисленных перeseвах как в

неселективных, так и в селективных условиях происходило накопление клеток, утративших плазмиду в мономерной форме. Димерная и тримерная формы плазмиды оказались нестабильными и быстро элиминировались. При этом важно отметить следующее: с одной стороны, относительная нестабильность рекомбинантной плазмиды pTrcSuB является нежелательным признаком, затрудняющим поддержание штамма, с другой – эта особенность позволяет естественным образом освобождать в будущем организм вакцинируемого от рекомбинантного штамма.

Очевидно, что для изучения вопроса о возможности использования полученного штамма в качестве вакцинного становится важным его способность выживать в желудочно-кишечном тракте человека. Учитывая тот факт, что основной биомоделью при работе с холерой являются кролики (так называемая RITARD-технология [11]), нами была изучена способность штамма-продуцента выживать в кишечнике этих животных. Перед началом опыта исследовалась микрофлора кишечника животного по способности расти на LB-агаре с ампициллином в концентрации 100 мкг/мл, изучались также морфологические и тинкториальные свойства микрофлоры. Перед введением рекомбинантного штамма кроликам, используя желудочный зонд, в полость желудка вводили 15 мл 5 % раствора гидрокарбоната натрия. Еще через 15 мин повторно вводили 15 мл 5 % раствора гидрокарбоната натрия и 1,0 мл 10-миллиардной суспензии исследуемого штамма. Через каждые 12 ч повторяли опыт по изучению состава микрофлоры кишечника. Введенный штамм высевался в течение первых 24 ч, причем его концентрация в кишечнике неуклонно снижалась. По всей видимости, штамм *E. coli* Top10 (pTrcSuB) не способен размножаться в кишечнике кроликов, что не позволило нам провести опыт по оценке иммуногенности. Дальнейшая «генетическая

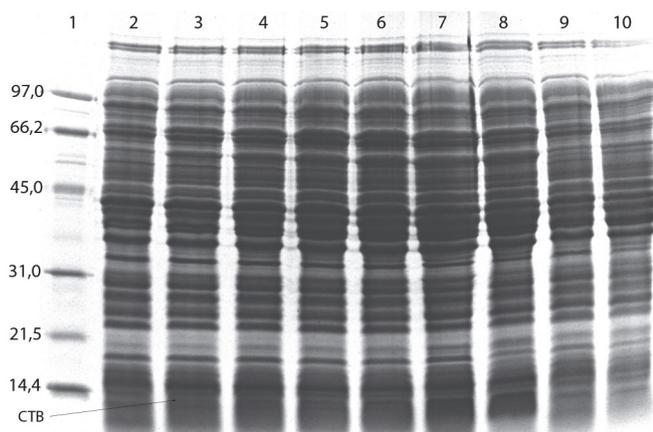


Рис. 2. Результаты индуцируемой экспрессии клонированного гена штаммом *E. coli* Top10 (pTrcSuB):

Дорожки: 1 – маркер молекулярных масс в кДа; 2–8 – пробы бульонной культуры через 0, 1, 2, 3, 4, 5 и 18 ч от начала индукции соответственно; 9, 10 – пробы бульонной культуры штамма *E. coli* Top10 через 0 и 18 ч от начала индукции (отрицательный контроль); CTB – рекомбинантный белок (субъединица В холерного токсина)

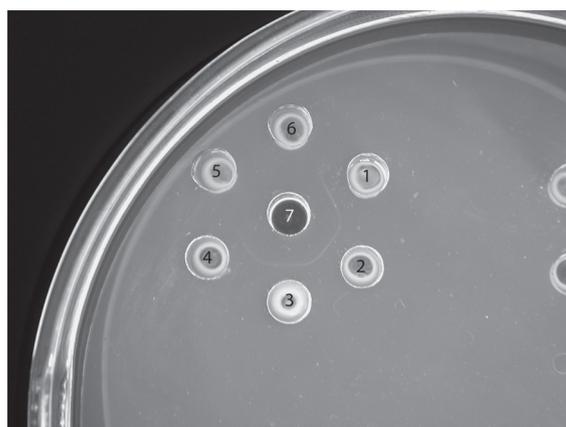


Рис. 3. Результаты реакции двойной радиальной иммунодиффузии штамма *E. coli* Top10 (pTrcSuB) через 5 ч после начала индукции:

1 – холерный токсин, 2 – штамм *E. coli* Top 10 (pTrcSuB) (разведение 1:2), 3 – штамм *E. coli* Top 10 (pTrcSuB) (разведение 1:4), 4 – штамм *E. coli* Top 10 (pTrcSuB) (разведение 1:8), 5 – штамм *E. coli* Top 10 (pTrcSuB) неиндуцированный, 6 – штамм *E. coli* Top 10 (отрицательный контроль), 7 – сыворотка к холерному токсину

доработка» штамма или использование в качестве носителя плазмиды pTrcSuB другого штамма, более устойчивого в естественных условиях, способного выживать в желудочно-кишечном тракте и обеспечить продукцию субъединицы В холерного токсина, позволит, на наш взгляд, продолжить разработку рекомбинантной холерной вакцины.

Таким образом, представленные в работе результаты свидетельствуют о принципиальной возможности использования сконструированного нами штамма-продуцента *E. coli* Top10 (pTrcSuB) в качестве вакцинного и перспективности исследований в данном направлении. Предложенная схема индукцибельной экспрессии протективных антигенов рекомбинантным штаммом представляется особенно эффективной при разработке холерных вакцин для перорального применения, так как позволит создать необходимую антигенную нагрузку, что, в свою очередь, приведет к развитию напряженного и продолжительного иммунитета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Девис Р., Ботстайн Д., Рот, Дж. Генетика бактерий. М.: Мир; 1984. 176 с.
2. Медуницын Н.В. Вакцинология. М.: Триада-Х; 1999. 272 с.
3. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: Медицина; 2009. 472 с.
4. Покровский В.И., редактор. Холера в СССР в период VII пандемии. М.: Медицина; 2000. 472 с.
5. Смирнова Н.И., Кобкова И.М., Ливанова Л.Ф., Чеховская Г.В., Коннов Н.П., Лозовский Ю.В. Экспрессия гомологичных и гетерологичных генов протективных антигенов в клетках штамма *Escherichia coli* M17, используемого для изготовления лечебно-профилактического препарата колибактерина. Биотехнология. 2006; 4:13–22.
6. Тертон М., Бангхем Д.Р., Колкотт К.А. Новые методы иммуноанализа. М.: Мир; 1991. 116 с.

7. Choi J. H., Lee S.Y. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004; 64(5):625–35.

8. Hase C.C., Thai L.S. Construction and characterization of recombinant *Vibrio cholerae* strains producing inactive cholera toxin analogs. Infect. Immun. 1994; 62(8):3051–7.

9. Kalambaheti T., Chaisri U., Srimanote P., Pongponratn E., Chaicumpa W. Immunogenicity and protective role of three formulations of oral cholera vaccine. Vaccine. 1998; 16(2–3):201–7.

10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227(5259):680–5.

11. Spira W.M., Sack R.B., Froehlich J.L. Simple adult rabbit model for *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea. Infect. Immun. 1981; 32(2):739–47.

D.S.Yanov, S.N.Klinova, A.V.Mironin, I.V.Zhivov, I.P.Pogorelsky,
V.I.Drobkov, Yu.N.Fedorov, Ya.A.Kibirev

Development of Methodic Approach to Construction of Recombinant Strain, Producer of the Cholera Toxin B Subunit

48 Central Research Institute of the Ministry of Defense
of the Russian Federation, Kirov

Presented are the results of experiments on the construction of *Escherichia coli* Top10 (pTrcSuB) strain, perspective for the development of recombinant cholera vaccine for peroral use. The obtained strain possesses inducible expression of cholera toxin B subunit. Peculiarities of cloned gene expression in strain-producer and the conditions of its maintaining were studied. The proposed approach will allow to obtain effective and safe cholera vaccines.

Key words: recombinant vaccine, inducible expression, cholera toxin B subunit, vector.

Об авторах:

Янов Д.С., Клинова С.Н., МIRONIN А.В., Живов И.В., Погорельский И.П., Дробков В.И., Федоров Ю.Н., Кибирев Я.А. ФГУ «48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации». Киров.

Authors:

Yanov D.S., Klinova S.N., Mironin A.V., Zhivov I.V., Pogorelsky I.P., Drobkov V.I., Fedorov Yu.N., Kibirev Ya.A. 48 Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Kirov.

Поступила 16.02.10.

Л.П.Базанова, Г.А.Воронова, С.А.Косилко

**ВЗАИМООТНОШЕНИЯ ЧУМНОГО МИКРОБА И БЛОХ
ИЗ ГЕОГРАФИЧЕСКИ РАЗОБЩЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ**

ФГУЗ «Научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск

Исследованы особенности взаимоотношений чумного микроба из Хэнтейского природного очага Монголии и блох *Citellophilus tesquorum* трех географических популяций: «Забайкальской» и «Тувинской» из природных очагов чумы и «Ольхонской» – из неочаговой по чуме территории. Выявлена возможность установления функциональных контактов (возбудитель – переносчик) между чумным микробом и блохами из географически разобщенных популяций очаговой территории. Чумной микроб, циркулирующий на территории Хэнтейского природного очага Монголии, может формировать «блоки» преджелудка у *C. tesquorum* из Забайкалья и Тувы, а зараженные насекомые – осуществлять передачу возбудителя животным с генерализацией у них инфекционного процесса. Это предполагает возможность циркуляции чумного микроба из Монголии с участием *C. tesquorum* в случае его заноса на территорию Забайкалья, а также Тувы.

Ключевые слова: *Citellophilus tesquorum*, блоха, природный очаг чумы Монголии.

Межпопуляционная дифференциация, выявляемая по биологическим особенностям блох, предполагает их неоднородность в плане взаимоотношений с возбудителем чумы, что может оказывать влияние на течение и параметры эпизоотического процесса [3, 5]. Сибирские природные очаги чумы являются северной окраиной Центрально-Азиатской зоны природной очаговости этой инфекции, простирающейся в Монголии и Китае. В некоторых из них роль основных переносчиков играют одни и те же виды блох, например, *Citellophilus tesquorum* в Забайкалье, Туве и Монголии. Территориальная близость очагов Монголии, Забайкалья и Тувы не исключает возможность заноса микроба с одной территории на другую.

Цель работы – изучение способности *C. tesquorum* из сибирских регионов к инфицированию, образованию блока преджелудка возбудителем чумы, циркулирующим в Монголии, передаче его зверькам, и оценка возможности развития локальных эпизоотий на территории Сибири.

В опыте использованы *C. tesquorum* разных географических популяций: «Тувинской» и «Забайкальской» – из природных очагов чумы, «Ольхонской» – с неочаговой по чуме территории (Ольхонский район Иркутской области). Эктопаразитов инфицировали на биомембране чумным микробом (штамм И-3230) из Хэнтейского природного очага чумы Монголии, изолированным от *C. tesquorum* в 1988 г. Исходная зараженность блох «Тувинской» и «Забайкальской» популяций составила 100 %, «Ольхонской» – 70 %. Проведено 10 периодических (через 2–3 сут.) подкормок эктопаразитов. Между подкормками насекомых содержали при температуре 18–20 °С и относительной влажности воздуха 80–90 %. Продолжительность опытов составила 32 дня.

В экспериментальных группах после каждого кормления учитывали долю пивших и погибших

блох, а также особей со сформировавшимися конгломератами чумного микроба: «глыбками», полными и частичными «блоками» преджелудка. Частоту блокообразования оценивали по отношению количества блох с «блоком» к числу насекомых при первой подкормке. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью стандартных методов с применением программы «Excel». Использовали критерий Стьюдента и однофакторный дисперсионный анализ, в котором за наблюдение в ячейке приняты исследуемые показатели, полученные при каждой отдельной подкормке.

Дисперсионный анализ не выявил существенно-го влияния фактора «популяция» на алиментарную активность блох ($F=2,746$, $P>0,05$). Средняя за подкормку доля пивших блох из разных популяций колебалась в пределах 85,8–93,6 % у самок и 91,6–95,6 % у самцов.

Средняя за подкормку доля погибших особей была несколько ниже среди эктопаразитов из Тувы – 3,4 % у самцов и 8,4 % – у самок, соответственно у «Забайкальской» популяции – 5,6 и 15,5 %, у «Ольхонской» – 4,2 и 12,7 %. В целом за опыт погибло (от числа имаго при первой подкормке) *C. tesquorum* «Тувинской» популяции 39,0 %, «Забайкальской» – 54,6 %, «Ольхонской» – 56,8 %. Смертность блох из Тувы была достоверно ниже, чем из Забайкалья ($t=3,51$, $P<0,001$) и Ольхона ($t=3,91$, $P<0,001$). Доля погибших самцов всех популяций была выше, чем самок (для «Тувинской» популяции $t=4,63$, $P<0,001$; «Забайкальской» $t=6,71$, $P<0,001$; «Ольхонской» $t=2,90$, $P<0,01$).

С помощью дисперсионного анализа установлено влияние фактора «популяция» на частоту формирования бактериальных «глыбок» у блох ($F=12,018$, $P<0,001$). Средняя за подкормку доля особей с «глыбками» была выше среди *C. tesquorum* «Забайкальской» популяции – 44,8 %. У блох

«Тувинской» и «Ольхонской» популяций чумной микроб формировал «глыбки» с примерно равной частотой – 17,2 и 14,9 %, однако у имаго с Ольхона не зарегистрировано блокообразование.

По частоте блокообразования *C. tesquorum* из Забайкалья превосходили особей из Тувы более чем в пять раз. Так, «блок» преджелудка сформировался у 27,2 % блох «Забайкальской» популяции и 5,2 % – «Тувинской». Различия между популяциями по данному признаку достоверны ($t=6,38$, $P<0,001$).

Динамика формирования бактериальных «глыбок» и «блока» преджелудка различалась у представителей разных популяций. Начало образования «глыбок» у особей из Тувы отмечено после первой подкормки, из Забайкалья и Ольхона – после второй. «Глыбки» у насекомых всех популяций выявляли до конца опыта. Максимум особей с «глыбками» среди имаго «Забайкальской» популяции (77,0 %) зарегистрирован на 11-е, «Тувинской» (32,4 %) – на 13-е, «Ольхонской» (23,9 %) – на 25-е сутки.

Образование блока преджелудка у блох «Тувинской» популяции наблюдалось в течение 13, «Забайкальской» – 24 сут. Формирование «блока» преджелудка у блох из Тувы происходило достаточно равномерно (1,1–1,9 % от пивших особей за одну подкормку). Доля заблокированных блох «Забайкальской» популяции после первых шести подкормок составляла 2,1–4,8 %, начиная с седьмой (20 сут) она увеличивалась с каждой подкормкой (от 10,0 до 12,9 %) и достигла максимального значения (16,7 %) в конце опыта.

Все экспериментальные группы насекомых осуществили передачу возбудителя чумы лабораторным животным. Однако трансмиссия микроба насекомыми разных популяций имела свои особенности. Так, блохи «Забайкальской» популяции передали возбудителя чумы семи, а «Тувинской» – трем зверькам из десяти. При этом у всех павших животных, на которых кормили блох, отмечена генерализованная форма инфекции. По числу передач возбудителя (по три передачи) «Тувинская» и «Ольхонская» популяции не различались, но передача чумного микроба насекомыми с Ольхона не сопровождалась гибелью мышей, а приводила к выработке антител, титры которых составили 1:40, 1:320 и 1:160 в реакциях РПГА-РНАг.

Таким образом, сравнение эколого-физиологических характеристик *C. tesquorum* из разных географических популяций показало, что при кровососании на белых мышах алиментарная активность инфицированных насекомых не имела существенных различий. При кормлении на биомембране менее активными были блохи «Ольхонской» популяции, что отразилось на их исходной зараженности. Более высокая выживаемость в опыте отмечена у *C. tesquorum* из Тувы, что подтверждает данные [1] о способности этих блох к переживанию неблагоприятных условий окружающей среды, в том числе низких температур. Установлено, что чумной микроб из Монголии формировал «глыбки» и «блоки пред-

желудка» в организме *C. tesquorum* «Забайкальской» популяции значительно чаще, чем у особей из других популяций. У них отмечена и самая высокая векторная способность. Необходимо отметить, что эти блохи происходят от имаго, добытых на участке Забайкальского природного очага, расположенном близко к границе с Монголией. В анализируемом опыте частота блокообразования у *C. tesquorum* из Забайкалья достигала 27,2 %. Это значительно превысило таковую у блох, добытых с другого участка Забайкальского очага (3–4 %) и инфицированных типичным для данного очага штаммом (И-2621) возбудителя чумы [6]. У *Xenopsylla cheopis* – классического объекта экспериментальных исследований, инфицированных исследуемым штаммом (И-3230) чумного микроба, этот показатель равнялся 9,2 % [2], что в три раза ниже, чем у особей *C. tesquorum* «Забайкальской» популяции. Полученные данные позволяют предположить возможность циркуляции чумного микроба из Монголии в случае его заноса на пограничную территорию Забайкалья с участием *C. tesquorum*, которые могут являться высокоэффективными переносчиками.

У *C. tesquorum* из Тувинского природного очага возбудитель чумы из Монголии также формировал бактериальные «глыбки» и «блок» преджелудка, а инфицированные блохи осуществляли трансмиссию микроба с генерализацией инфекционного процесса у животных. Частота блокообразования у *C. tesquorum* из Тувы (5,2 %) не превышала средний показатель (5,8 %), установленный для этих блох ранее. Результаты эксперимента свидетельствуют о способности возбудителя чумы из Монголии приживаться в организме основного переносчика из Тувинского природного очага, что может привести к дополнительной активизации эпизоотий при его заносе на территорию этого очага.

У блох «Ольхонской» популяции «глыбки» формировались с не меньшей частотой, чем у особей из Тувы, но в более поздние сроки. Однако у них не отмечено образование «блока» преджелудка, а у животных, на которых кормили зараженных имаго, генерализации инфекционного процесса. В то же время имеются данные, что у *C. tesquorum* с других неочаговых по чуме территорий наблюдались формирование «блока» преджелудка и передача возбудителя лабораторным животным [4]. Вероятность и условия циркуляции микроба в популяциях грызунов и насекомых с неочаговой по чуме территории требуют более детального изучения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Базанова Л.П., Маевский М.П. Длительность сохранения чумного микроба в организме блохи *Citellophilus tesquorum altaicus*. Мед. паразитол. 1996; 1:45–8.
2. Воронова Г.А., Базанова Л.П. О возможности возникновения локальных эпизоотий на территории Сибири при заносе возбудителя чумы из Монголии. Журн. инф. патологии. 2009; 16(3):88.
3. Князева Т.В., Топорков В.П., Бережнов А.З. и др. Сравнение эффективности передачи чумы блохами малого суслика из разных природных популяций. В кн.: Природная очаговость, микробиол.

и профилакт. зоонозов. Саратов; 1989. С. 116–21.

4. Никитин А.Я., Базанова Л.П. Бюл. ВСНЦ СО РАМН. Иркутск, 2003; 3:152–5.

5. Сержанов О.С., Хрусцелевская Н.М., Чумаченко В.Д. и др. Блокообразование у блох *Xenopsylla gerbilli caspia* из различных ландшафтно-экологических участков Кызылкумов. Пробл. особо опасных инф. 1979; 4:58–60.

6. Феоктистов А.З., Даниленко А.Ф., Юзвик Л.Н. и др. Эффективность массовых видов блох Забайкалья как переносчиков чумы. В кн.: Докл. Иркут. противочум. ин-та. Чита; 1974. Вып. X. С. 206–8.

L.P.Bazanova, G. A. Voronova, S.A.Kosilko

Interrelations of Plague Microbe and Fleas from Geographically Separated Populations

Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk

Studied were the peculiarities of interrelations of plague microbe from Hentei natural focus of Mongolia and fleas *Citellophilus tesquorum* of three geographic populations (“Zabaikalskaya” and “Tuvinskaya” from the natural plague foci and “Olkhonskaya” from plague-free territory. The functional con-

tacts (etiological agent – vector) between the plague microbe and fleas from geographically separated populations from the focal territory were shown to be possible. Plague microbe that circulates in the territory of Hentei natural focus in Mongolia can form the proventriculus block in *C. tesquorum* from Trans-Baikal and Tuva. The infected insects can transfer the agent to animals that subsequently suffer from generalized infectious process. These data assume the possibility of *C. tesquorum*-mediated circulation of plague microbe from Mongolia in case of its import to the Trans-Baikal Region and to Tuva.

Key word: *Citellophilus tesquorum*, flea, natural plague foci of Mongolia.

Об авторах:

Базанова Л.П., Воронова Г.А., Косилко С.А. Научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. 664047, Иркутск, Трилисера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Authors:

Bazanova L.P., Voronova G. A., Kosilko S.A. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 664047, Irkutsk, Trilissera St., 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Поступила 19.02.10.

И.В.Сергеева

ГРИПП А(Н1N1) 2009 НА ТЕРРИТОРИИ КРАСНОЯРСКА

*ГОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет
имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения и социального развития»*

В статье приведены результаты анализа историй болезней пациентов с диагнозом грипп типа А, вызванный вирусом А(Н1N1) 2009. Наибольшая восприимчивость к заболеванию регистрируется среди лиц молодого возраста – 16–29 лет. При гриппе А(Н1N1) 2009 ведущим симптомом, наряду с интоксикацией, является сухой, приступообразный кашель. Тяжелое течение заболевания с развитием осложнений регистрируется в возрастной группе 24–44 лет. Группой риска являются беременные женщины и пациенты с метаболическим синдромом.

Ключевые слова: грипп А(Н1N1) 2009, эпидситуация, диагностика, лечение.

В структуре инфекционных болезней грипп и ОРВИ занимают ведущее место и составляют в период эпидемии 10–50 % причин всей временной нетрудоспособности населения, а в остальное время – более 80 % всей инфекционной патологии. Антигенная структура вируса гриппа сложна, и на основании антигенных различий вирусы гриппа разделяют на три типа: А, В и С. Наибольшей изменчивостью обладает вирус гриппа типа А. В состав оболочки вириона гриппа А входят гликопротеид гемагглютинин (Н), липиды, энзим нейраминидаза (N), которые определяют его антигенные свойства. В человеческой популяции циркулирует 3 варианта Н и два варианта N, которые и дают «название» вирусу (Н1N1, Н2N2, Н1N2, Н3N2). Однако птицы и животные являются резервуаром вируса гриппа, имеющего 16 вариантов Н (Н1–Н16) и 9 – N (N1–N9).

В марте–апреле 2009 г. весь мир с напряженным вниманием следил за появлением и распространением нового свиного гриппа. В Мексике штамм гриппа подтипа А(Н1N1) – «Калифорния 04/2009», вызывающий заболевание свиней, приобрел способность передаваться не только от свиньи к свинье, но и от свиньи к человеку, а также от человека к человеку. Это высокопатогенный вирус. В связи с его массовой передачей внутри человеческой популяции Всемирная организация здравоохранения 9 июня 2009 г. объявила пандемию гриппа.

В Красноярске подъем заболеваемости начался с середины октября, максимальное количество заболевших зарегистрировано в ноябре. Всего в Красноярском крае было 5799 случаев ОРВИ и гриппа, из них 1496 случаев подтвержденного высокопатогенного гриппа А(Н1N1) 2009. В инфекционные и перепрофилированные для ОРВИ терапевтические отделения МУЗ ГКБ № 6 им. Н.С.Карповича было госпитализировано 849 больных, среди них обследованы на грипп 627 больных, у 380 (60,6 %) – подтвержден диагноз гриппа.

Цель исследования. Выявить клинико-эпидемиологические особенности гриппа А(Н1N1) 2009 на территории Красноярска.

Материалы и методы

Нами проанализировано 380 историй болезней пациентов с диагнозом грипп (по материалам инфекционных отделений МУЗ ГКБ № 6 им. Н.С.Карповича). Из них 336 (88,4 %) случаев гриппа А(Н1N1) 2009 и 44 (11,6 %) – сезонного гриппа типа А или В. Среди обследованных: мужчин – 231 (60,8 %), женщин – 149 (39,2 %), из них – 48 (32,2 %) беременных. Возрастная структура: 15–18 лет – 178 пациентов (46,8 %), 19–29 лет – 157 (41,3 %), 30–44 лет – 30 (8 %), 45–55 лет – 10 (2,6 %) и старше 56 лет – 5 (1,3 %).

Диагноз гриппа был поставлен на основании клинико-эпидемиологических проявлений, подтвержден ПЦР, вирусологическими и серологическими методами. Исследовали сыворотки крови, мазки и смывы из носоглотки и ротоглотки, которые забирались у пациентов сразу при поступлении и при необходимости – в динамике заболевания.

Результаты исследования

Первые случаи заболевания возникли в возрастной прослойке 15–18 лет среди студентов и учащихся средних и высших учебных заведений, проживающих в общежитиях, что способствовало быстрому распространению инфекции. Затем заболевание отмечалось среди сотрудников учебных заведений и медицинских работников, которые находились в очагах инфекции. За 1,5–2 недели порог заболеваемости ОРВИ и гриппом был превышен на 50 %, вспышки гриппа А(Н1N1) 2009 регистрировались в четырех средних и высших учебных заведениях Красноярска, в нескольких войсковых частях. Рост заболеваемости был отмечен в различных возрастных группах, но в основном это были пациенты 15–29 лет (88,16 % заболевших). Данные специфических исследований (вирусологических, серологических, ПЦР-анализа,) свидетельствовали о вытеснении циркулирующих сезонных штаммов вируса гриппа новым высокопатогенным вирусом гриппа типа А – А(Н1N1) 2009 (у 60,6 % обследованных).

Анализ клинических проявлений гриппа А(Н1N1) 2009 выявил, что у всех больных заболевание начиналось остро: появлялись симптомы интоксикации и катаральные явления. Повышение температуры тела до 37,5 °С отмечалось у 78 пациентов (23,2 %), до 37,5–38,9 °С – у 209 (62,2 %) и выше 39,0 °С – у 49 (14,6 %). Слабость и снижение работоспособности регистрировались в 100 % случаев. Головная боль слабая – у 36 пациентов (10,7 %), умеренная – у 143 (42,6 %), интенсивная – у 114 (34 %). Головокружение отмечалось у 131 пациента (39 %), миалгии и артралгии – у 164 (48,8 %).

Ведущим симптомом с первых часов заболевания был сухой, приступообразный кашель (у 295 пациентов – 87,8 %); 28 пациентов (8,3 %) отмечали сухой кашель до повышения температуры и появления других симптомов. Катаральные явления характеризовались необильными слизистыми выделениями из носа или заложенностью носа, умеренной гиперемией ротоглотки с зернистостью задней стенки глотки у всех больных. Явления склерита регистрировали у 86 пациентов (25,6 %), боли при движении глазных яблок – только у 22 пациентов (6,5 %). У всех больных с первых дней болезни при аускультации легких отмечено жесткое дыхание, у 192 пациентов (57,1 %) при рентгенологическом исследовании выявлено усиление легочного рисунка за счет сосудистого компонента. Эти проявления регистрировались даже при скудных катаральных явлениях и отсутствии кашля, что свидетельствовало о развитии раннего отека легочной ткани, осложненного трахеобронхитом или вирусной пневмонией.

Жидкий стул до 2–8 раз в сутки в течение первых трех дней отмечали у 36 пациентов (10,7 %) на 3–5-й день болезни на фоне противовирусной и антибактериальной терапии.

Госпитализация осуществлялась в различные сроки. Так, на 1–2-е сутки от начала заболевания было госпитализировано 257 пациентов (67,63 %), на 3–4-е сутки – 105 (27,63 %), позднее 5-х суток – 18 (4,73 %).

У 49 пациентов (14,6 %) имело место тяжелое течение гриппа, что было обусловлено развитием осложнений. Чаще всего это были пневмонии (у 42 пациентов – 85,7 %). Энцефалитический синдром (судороги на высоте лихорадки) отмечался у 2 пациентов. Явления менингизма (стойкая головная боль, тошнота, рвота, ригидность затылочных мышц) регистрировались у 8 больных (в возрасте 15–23 лет). У одного пациента на первой неделе заболевания развился постгриппозный миокардит. При среднетяжелом течении гриппа осложнения развились по типу трахеобронхита у 234 пациентов (69,6 %), синусита – у 68 (20,1 %).

Особое внимание уделялось беременным женщинам, как группе риска по развитию тяжелой пневмонии с возможным летальным исходом. Всего было госпитализировано 102 беременные женщины, грипп А(Н1N1) 2009 диагностирован у 46, а сезон-

ный грипп типа А – у 2 пациенток. В первом триместре (до 12 недель) поступило 16 (34,8 %) пациенток: легкое течение гриппа отмечалось у 2 (12,5 %), среднетяжелое – у 13 (81,2 %), тяжелое с развитием пневмонии – у 1 (6,3 %). У 2 беременных была диагностирована замершая беременность на сроках 5 и 8 недель, у 1 беременной – угроза выкидыша. Во втором триместре (13–24 недели) поступило 16 пациенток (34,8 %): у 3 (18,8 %) регистрировалось легкое течение заболевания, у 12 (75 %) – среднетяжелое течение, у 1 (6,2 %) – тяжелое течение гриппа, осложненного пневмонией. Во втором триместре беременности патологии плода не диагностировались. В третьем триместре (25–40 недель) поступило 14 пациенток (30,4 %): у 2 (14,3 %) – легкое течение, у 9 (64,3 %) – среднетяжелое, у 3 (21,4 %) – тяжелое, с развитием двухсторонней пневмонии и плеврита. У 1 беременной на 37-й неделе произошли преждевременные роды. Осложнения (пневмонии и плевропневмония) отмечались у 5 пациенток (10,7 %), что было связано с поздней госпитализацией (на 5–7-й день болезни); трахеобронхит зарегистрирован у 34 пациенток (73,9 %), гайморит – у 3 (6,6 %). Наибольшее количество осложнений (18,8 %), связанных с развитием и вынашиванием беременности, было диагностировано в первом триместре беременности.

Летальные исходы зарегистрированы у 5 пациентов (1,5 %): 4 женщины (24, 28, 43 и 44 лет) и одного мужчины 32 лет. При этом в 2 случаях имела место поздняя госпитализация (на 5–6-й день болезни). Причиной смерти послужили двусторонняя тотальная пневмония и инфекционно-токсический шок. Следует отметить, что летальные исходы были у пациентов с неблагоприятным преморбидным фоном: выраженный метаболический синдром (ожирение IV степени), острый лейкоз.

С первого дня поступления в инфекционное отделение все больные получали противовирусную терапию: тамифлю (в том числе беременные, независимо от срока беременности); реленза, арбидол, что позволило избежать тяжелых осложнений. Антибактериальную терапию назначали 89,5 % пациентов при развитии осложнений (трахеобронхит, отит, синусит, пневмония), профилактику осложнений проводили с первых дней заболевания. При тяжелых пневмониях одновременно назначали два или три антибактериальных препарата.

Таким образом, на территории Красноярск за короткий промежуток времени произошло вытеснение сезонных штаммов вируса гриппа высокопатогенным вирусом А(Н1N1) 2009. Наиболее уязвимыми к гриппу, вызванному вирусом А(Н1N1) 2009, оказались лица молодого возраста – 16–19 лет (88,2 % заболевших). Осложнения со стороны нервной системы (явления менингизма и энцефалитический синдром), миокардит регистрировались у пациентов 15–23 лет; осложнения со стороны дыхательных путей (в том числе пневмонии) – у возрастной группы 25–44 лет, что свидетельствует о наибольшей восприимчивости

к гриппу, вызванному вирусом А(Н1N1) 2009, людей молодого возраста. В большинстве случаев (85,4 %) грипп А(Н1N1) 2009 протекал в легкой и среднетяжелой формах заболевания. К группе риска при гриппе по развитию осложнений и неблагоприятных исходов заболевания относятся беременные женщины и пациенты с метаболическим синдромом (ожирением). Осложнения, в том числе летальные исходы, обусловлены поздней госпитализацией (5–6 день болезни), тяжестью течения болезни, сопутствующими заболеваниями и ошибками по ведению больных на догоспитальном этапе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Бектимиров Т.А. Рекомендации ВОЗ и международных форумов по тактике борьбы с гриппом в связи с возможной пандемией. Бюл. Вакцинация. 2003; 3(27):1–5.
2. Карпухин Г.И., редактор. Грипп. Руководство для врачей. СПб: Гиппократ; 2001. 360 с.
3. Карпухин Г.И., Карпухина О.Г. Диагностика, профилактика и лечение острых респираторных заболеваний. СПб: Гиппократ; 2000. 184 с.
4. Королук А.М., Сбойчаков В.Б., редакторы. Медицинская вирусология. СПб: ЭЛБИ-СПб; 2002. 164 с.
5. Рекомендации главного внештатного специалиста по инфекционным болезням МЗ и СР РФ В.В. Малеева по результатам работы в ЛПУ Забайкальского края от 4.11.2009 г.
6. Ратникова Л.И., Стенько Е.А. Новый подход к терапии острых респираторных вирусных инфекций и гриппа. Поликлиника. 2009; 2:70–2.
7. CDC. Pregnant Women and Novel Influenza A (H1N1) Virus:

Considerations for Clinicians. June 30, 2009. Available from: http://www.cdc.gov/h1n1flu/clinician_pregnant_guidance.htm

8. CDC. Updated Interim Recommendations for Obstetric Health Care Providers Related to Use of Antiviral Medications in the Treatment and Prevention of Influenza for the 2009–2010 Season. October 23, 2009. Available from: http://www.cdc.gov/h1n1flu/pregnancy/antiviral_messages.htm

I.V.Sergeeva

A(H1N1) 2009 Flu in the Territory of Krasnoyarsk*Krasnoyarsk State Medical University*

The results of analysis of case records of patients with type A flu, caused by A(H1N1) 2009 virus are presented. The greatest susceptibility to the disease is registered among young people of 16–20 years old. Dry paroxysmal cough and intoxication are shown to be the main symptoms of A(H1N1) 2009 flu. Severe course of the disease with complications is registered in the 24–44-year-old age group. The risk group includes pregnant women and patients with metabolic syndrome.

Key words: A(H1N1) 2009 flu, epidemiological situation, diagnostics, treatment.

Об авторах:

Sergeeva I.V. Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого. 660100, Красноярск, ул. Кравченко 2-275. E-mail: infeccia7979@mail.ru

Authors:

Sergeeva I.V. Voino-Yasenchkiy State Medical Institute. 660100, Krasnoyarsk, Kravchenko St., 2–275. E-mail: infeccia7979@mail.ru

Поступила 14.09.10.

**РЕЗОЛЮЦИЯ
X МЕЖГОСУДАРСТВЕННОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
«АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ И ЛИКВИДАЦИИ ПОСЛЕДСТВИЙ
ЧРЕЗВЫЧАЙНЫХ СИТУАЦИЙ НА ТЕРРИТОРИИ ГОСУДАРСТВ-УЧАСТНИКОВ
СОДРУЖЕСТВА НЕЗАВИСИМЫХ ГОСУДАРСТВ»**

6 октября 2010 г.

Российская Федерация, г. Ставрополь

Участники X Межгосударственной научно-практической конференции «Актуальные проблемы предупреждения и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций на территории государств-участников Содружества Независимых Государств» от Азербайджанской Республики, Республики Армения, Республики Беларусь, Республики Казахстан, Кыргызской Республики, Российской Федерации, Республики Таджикистан, Республики Узбекистан, Украины, Исполкома СНГ и ВОЗ по результатам обсуждения проблем, соответствующих тематике конференции, констатировали общность задач в отношении предупреждения и ответных мер на чрезвычайные ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения в современных условиях.

Актуальность их решения определяется широким спектром угроз, исходящих от новых (неизвестных), возвращающихся (известных) и других, значимых в социально-экономическом отношении, опасных инфекционных болезней, а также неинфекционных заболеваний, ассоциируемых с чрезвычайными ситуациями в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения и требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории.

На конференции обсуждены вопросы неуклонного количественного роста чрезвычайных ситуаций и рисков их возникновения в условиях стихийных бедствий (землетрясения, наводнения, засухи, пожары) и техногенных и социальных катастроф.

Особую обеспокоенность вызвала угроза возвращения полиомиелита в страны Восточной Европы и Центральной Азии (Европейское региональное бюро ВОЗ), получившие с 2002 г. статус свободных от этой инфекционной болезни территорий. Во второй половине апреля 2010 г. зарегистрирована вспышка полиомиелита, вызванная «диким» полиовирусом, в Республике Таджикистан (на 17 сентября – 456 подтвержденных случаев и 20 летальных исходов – 65 % всех случаев полиомиелита в мире) с заносами болезни в другие страны СНГ. По данным ВОЗ Российская Федерация в беспрецедентно короткие сроки оказала Таджикистану необходимую помощь в расшифровке ситуации, организации и проведении противоэпидемических и санитарно-профилактических мероприятий.

Сохраняется угроза новой волны гриппа А(H1N1)-09, пандемия которого в 2009 г. была опре-

делена ВОЗ как чрезвычайная ситуация в области общественного здравоохранения международного значения. Российской Федерацией продолжается инициация процедуры ВОЗ по созданию на базе ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», сотрудничающего Центра ВОЗ, по референс-диагностике и изучению гриппа для стран Восточной Европы и Центральной Азии. В 2009 г. ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» назначен Референс-лабораторией ВОЗ по гриппу А/H5N1/ для стран Восточной Европы и Центральной Азии. Выполнен план 1-го года из 2-летнего плана демонстрационной работы ГНЦ ВБ «Вектор» в качестве кандидатного СЦ ВОЗ по гриппу. Ведется подготовка к реализации плана 2-го года совместных действий с Глобальной программой ВОЗ по гриппу.

Напряженной является эпидемиологическая обстановка по ряду природно-очаговых инфекционных болезней. Расширяется ареал возбудителя и регистрируются эпидемические вспышки лихорадки Западного Нила. Сохраняется эпидемическая напряженность в отношении Крымской геморрагической лихорадки, геморрагической лихорадки с почечным синдромом. На пространстве СНГ регистрируются вспышки сибирской язвы, требующие неотложного проведения санитарно-ветеринарных, санитарно-профилактических, противоэпидемических мероприятий, усиления национального и межгосударственного эпидемиологического надзора. Сохраняется угроза возникновения заболеваний чумой, в том числе в связи с эпизоотической активностью ее природных очагов и возможного заноса этой болезни из сопредельных стран (Китай, Монголия). Существует и реализуется угроза заносов холеры на пространстве СНГ. В 2010 г. зарегистрированы 3 заноса холеры в Российскую Федерацию из Индии. В 2010 г. зарегистрированы 2 заноса лихорадки Денге на территорию Российской Федерации из Индонезии (о. Бали) и Таиланда.

Конференция отмечает очевидную необходимость и обоснованность реализации современной глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями, выражающейся, прежде всего, в повышении эффективности контроля за инфекциями путем приближения высококвалифицированной медицинской помощи к населению и высвобождения ресурсов для предупреждения и ответных мер в отношении новых инфекций и чрезвычайных ситуаций с катастрофическими социально-экономическими последствиями.

На конференции констатировано, что в основу современной эффективной глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями легли инициативы Российской Федерации на саммитах стран «Группы восьми» (Россия, 2006; Германия, 2007; Япония, 2008; Италия, 2009; Канада 2010), а также положения Международных медико-санитарных правил (2005 г.). Реализация решений указанных саммитов является одним из ключевых направлений деятельности стран СНГ в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения и санитарной охраны территорий.

Наиболее действенным и перспективным «инструментом» совершенствования профилактики и борьбы с чрезвычайными ситуациями санитарно-эпидемиологического характера является формирование и развитие инновационных направлений во всех функциональных сферах скрининга, мониторинга и контроля чрезвычайных ситуаций.

На конференции обсуждены вопросы эффективного внедрения современных технологий для предупреждения и ответных мер на ЧС – информационно-аналитических (ГИС), диагностических, профилактических, производственных. Подчеркнута перспектива внедрения в практику постгеномных, мультиплексных, микрообъемных технологий, методов и средств, основанных на использовании нанотехнологий и наноматериалов, а также необходимость разработки диагностических стандартов.

Между Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Российская Федерация) и Министерствами здравоохранения Республики Беларусь, Азербайджанской Республики, Республики Армении, Кыргызской Республики, Республики Казахстан, Республики Таджикистан, Республики Узбекистан и Украины существует и активно реализуется прочная договорная база в области мониторинга гриппа птиц и подготовки к пандемии гриппа. В ее рамках осуществлены поставки оборудования для укрепления вирусологических лабораторий стран, подписавших соглашения, на общую сумму более 2 млн. долларов США.

Действует договорная система между ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» и Национальными центрами по гриппу Республики Казахстан, Украины, Республики Узбекистан и Республики Беларусь в области мониторинга гриппа птиц и подготовки к пандемии гриппа.

Для повышения эффективности системы лабораторной диагностики инфекционных болезней в Российской Федерации приказом Роспотребнадзора создана и функционирует система мониторинга возбудителей инфекционных и паразитарных болезней, включающая 5 видов центров федерального и регионального уровней со стандартным оснащением и номенклатурой диагностических исследований. Оснащение центров современным технологическим оборудованием осуществляется в рамках ФЦП «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–

2013 годы)».

В порядке реализации решений саммита «Группы восьми» (2006 г.) и во исполнение распоряжения Правительства Российской Федерации от 21 мая 2007 г. № 642-р в 2010 г. завершена модернизация 10 СПЭБ противочумных учреждений Роспотребнадзора, что явилось прорывом в сфере оперативного реагирования на ЧС, не имеющим аналогов в мире.

Внедрение технологии оперативного реагирования на ЧС с участием СПЭБ на пространстве СНГ предусмотрено в 2 документах, представленных для рассмотрения в Исполком СНГ:

- Соглашение о сотрудничестве государств-участников СНГ при ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения с участием российских специализированных противоэпидемических бригад;

- Положение о Межгосударственном информационно-аналитическом центре по вопросам оперативного оповещения и реагирования на чрезвычайные ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения государств-участников СНГ.

В целях обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения планируется участие СПЭБ в международных мероприятиях, таких как саммит АТЭС-2012 г. во Владивостоке, XXVII Всемирная Универсиада-2013 г. в Казани, зимняя Олимпиада-2014 г. в Сочи.

В рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению Международных медико-санитарных правил (2005 г.) до 2014 г. и 2016 г. разработана методология и алгоритм реализации ММСП (2005 г.) на национальном уровне (на примере Российской Федерации), позволяющие унифицировать оценку степени «перегрузки» национальных систем контроля ЧС в соответствии с ММСП (2005 г.). Методология основана на поэлементном учете внедрения концептуальной новизны ММСП (2005 г.) и замене утративших актуальность принципов ММСП (1969 г.).

Конференция отмечает устойчивое развитие сотрудничества и взаимодействия в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения государств-участников СНГ, входящих в другие региональные международные объединения: ЕврАзЭС, ШОС, АТЭС, ЧЭС. Укрепляются связи стран СНГ с ВОЗ в соответствии со стратегией ВОЗ по внедрению Международных медико-санитарных правил (2005 г.) с оценкой возможностей в 2014 г.

В рамках ЕврАзЭС разработаны, научно обоснованы и нормативно закреплены принципы санитарной охраны территории Таможенного союза, основанные на применении методологии и алгоритма реализации Международных медико-санитарных правил (2005 г.) на территории Российской Федерации и принципов санитарной охраны территорий государств-участников СНГ.

Образование Таможенного союза представляет собой передовой опыт оптимального сотрудничества и взаимодействия стран, тесно связанных экономическими узами и геополитическими интересами на пространстве СНГ. Документы, регламентирующие мероприятия по санитарной охране таможенной территории Таможенного союза, могут быть рекомендованы для использования при переработке и разработке новых проектов документов в области санитарной охраны территорий государств-участников СНГ, в частности Соглашения по санитарной охране территорий государств-участников СНГ (СГП, 31 мая 2001 г., Минск).

На конференции отмечен существенный вклад Российской Федерации в международную помощь здравоохранению стран СНГ, в том числе организацию и осуществление в кратчайшие сроки помощи Республике Таджикистан в связи с угрозой возврата полиомиелита.

Участники X Межгосударственной научно-практической конференции «Актуальные проблемы предупреждения и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения государств-участников СНГ» в целом отмечают актуальность рассмотренных на ней проблем, конструктивность обсуждения развития основных направлений сотрудничества и взаимодействия стран СНГ в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения и проведения мероприятий по санитарной охране территории. За последние годы решен ряд крупных задач в области санитарно-эпидемиологической охраны здоровья населения, внедрены в практику инновационные разработки, направленные на предупреждение и оперативное реагирование на чрезвычайные ситуации санитарно-эпидемиологического характера, вместе с тем остаются задачи и проблемы, требующие неотложного решения.

В связи с этим конференция подчеркивает необходимость дальнейшего развития сотрудничества государств-участников Содружества Независимых Государств по выработке скоординированной на международном уровне методологии предупреждения и ответных мер на ЧС в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения и рекомендует активизировать совместную деятельность по следующим направлениям:

- паспортизация и эпидемиологическое районирование национальных территорий по рискам внешних и внутренних угроз биологической безопасности, обусловленных опасными инфекционными болезнями, а также неинфекционными заболеваниями, возникающими вследствие действия токсических агентов, химических и радиоактивных веществ;

- унификация методологии внедрения Международных медико-санитарных правил (2005 г.) на пространстве СНГ на основе российского опыта;

- создание и совершенствование систем готов-

ности к ЧС санитарно-эпидемиологического характера на национальном уровне, адекватных требованиям Международных медико-санитарных правил (2005 г.);

- внедрение современных информационно-аналитических технологий и создание программных продуктов, предусматривающих поддержку принятия управленческих решений в предупреждении и ответных мерах на ЧС;

- активный обмен странами достоверной официальной санитарно-эпидемиологической информацией в оперативном режиме и плановом порядке (в виде эпидемиологических обзоров и прогнозов) с использованием электронных средств связи;

- внедрение современных диагностических, профилактических технологий, системы подготовки кадров, производства медицинских биологических препаратов для диагностики и профилактики инфекционных болезней, ассоциируемых с чрезвычайными ситуациями и требующих проведения мероприятий по санитарной охране территорий;

- стандартизация процедур скрининга, мониторинга, диагностики, профилактики и контроля инфекционных болезней, в том числе при осуществлении деятельности по предупреждению и ликвидации последствий ЧС;

- разработка программы подготовки кадров по вопросам санитарной охраны территорий государств-участников СНГ и внедрения Международных медико-санитарных правил (2005 г.) на основе российского опыта.

Решение перечисленных выше задач реально осуществимо в рамках реализации современной глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями, инициатив саммитов стран «Группы восьми» (2006–2010 годов) по этому вопросу, стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005 г.) и реализации действующих на пространстве СНГ программных и концептуальных документов:

- Межгосударственной программы сотрудничества в области санитарной охраны территорий государств-участников СНГ от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней на период до 2011 года (15–16 марта 2007 г., Минск);

- Программы сотрудничества и взаимодействия государств-участников Содружества Независимых Государств по проблемам биологической безопасности и противодействия биологическому терроризму на 2007–2011 годы (15–16 марта 2007 г., Минск);

- Концепции биологической безопасности государств-участников Содружества Независимых Государств (15–16 марта 2007 г., Минск).

Конференция рекомендует провести XI Межгосударственную научно-практическую конференцию в 2012 г. на тему «Современные технологии в совершенствовании мер оперативного реагирования и ответных действий на чрезвычайные ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения».

**ПРОТОКОЛ
X ЗАСЕДАНИЯ КООРДИНАЦИОННОГО СОВЕТА ПО ПРОБЛЕМАМ САНИТАРНОЙ ОХРАНЫ
ТЕРРИТОРИЙ ГОСУДАРСТВ-УЧАСТНИКОВ СОДРУЖЕСТВА НЕЗАВИСИМЫХ ГОСУДАРСТВ
ОТ ЗАВОЗА И РАСПРОСТРАНЕНИЯ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ**

6 октября 2010 г.

г. Ставрополь, Российская Федерация

В заседании приняли участие члены Координационного совета и представители от Азербайджанской Республики, Республики Армения, Республики Беларусь, Республики Казахстан, Кыргызской Республики, Российской Федерации, Республики Таджикистан, Республики Узбекистан, Украины, Исполнительного комитета СНГ.

Председательствовал на заседании Кутырев В.В. – председатель Координационного совета по проблемам санитарной охраны территорий государств-участников СНГ от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней, директор Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб».

В соответствии с утвержденной повесткой дня Координационный совет по проблемам санитарной охраны территорий государств-участников СНГ от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней обсудил и принял решения по следующим вопросам:

1. О деятельности Координационного совета по проблемам санитарной охраны территорий государств-участников СНГ от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней в 2009–2010 годах и задачах на 2011–2012 годы

(Кутырев В.В., Топорков В.П.)

Решили:

Информацию председателя Координационного совета о деятельности Координационного совета по проблемам санитарной охраны территорий государств-участников СНГ от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней в 2009–2010 годах и задачах на 2011–2012 годы принять к сведению.

2. О внесении изменений в состав Бюро Координационного совета по проблемам санитарной охраны территорий государств-участников Содружества Независимых Государств от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней

(Нарушевич Г.А., Кутырев В.В.)

Решили:

Согласиться с предложением Министерства здравоохранения Республики Армения о включении Аветисян Лилит Мкртычевны, начальника отдела эпидемиологии инфекционных и неинфекционных заболеваний Гигиенической и противоэпидемической инспекции Минздрава Республики Армения в состав Бюро Координационного совета по проблемам санитарной охраны территорий государств-участников Содружества Независимых Государств от завоза и распространения особо опасных инфек-

ционных болезней.

Согласиться с предложением Министерства здравоохранения Республики Молдова о включении Георгицы Стелы Дмитриевны, заместителя Генерального Директора Национального Центра Общественного Здоровья в состав Бюро Координационного совета по проблемам санитарной охраны территорий государств-участников Содружества Независимых Государств от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней.

3. О внесении изменений в Соглашение о сотрудничестве в области санитарной охраны территорий государств-участников СНГ (утверждено Советом глав правительств государств-участников СНГ 31 мая 2001 г., Минск) в соответствии с Международными медико-санитарными правилами (2005 г.)

(Нарушевич Г.А., Кутырев В.В., Топорков В.П.)

Решили:

Информацию о необходимости изменения Соглашения о сотрудничестве в области санитарной охраны территорий государств-участников СНГ принять к сведению и приступить к подготовке предложений с последующим согласованием с членами Координационного Совета по проблемам санитарной охраны территорий государств-участников СНГ.

4. О состоянии информационного обмена государств-участников СНГ в области санитарной охраны территорий, предупреждения и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций в области общественного здравоохранения в рамках межгосударственных правовых, нормативных методических документов

(Топорков В.П.)

Решили:

Информацию ответственного секретаря Координационного совета о деятельности Координационного совета по проблемам санитарной охраны территорий государств-участников СНГ от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней о состоянии информационного обмена в области санитарной охраны территорий государств-участников СНГ принять к сведению.

Считать обоснованным заключение об утрате актуальности положений, касающихся информационного обмена, как несоответствующих положениям Международных медико-санитарных правил (2005 г.) следующих межгосударственных документов:

Соглашения о сотрудничестве в области санитарной охраны территорий государств-участников СНГ (принято на заседании Совета глав правительств

СНГ 31 мая 2001 г., Минск);

Положения о порядке осуществления информационного обмена между государствами-участниками СНГ об эпидемиологическом надзоре за карантинными и другими опасными инфекционными болезнями и о контроле за потенциально опасными для здоровья населения товарами и грузами (утверждено Решением Совета по сотрудничеству в области здравоохранения СНГ от 3 июля 2003 г., Астана);

Санитарных правил и норм «Санитарная охрана территорий государств-участников Содружества Независимых Государств» (утверждены на XVII заседании Совета по сотрудничеству в области здравоохранения СНГ 3–4 июня 2005 г., Душанбе, Республика Таджикистан).

Внести коррективы в вопросы информационно-го обмена в проект Соглашения о сотрудничестве в области санитарной охраны территорий государств-участников СНГ при приведении его в соответствие с ММСП (2005 г.), приняв за основу перечни инфекционных болезней, товаров, подлежащих санитарно-карантинному надзору (контролю), регламентированные в следующих нормативно-методических документах в области санитарной охраны таможенной территории Таможенного союза:

Соглашение Таможенного союза по санитарным мерам (утв. решением Межгосударственного Совета Евразийского экономического сообщества от 11 декабря 2009 г. № 28, Санкт-Петербург);

Единый перечень товаров, подлежащих санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) на таможенной границе и таможенной территории Таможенного союза (утв. решением Комиссии Таможенного союза от 28 мая 2010 г. № 299, Санкт-Петербург);

Единые санитарно-эпидемиологические и гигиенические требования к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) (утв. то же);

Единые формы документов, подтверждающих безопасность продукции (товаров) (утв. то же);

Положение о порядке осуществления государственного санитарно-эпидемиологического надзора (контроля) за лицами и транспортными средствами, пересекающими таможенную границу Таможенного союза, подконтрольными товарами, перемещаемыми через таможенную границу Таможенного союза

и на таможенной территории Таможенного союза (утв. то же).

5. О взаимодействии стран Таможенного союза при осуществлении санитарной охраны территорий

(Пакскина Н.Д.)

Решили:

Информацию представителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека о взаимодействии стран Таможенного союза при осуществлении санитарной охраны территорий принять к сведению.

Считать оптимальным формирование нормативно-методической базы и мероприятий по санитарной охране таможенной территории Таможенного Союза в соответствии с требованиями Международных медико-санитарных правил (2005 г.) и рекомендовать учесть данный опыт при переработке и разработке межгосударственных документов в области санитарной охраны территорий государств-участников СНГ.

6. О мероприятиях Координационного совета по проблемам санитарной охраны территорий государств-участников СНГ от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней, планируемых на 2011–2012 годы

(Кутырев В.В., Топорков В.П.)

Решили:

Одобрить План работы Координационного совета по проблемам санитарной охраны территорий государств-участников Содружества Независимых Государств от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней на 2011–2012 годы.

Провести XI заседание Координационного совета по проблемам санитарной охраны территорий государств-участников СНГ от заноса и распространения особо опасных инфекционных болезней в 2012 г.

Председатель Координационного совета по проблемам санитарной охраны территорий государств-участников СНГ от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней, директор РосНИПЧИ «Микроб»

В.В.Кутырев

**РЕЗОЛЮЦИЯ
МЕЖВЕДОМСТВЕННОГО СОВЕЩАНИЯ
ПО ПРОБЛЕМАМ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ОХРАНЫ
ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(г. Ставрополь, 7 октября 2010 г.)

В соответствии с Планом основных организационных мероприятий Роспотребнадзора на 2010 г. (п. 7.3.5.) и во исполнение Приказа Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 288 от 19.07.2010 г. на базе ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» проведено Межведомственное совещание по проблемам санитарно-эпидемиологической охраны территории Российской Федерации (Пленум Координационного научного совета (КНС) по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации).

В совещании приняли участие представители учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Российской академии медицинских наук, Российской академии сельскохозяйственных наук, Минобороны России, МЧС России, Федерального медико-биологического агентства, Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию.

Согласно утвержденной программе совещания специалисты профильных научных и практических учреждений страны рассмотрели следующий перечень вопросов санитарно-эпидемиологической охраны территории Российской Федерации:

1. Эпидемиологический надзор за особо опасными инфекционными болезнями.
2. Диагностика, профилактика и лечение особо опасных инфекционных болезней.
3. Биомедицинские аспекты особо опасных и других инфекционных болезней.
4. Холера и патогенные для человека вибрионы.
5. Биологическая безопасность и противодействие биотерроризму.

Проведено обсуждение и утверждение отчетных за 2010 г. и плановых на 2011 г. материалов КНС.

Участники совещания констатируют, что в 2010 г. эпидемиологическая обстановка по особо опасным и другим инфекционным болезням в Российской Федерации остается нестабильной.

В 2010 г. в Российской Федерации впервые с 1996 г. зарегистрировано 12 случаев полиомиелита, вызванного «диким» полиовирусом, и 18 носителей. Заболевания полиомиелитом отмечены в семи регионах: Чечне, Дагестане, Москве, Екатеринбурге, Хабаровске, Челябинской и Иркутской областях.

Завоз полиомиелита на территорию России произошел из Республики Таджикистан, где во второй половине апреля 2010 г. зарегистрирована вспышка полиомиелита. Это первая вспышка в Европейском регионе ВОЗ, сертифицированном в 2002 г. как свободный от полиомиелита. В Таджикистане отмечено 65 % случаев заболевания полиомиелитом, выявленных в мире. Зарегистрировано 456 лабораторно под-

твержденных случаев, в том числе 20 с летальным исходом.

За 7 мес. 2010 г. эпизоотии чумы выявлены в 4 природных очагах Российской Федерации: Прикаспийском песчаном, Горно-Алтайском, Тувинском горном и Восточно-Кавказском горном, в текущем году эпизоотии чумы выявлены на площади 926 км², выделено 14 штаммов чумного микроба (данные за 7 мес.).

В Республике Казахстан эпизоотии чумы зарегистрированы в 12 природных очагах на площади 19400 км², выделено 368 штаммов возбудителя чумы.

В течение 2010 г. о случаях заболевания чумой сообщали из Китая, Мьянмы, Перу, Боливии и Китая. В Перу отмечена вспышка чумы с общим числом заболевших 27 человек, из которых 3 скончались. В Боливии в районах, граничащих с Перу, зарегистрировано 8 случаев чумы (3 летальных). В Китае в тибетской деревне на юго-западе страны выявлены 5 случаев заболевания легочной чумой (1 из заболевших умер).

Наиболее неблагоприятная ситуация по холере складывается, как и в прежние годы, в странах Африканского континента: заболевания регистрируют в Замбии, Сомали, Мозамбике, Камеруне, Зимбабве, Нигерии, Уганде, Судане, Кении.

В Азии в текущем году продолжается эпидемия в Папуа-Новой Гвинее, отмечены вспышки в Таиланде, Лаосе, Вьетнаме, Индии, Пакистане, Непале.

Выявлено 3 случая завоза холеры из Индии в Москву. В Германии – 1 случай смерти от холеры (предположительно завоз из Пакистана).

Эпидемия сибирской язвы зарегистрирована в Бангладеш, выявлено 585 случаев заболевания в 12 из 64 административных районов страны.

За 8 мес. 2010 г., по сравнению с аналогичным периодом 2009 г., в Российской Федерации отмечается рост заболеваемости впервые выявленным бруцеллезом на 18,5 %; выявлено 17 случаев заболевания сибирской язвой: в Республике Дагестан – 8, Ростовской области – 1, Омской области – 6 (в т.ч. 1 летальный), Волгоградской области – 2. В Краснодарском крае госпитализированы 5 человек с подозрением на заболевание сибирской язвой. В 2,2 раза возросла заболеваемость туляремией. Зарегистрировано 58 случаев туляремии (в 2009 г. – 27) на территории 15 субъектов Российской Федерации. Почти в 2 раза – с 6 до 11 – увеличилось число случаев бешенства среди людей за восемь месяцев 2010 г. по сравнению с аналогичным периодом прошлого года. В Республиках Башкортостан и Калмыкия отмечены случаи смерти от бешенства.

Зарегистрировано снижение заболеваемости геморрагическими лихорадками – в целом на 43,8 %, в

том числе по ГЛПС на 47,8 %.

Заболевания Крымской геморрагической лихорадкой отмечены в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах: Ростовской области – 16, Республике Калмыкия – 10, Астраханской области – 7 (в т.ч. 1 летальный), Волгоградской области – 3, Ставропольском крае – 30, Республике Дагестан – 3. Всего 69 (в т.ч. 1 летальный).

В России зарегистрировано около 500 случаев заболевания лихорадкой Западного Нила, в том числе 6 летальных. Наибольшее число заболевших в Волгоградской (402 случая, 5 летальных), Ростовской (53 случая, 1 летальный) и Воронежской областях (25 случаев). В Астраханской области – 6 случаев, по одному случаю – в Краснодарском крае, Республике Калмыкия и Челябинской области.

В связи с сохраняющейся угрозой заноса, возникновения и распространения опасных и особо опасных инфекций, связанной с неблагоприятной эпидемиологической ситуацией в мире, наличием стойких природных очагов особо опасных инфекций на территории Российской Федерации и сопредельных государств приоритетными направлениями деятельности учреждений КНС в 2010 г. являлись:

- реализация решений саммита стран «Группы восьми» (Санкт-Петербург, 16–17 июля 2006 г.) в области борьбы с инфекционными болезнями;

- нормативно-методическое сопровождение внедрения Международных медико-санитарных правил (2005 г.) на территории Российской Федерации;

- реализация Распоряжения Правительства Российской Федерации от 21.05.2007 г. № 642-р об участии Российской Федерации в осуществлении инициативы по предотвращению и ликвидации последствий стихийных бедствий и техногенных катастроф;

- реализация Распоряжения правительства Российской Федерации № 1426 от 02.10.2009 г. «О выделении в 2009–2012 гг. средств федерального бюджета на проведение научно-исследовательских работ, разработку новых средств диагностики и профилактики тропических болезней, развитие международного сотрудничества»;

- решение проблемы обеспечения биологической безопасности в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)»;

- реализация решения Ученого совета Роспотребнадзора № 14 от 06.04.2010 г. (п. 6) по формированию раздела по санитарной охране территории Российской Федерации в рамках проекта отраслевой научно-исследовательской программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» на 2011–2015 гг.;

- совершенствование эпидемиологического надзора за особо опасными инфекционными болезнями;

- создание отвечающих современным требованиям средств диагностики и профилактики особо опасных инфекционных болезней в соответствии с Сетевым графиком разработки и внедрения препара-

тов для диагностики и профилактики особо опасных инфекционных болезней.

Решение данных проблем невозможно без фундаментальных и прикладных разработок по эпидемиологии, микробиологии и иммунологии особо опасных инфекционных болезней, активной научной поддержки практической деятельности по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации.

Участники совещания отмечают существенный вклад Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации в научное и организационно-методическое обеспечение разработки профильных проблем на международном, федеральном и региональном уровнях.

В соответствии с Планом основных организационных мероприятий Роспотребнадзора на 2010 г., Планом КНС по обеспечению гармонизации национальной нормативно-методической базы с Международными медико-санитарными правилами (2005 г.) и Планом КНС по разработке и переработке нормативно-методических документов по санитарной охране территории Российской Федерации и эпидемиологическому надзору за ООИ на 2010 г. специалистами учреждений Координационного научного совета разработано 35 нормативно-методических документов, из них 2 утверждены на межгосударственном и 11 на федеральном уровне.

В рамках деятельности Координационного совета по проблемам санитарной охраны территорий СНГ разработано и подписано членами Межгоссовета Таможенного союза стран ЕврАзЭС от 11.12.2009 г. № 28 (Санкт-Петербург) Соглашение Таможенного союза по санитарным мерам.

Разработаны, научно обоснованы и нормативно закреплены принципы санитарной охраны территории Таможенного союза Российской Федерации, республики Казахстан и Республики Беларусь, основанные на применении методологии и алгоритма реализации Международных медико-санитарных правил (2005 г.) на территории Российской Федерации.

Активно продолжается работа по совершенствованию стратегии и тактики эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями.

Проведена инвентаризация номенклатуры и разработана база данных по внешним и внутренним угрозам биологической безопасности, адаптированная к ГИС.

Разработан алгоритм выявления и верификации новых, малоизвестных и неизученных инфекционных болезней. Разработан алгоритм оценки территориальной, региональной и национальной значимости чрезвычайных ситуаций на основе выработанных критериев.

Подтверждена на ретроспективных данных работоспособность математической модели развития эпидемических процессов при чуме с учетом основных мер противодействия.

Подтвердился прогноз Референс центра по контролю за заболеваемостью Лихорадкой Западного Нила на 2010 г.

В рамках реализации Распоряжения Правительства Российской Федерации № 642-р завершено техническое перевооружение СПЭБ и укрепление материально-технической базы и инфраструктур, обеспечивающих деятельность СПЭБ.

Продемонстрированы технические характеристики и возможности работы СПЭБ, модернизированной на базе автошасси (РосНИПЧИ «Микроб»), в Международном салоне «Комплексная безопасность 2010» в г. Ногинск Московской области.

«Мобильная лаборатория эпидразветки и индикации» на базе автомобиля ГАЗ 2705 удостоена Диплома и золотой медали X Московского международного салона инноваций и инвестиций.

В рамках обеспечения подготовки специалистов СПЭБ созданы учебно-методические фильмы (РосНИПЧИ «Микроб»): Проведение учений СПЭБ, модернизированной на базе пневмокаркасных палаток; Проведение эксплуатационных испытаний мобильного комплекса СПЭБ; Модернизированные СПЭБ Роспотребнадзора; «Мобильная лаборатория эпидемиологической разведки и индикации»; Учебно-методический фильм по использованию универсальной укладки для забора материала на исследование и надеванию и снятию защитной одежды.

Продолжены работы по реализации распоряжения Правительства Российской Федерации № 1426, по унификации алгоритмов эпидемиологического надзора за тропическими и др. забытыми инфекциями бактериальной и вирусной этиологии, актуальными для стран Центральной Азии и Африки и разработке современных средств их диагностики и профилактики.

В рамках заседания проблемной комиссии по вопросам деятельности противочумных учреждений в единой сети профилактики опасных, зоонозных и природно-очаговых инфекционных болезней (22–23 марта 2010 г.) обсужден и направлен на утверждение в Роспотребнадзор Сетевой график разработки и внедрения препаратов для диагностики и профилактики особо опасных инфекционных болезней, включающий 3 раздела из 73 диагностических и 7 профилактических МИБП.

Подготовлен проект «Руководства по вакцинопрофилактике особо опасных инфекционных заболеваний».

Разработаны методические рекомендации по идентификации патогенных биологических агентов по таксономическим признакам и эпидемиологической значимости федерального уровня.

Зарегистрированы в Росздравнадзоре «Набор реагентов. Тест-система диагностическая для выявления возбудителя туляремии в иммуноферментном анализе» («ИФА-Тул-СтавНИПЧИ») и «Набор реагентов. Тест-система диагностическая для выявления возбудителя бруцеллеза в иммуноферментном анализе» («ИФА-Бру-СтавНИПЧИ»).

Разработана технология получения и параметры контроля качества иммуноглобулинов диагностических сибиреязвенных соматических и спорных адсорбированных флуоресцирующих сухих. Нормативная документация и препараты направ-

лены в ГИСК им. Л.А.Тарасевича для проведения Государственных испытаний.

Впервые, на примере вирусов гриппа А для направленной инактивации геномных последовательностей РНК-содержащих вирусов предложено использовать искусственные наноконструкции, состоящие из дезоксирибозимов заданной структуры, обеспечивающих адресную доставку препарата к вирусным нуклеиновым кислотам и их расщепление, и TiO₂-наночастиц, способствующих проникновению препарата в клетку. Противовирусные ДНК-зим-содержащие наноконструкции не имеют российских и мировых аналогов. Разработанные ген-направленные препараты могут быть быстро реориентированы на любой вновь возникший штамм вируса гриппа (включая мутантные лекарственно устойчивые формы).

Определена степень риска завоза холеры в различные субъекты страны всеми видами международного транспорта, в рамках гармонизации с Международными медико-санитарными правилами (ММСП, 2005 г.). При введении коэффициента интенсивности миграционного оборота выявлена степень потенциальной эпидемической опасности по холере для территорий различных типов.

Создана компьютерная база данных штаммов, выделенных на территории Сибири и Дальнего Востока за 2001–2008 гг., разработан комплексный метод сигнальной детекции (РИФ и мультиплексная ПЦР), повышающий эффективность поиска микробов и определения границ контаминации. Исследован видовой состав фитопланктона водоемов в местах ежегодного обнаружения возбудителя холеры, предложен способ получения и выявления формируемой холерными вибрионами биопленки.

Разработан способ мечения холерных фагов и отработана технология применения ³H-тимидина в исследовании взаимодействия фагов и холерного вибриона.

Получены индуцированные холерным вибрионом и холерным токсином нейтрофилокины, изучена их роль в формировании противохолерного иммунитета и показана возможность использования для коррекции иммунопатологических реакций.

Получена новая питательная среда для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях ХДС-РГ.

Продолжены работы, направленные на решение проблем обеспечения биобезопасности и противодействия биотерроризму – от создания терминологической базы и формирования идеологии научных исследований до решения конкретных задач.

Разработаны и утверждены на федеральном уровне Санитарные правила СП 1.3.2628-10 «Изменения и дополнения № 1 к СП 1.3.1285-03 «Требования к организации работ с аэрозолями микроорганизмов I–II групп патогенности (опасности)».

Разработаны проекты:

- методических указаний по лабораторной диагностике, лечению и профилактике особо опасных микозов, лабораторной диагностике и профилактике мелиоидоза, по применению новых дезинфицирую-

щих средств для ликвидации последствий биотерроризма и очагов опасных и особо опасных инфекций;

- методические рекомендации по использованию метода MLVA для эпидемиологического расследования вспышек сибирской язвы;

- 2 руководств: по разработке паспорта безопасности потенциально опасного объекта, осуществляющего деятельность с использованием патогенных биологических агентов и медицинской микологии;

- учебного пособия «Профилактика и борьба с особо опасными инфекциями в зонах чрезвычайных ситуаций»;

Подготовлены к изданию 2 монографии: «Особо опасные микозы», «Использование ГИС-технологий в системе биологической безопасности»;

Разработан метод оценки статистических характеристик эпидемических процессов.

Продолжается выпуск реферативного сборника «Биологическая безопасность».

Подготовлено второе дополненное издание книги «Биологическая безопасность. Термины и определения».

По результатам НИР в Роспатенте зарегистрировано 23 патента, оформлено 7 заявок на изобретения.

На заседаниях пленума КНС рассмотрены материалы о выполнении плана НИР и внедрения результатов исследований в практику, а также документы на планируемые научные темы и план внедрения результатов НИР на 2011 г.

В рамках КНС в 2010 г. выполнялось 129 тем. Завершено в 2010 г. 50 НИР, в том числе по проблемным комиссиям КНС: ПК 50.01 – 14, ПК 50.02 – 11, ПК 50.03 – 8, ПК 50.04 – 9, ПК 50.05 – 8. Все информационные карты на завершённые темы рекомендованы к утверждению.

Для внедрения в практику здравоохранения в 2010 г. разработано 143 наименования научной продукции.

На заседаниях проблемных комиссий КНС рассмотрены 50 регистрационных карт на темы, планируемые к исполнению с 2011 г. По ПК 50.01 – 11, рекомендовано включить в план 9, ПК 50.02 – 13, рекомендовано включить в план 13; ПК 50.03 – 13, рекомендовано – 12; ПК 50.04 – 10, рекомендовано – 10; ПК 50.05 – 3, рекомендовано – 3. Всего в план НИР на 2010 г. рекомендовано включить 47 тем. Планируемые НИР являются актуальными, отличаются научной новизной и современным методическим уровнем. По тематике КНС в 2011 г. будет выполняться 126 тем.

Для включения в план внедрения результатов НИР в практику в 2011 г. на федеральном, региональном и учрежденческом уровнях представлено 88 предложений, которые прошли экспертную оценку, скорректированы и приняты к исполнению.

Совещание отмечает, что все выполняемые в рамках координирующей деятельности совета научно-исследовательские работы соответствуют направлениям, обозначенным в утвержденном Президентом России концептуальном документе «Основы государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской

Федерации на период до 2010 г. и дальнейшую перспективу» (от 04.12.2003 г., № Пр-2194), основным направлениям «Концепции развития здравоохранения и медицинской науки в Российской Федерации на 2001–2005 годы и на период до 2010 года», решениям саммита «Группы восьми» (г. Санкт-Петербург, 15–17 июля 2006 г.), направленным на борьбу с инфекционными болезнями.

На основании результатов рассмотрения широкого круга специальных вопросов, посвященных проблемам санитарно-эпидемиологической охраны территории Российской Федерации, совещание постановило:

1. Продолжить участие в реализации решений саммита стран «Группы восьми» (2006, 2007, 2008 г.) и стратегии ВОЗ по внедрению Международных медико-санитарных правил (2005 г.) до 2014 г. в части научного обеспечения модернизации лабораторных сетей, сил оперативного реагирования на ЧС санитарно-эпидемиологического характера на национальном и международном уровне (ВОЗ, СНГ, ШОС, ЕврАзЭС, АТЭС и др.) и развития внутриведомственного и межведомственного взаимодействия в этой сфере национальной безопасности.

2. Совершенствование нормативно-методической базы в области санитарной охраны территории Таможенного союза Российской Федерации с учетом расширения государств-участников.

3. Обеспечить реализацию:

- отраслевой научно-исследовательской программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» на 2011–2015 гг. в рамках компетенции КНС;

- федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)»;

4. Продолжить реализацию основных направлений научных исследований организаций науки Роспотребнадзора (Приказ Руководителя Роспотребнадзора от 14.07.2009 г., № 431) Об утверждении Концепции научного обеспечения органов и организаций Роспотребнадзора):

- совершенствование научных основ эпидемиологического надзора, создание научно-обоснованных систем паспортизации территорий, внедрение ГИС-технологий,

- развитие информационно-аналитического и прогнозно-моделирующего направления в эпидемиологии (Приказ Руководителя Роспотребнадзора от 06.10.2009 г. № 639 «Основные направления деятельности Роспотребнадзора, его органов и организаций на 2010 год»),

- разработку и внедрение в практику современных алгоритмов мониторинга, методов и средств лабораторной диагностики в систему эпидемиологического надзора и профилактики опасных инфекционных болезней,

- развитие инновационных технологий и их внедрение в деятельность противочумных учреждений и взаимодействующих с ними органов и организаций

Роспотребнадзора и других ведомств.

5. Считать приоритетным развитие инновационного направления в области предупреждения и оперативного реагирования на ЧС санитарно-эпидемиологического характера на основе модернизации стационарных и мобильных структур.

6. Продолжить исследования по обеспечению модернизации технологической базы и методологической основы эпидемиологического надзора в природных очагах чумы, сочетанных с другими опасными инфекционными болезнями.

7. Считать приоритетным научно-методическое и практическое обеспечение участия СПЭБ в практических мероприятиях Российской Федерации: Зимних олимпийских играх 2014 г. (Сочи), XXVII Всемирной летней универсиаде (2013 г., Казань), саммите стран АТЭС (2012 г.).

8. Одобрить проекты нормативно-методических документов по санитарной охране территории Российской Федерации и эпидемиологическому надзору за чумой и другими ООИ, в соответствии с Планом основных организационных мероприятий Роспотребнадзора, Планом КНС по обеспечению гармонизации национальной нормативно-методической базы с Международными медико-санитарными правилами (2005 г.) и Планом внедрения результатов НИР в практику здравоохранения КНС на 2010 г.

9. Активизировать работу по усовершенствованию нормативно-методической базы по вопросам неспецифической профилактики особо опасных природно-очаговых инфекционных болезней на территории Российской Федерации.

10. Обеспечить внедрение в практику проведения противоэпидемических мероприятий новых дезинфектологических технологий и препаративных форм дератизации, дезинсекции и дезинфекции.

11. Одобрить проект предложений учреждений КНС для включения в План основных организационных мероприятий Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на 2011 г. и направить в Роспотребнадзор.

12. Считать приоритетным проведение работ в рамках Сетевого графика разработки и внедрения препаратов для диагностики и профилактики особо опасных инфекционных болезней, из которых первоочередными являются МИБП для лабораторной диагностики ООИ, вошедшие в соответствующие нормативно-методические документы.

13. Повысить интенсивность научных исследований и ускорить внедрение в практическое здравоохранение средств нового поколения индикации и лабораторной диагностики особо опасных бактериальных и вирусных инфекций на основе многофакторного экспрессного генодиагностического и иммуноанализа с использованием современных биотехнологических процессов и адаптированных для разных уровней лабораторной диагностики высокочувствительных приборов.

14. Одобрить проект Руководства по вакцинопрофилактике особо опасных инфекционных заболе-

ваний и рекомендовать его к изданию.

15. Продолжить научные исследования по совершенствованию биотехнологии производства диагностических, профилактических и лечебно-профилактических медицинских иммунобиологических препаратов с повышенными потребительскими характеристиками.

16. Создать рабочую группу из представителей ФГУН ГНЦ ПМБ (головное учреждение), ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» по разработке комплексного алгоритма генотипирования и оценки геномного полиморфизма возбудителей особо опасных бактериальных инфекций, прогнозирования их эволюции, определение параметров возможной направленной генетической модификации и формирование систем молекулярно-генетического мониторинга.

17. Интенсифицировать работы по созданию вакцин против опасных инфекций, пригодных для иммунопрофилактики как в обычных условиях, так и при чрезвычайных ситуациях природного, техногенного или искусственного характера при одновременном экстренном применении с антибактериальными препаратами.

18. Запланировать экспериментальные работы по генно-инженерному конструированию модельных штаммов возбудителей ООИ, необходимых для снижения биологических рисков в процессе подготовки специалистов по ООИ.

19. Поручить ФГУЗ ВолгоградНИПЧИ провести инвентаризацию нормативно-методической базы по биологической безопасности.

20. Продлить срок выполнения НИР 31-2-08 «Конструирование средств лабораторной диагностики опасных инфекций с использованием технологий биочипов» (ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб») и НИР 014-3-08 «Влияние липополисахарида тулярийного микроба разных подвидов на функциональное состояние иммунокомпетентных клеток макроорганизма» (ФГУЗ ИркутскНИПЧИ) до 2012 г.

21. Осуществлять дальнейшую кооперацию и сотрудничество научно-исследовательских институтов Роспотребнадзора при выполнении НИР.

22. Одобрить отчет о ходе выполнения плана работы Координационного научного совета в 2010 г.

23. Одобрить итоги выполнения плана НИР, плана внедрения результатов НИР в практику здравоохранения на 2010 г. и рекомендовать представленные ИК по завершенным на 2010 г. темам к утверждению.

24. Утвердить план НИР на 2011 г., включающий 126 тем, из них 47 вновь планируемые. Включить 88 предложений в план внедрения результатов НИР в практику здравоохранения на 2011 г. Считать выполнение плана КНС обязательным.

25. Одобрить изменения в составе КНС и его проблемных комиссий.

26. Направить отчет о работе Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации в 2010 г. в Роспотребнадзор и РАМН.

ПАМЯТИ ВАСИЛЬЕВА НИКИФОРА ТРОФИМОВИЧА
(1947–2010)

После продолжительной болезни 15 октября 2010 года на 64 году жизни скончался видный специалист в области биологической защиты войск и населения, доктор биологических наук, профессор генерал-лейтенант медицинской службы Васильев Никифор Трофимович.

Никифор Трофимович родился 17 мая 1947 г. в с. Оланешты Суворовского района Молдавской ССР. После окончания в 1971 г. с отличием военно-медицинского факультета Куйбышевского медицинского института служил по 1978 г. в Научно-исследовательском институте Министерства обороны СССР младшим, а затем – старшим научным сотрудником. С 1978 г. – в центральном аппарате. Прошел путь от офицера отдела до начальника Управления биологической защиты, а затем заместителя начальника войск РХБ защиты Вооруженных Сил Российской Федерации. Именно на него возлагалась организация научной работы по проблеме защиты армии и населения от биологического оружия и биотерроризма.

Работа по повышению эффективности НИОКР, направленных на совершенствование средств биологической защиты, совпала с периодом существенных структурно-кадровых изменений в Вооруженных Силах. В этих условиях Никифор Трофимович провел большую работу по сосредоточению научных коллективов на основных направлениях исследований с опорой на уникальных профессионалов высокого уровня подготовки. Благодаря этим мерам, в научно-исследовательских учреждениях в сравнительно короткий срок был выполнен ряд важных в прикладном отношении разработок. По его инициативе были сформированы Центр специальной лабораторной диагностики и лечения особо опасных и экзотических инфекционных заболеваний и мобильные диагностические группы. Проводилась большая работа по созданию эффективных средств защиты.

Так, уже к концу 2006 г. было аттестовано 65 современных иммунобиологических и модельных тест-препаратов, не имеющих аналогов как в Российской Федерации, так и за ее пределами. Разработан и принят на снабжение комплект средств экспресс-анализа, включающий индикационные и диагностические тест-системы и наборы реагентов для быстрого обнаружения возбудителей опасных и особо опасных инфекционных заболеваний в пробах объектов внешней среды, а также в клинических



материалах. Научные исследования с 2000 г. нашли практическое применение при обеспечении Вооруженных сил Российской Федерации современными техническими средствами для проведения биологической разведки и контроля биологического заражения. Предложен и принят на оснащение Вооруженных сил Российской Федерации автоматический сигнализатор для неспецифической индикации аэрозолей биологических средств и токсинов АСП-13 с современной элементной базой и новыми техническими решениями.

Под руководством Никифора Трофимовича выполнен ряд научных и научно-прикладных программ, имеющих оборонное значение.

Он являлся одним из ведущих экспертов в Российской Федерации на международных переговорах по вопросам биологического оружия, консультантом Федеральной службы охраны Российской Федерации по биологической защите, непосредственным разработчиком концепции создания механизма контроля за соблюдением Конвенции о запрещении биологического оружия, представлял интересы Минобороны России в качестве члена трех правительственных комиссий по проблемам химической и биологической безопасности, антитеррористической и генно-инженерной деятельности.

Никифор Трофимович с 1996 по 2007 год принял участие в 14 сессиях Специальной группы государств-участников Конвенции о запрещении биологического оружия и 3 конференциях по распространению действия Конвенции.

В критические моменты, которых у него было не мало, он проявлял принципиальность и всегда доводил принятые решения до конца. В обращении с подчиненными его отличали доступность, стремление делиться своим опытом и знаниями, но всё это сочеталось с высокой требовательностью. Несомненно, что общение с Никифором Трофимовичем сыграло определяющую роль в становлении многих ученых, организаторов науки и руководителей научных учреждений.

Многие годы он был председателем экспертного совета Высшей аттестационной комиссии России по закрытой тематике. Именно от него в значительной степени зависела объективность оценки представляемых докторских и кандидатских диссертаций и присвоения ученых званий.

Никифор Трофимович является автором 5 моно-

графий и более 120 научных работ. Под его руководством защищено 25 кандидатских и докторских диссертаций. Он лауреат премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники за разработку высокоэффективной вакцины против сибирской язвы.

За заслуги в укреплении обороноспособности страны и разработку биологических препаратов в условиях, сопряженных с риском для жизни, награжден орденами Мужества, Почета, «За службу Родине

в Вооруженных силах СССР» III степени, «За заслуги перед Отечеством» IV степени.

Но время неумолимо, и Никифор Трофимович в числе многих специалистов, создававших систему защиты войск и населения страны от биологического оружия, закончил свой жизненный путь. Он прожил достойную жизнь видного ученого. Заложенные им и его сподвижниками традиции, опыт и знания, безусловно, сыграют свою роль в формировании следующих поколений специалистов.

21 октября 2010 г. исполнилось 60 лет со дня рождения Онищенко Геннадия Григорьевича, доктора медицинских наук, профессора, академика РАМН, руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главного государственного санитарного врача.

* *
*

7 сентября 2010 г. исполнилось 60 лет со дня рождения Кузнецова Александра Александровича, доктора биологических наук, главного научного сотрудника лаборатории эпизоотологического мониторинга РосНИПЧИ «Микроб».

* *
*

10 октября 2010 г. исполнилось 60 лет со дня рождения Куклева Евгения Валентиновича, доктора медицинских наук, профессора, ведущего научного сотрудника лаборатории эпизоотологического анализа и прогнозирования РосНИПЧИ «Микроб».

* *
*

8 ноября 2010 г. исполнилось 60 лет со дня рождения Матросова Александра Николаевича, доктора биологических наук, ведущего научного сотрудника лаборатории эпизоотологического мониторинга РосНИПЧИ «Микроб».

* *
*

9 ноября 2010 г. исполнилось 75 лет со дня рождения Рыжко Инны Васильевны, доктора медицинских наук, профессора, ведущего научного сотрудника Ростовского НИПЧИ.

Редакционная коллегия журнала «Проблемы особо опасных инфекций» сердечно поздравляет юбиляров, желает им доброго здоровья, счастья, благополучия и дальнейших успехов в их работе.