

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 3(109)

сентябрь · 2011

САРАТОВ

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)
В.П.Бондарев, докт. мед. наук (Сергиев Посад)
И.В.Борисевич, докт. мед. наук, профессор (Москва)
А.Л.Гинцбург, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва)
И.А.Дятлов, докт. мед. наук, профессор (Оболensk)
А.Н.Куличенко, докт. мед. наук, профессор (Ставрополь)
В.В.Кутырев, докт. мед. наук, член-корр. РАМН (Саратов)
Д.К.Львов, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва)
А.Б.Мазрухо, канд. мед. наук (Ростов-на Дону)
В.В.Малеев, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва)
А.Н.Сергеев, докт. мед. наук, профессор (Кольцово)
В.П.Сергиев, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва)

*Журнал включен в Реферативный журнал и Базы данных
ВИНИТИ. Сведения о журнале ежегодно публикуются
в международной справочной системе по периодиче-
ским 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», 2011

September 2011, Issue 109

Problems of Particularly Dangerous Infections

Scientific and Practical Journal
Issued quarterly. Founded in 1968

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

Editor-in-Chief

Kutyrev V.V., Corresponding Member of the RAMS,
Doctor of Medical Science, Professor

Editorial Board

Devdariani Z.L., Doctor of Medical Science, Professor
Eroshenko G.A., Doctor of Biological Science
Karavaeva T.B. (executive secretary), Candidate of Medical Science
Kouklev E.V., Doctor of Medical Science, Professor
Lyapin M.N., Candidate of Medical Science
Popov N.V., Doctor of Biological Science, Professor
Popov Yu. A., Doctor of Biological Science, Professor
Samoilova L.V., Doctor of Medical Science, Professor
Sayapina L.V., Doctor of Medical Science
Smirnova N.I., Doctor of Biological Science, Professor
Taranenko T.M., Doctor of Biological Science
Toporkov V.P., Doctor of Medical Science
Shchukovskaya T.N., Doctor of Medical Science

Editorial Council

Alekseev V.V., Doctor of Medical Science, Professor (Volgograd)
Bezsmertny V.E., Candidate of Medical Science (Moscow)
Balakhonov S.V., Doctor of Medical Science, Professor (Irkutsk)
Bondarev V.P., Doctor of Medical Science (Sergiev Possad)
Borisevich I.V., Doctor of Medical Science, Professor (Moscow)
Gintsburg A.L., Doctor of Medical Science, Member of the RAMS (Moscow)
Dyatlov I.A., Doctor of Medical Science, Professor (Obolensk)
Kulichenko A.N., Doctor of Medical Science, Professor (Stavropol)
L'vov D.K., Doctor of Medical Science, Member of the RAMS (Moscow)
Mazrukho A.B., Candidate of Medical Science (Rostov-on-Don)
Maleev V.V., Doctor of Medical Science, Member of the RAMS (Moscow)
Sergeev A.N., Doctor of Medical Science, Professor (Koltsovo)
Sergiev V.P., Doctor of Medical Science, Member of the RAMS (Moscow)

Editorial Office Address:

Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russian Federation
Tel +7(845-2) 51-82-22
Fax +7(845-2) 51-52-12
E-mail: microbe@san.ru
www.microbe.ru

Подписной индекс в каталоге «Почта России» – 24687

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

Адрес редакции: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru. Сайт: www.microbe.ru
Зав. редакцией Л.С.Пронина. Тел. (845-2) 51-82-22. Факс (845-2) 51-52-12

Пробл. особо опасных инф. Сентябрь 2011. Вып. 109. 1–90
Редактор Т.А.Докалина. Технический редактор Т.К.Меркулова. Перевод на английский Т.Б.Караваевой, А.П.Рыжовой

Подписано в печать 05.08.11. Формат 60×88 1/8. Бумага мелованная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 11,1. Гарнитура Таймс. Заказ 956
Журнал отпечатан в ООО «ИППОЛит-XXI век». 410012, Саратов, Б. Казачья, 79/85

Обзоры

Попов Н.В., Кошель Е.И., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Формирование современных представлений о механизме энзоотии чумы 5

Эпидемиология, биобезопасность

Дугаржапова З.Ф., Родзиковский А.В., Чеснокова М.В. Научно-методические подходы для создания алгоритма эпидемиологической диагностики сибирской язвы 9

Красовская Т.Ю., Щербаклова С.А., Шарова И.Н., Найденова Е.В., Билько Е.А., Чекашов В.Н., Матросов А.Н., Яковлев С.А., Поршаков А.М., Шилов М.М., Рябова А.В., Князева Т.В., Мокроусова Т.В., Фёдорова З.П., Кресова У.А., Талаева Е.А., Миронова Н.И., Кутырев В.В. Изучение циркуляции вируса Западного Нила на территории Саратовской области в 2010 г. 13

Ляпин М.Н., Сухоносов И.Ю., Ежов И.Н., Топорков А.В., Топорков В.П., Чеснокова М.В., Косилко С.А., Захлебная О.Д. Управление эпидемиологической ситуацией на биологически опасном объекте 18

Сафронов В.А., Лопатин А.А., Раздорский А.С., Куклев Е.В., Топорков В.П., Ковтунов А.И., Пискунова Н.В., Кабин В.В., Шендо Г.Л., Малецкая О.В., Бачинский А.Г., Половинкина А.В. Результаты испытаний технического образца компьютерной программы «Система поддержки принятия управленческих решений» 23

Микробиология

Головинская Т.М., Буравцева Н.П., Цыганкова О.И., Еременко Е.И. Сравнительное изучение литической активности и специфичности экспериментальных серий сибиреязвенных бактериофагов Гамма А-26, К ВИЭВ, ВА-9 и Fah-VНИИВВиМ 28

Кочнева Г.В., Мануйлов В.А., Нетесова И.Г., Чуб Е.В., Байандин Р.Б., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А., Нетесов С.В. Генотипы и субтипы изолятов вируса гепатита В на территории Сибири 31

Ляпин А.А., Кравченко Т.Б., Мокриевич А.Н., Вахрамеева Г.М., Комбарова Т.И., Дятлов И.А., Павлов В.М. Изучение влияния УФ-облучения и воздействия на-лидиксовой кислоты на индукцию RecA-белка в клетках *Francisella tularensis* 15/10 36

Сергеев А.А., Пьянков О.В., Демина О.К., Пьянкова О.Г., Рябчикова Е.И., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Инфекционные свойства штаммов вируса гриппа птиц А/Н5N1 в экспериментах на мышах 40

Иммунология

Жукова С.И., Алексеев В.В., Липницкий А.В., Занкович А.А., Авророва И.В., Антонов В.А., Смелянский В.П., Ткаченко Г.А., Путинцева Е.В., Зинченко О.В. Некоторые параметры цитокинового профиля у больных лихорадкой Западного Нила 43

Кузнецова Е.М., Волох О.А., Смолькова Е.А., Щуковская Т.Н., Шепелев И.А., Авдеева Н.Г., Кравцов А.Л., Никифоров А.К. Иммунологические свойства антигенных комплексов туляремийного микроба 46

Диагностика

Ветчинин С.С., Копылов П.Х., Киселева Н.В., Николаева О.Г., Гаврюшкин А.В. Получение иммуномагнитных частиц для определения клеток *Francisella tularensis* 50

Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Ломов Ю.М., Телесманич Н.Р., Рожков К.К., Кругликов В.Д., Гончаренко Е.В., Тришина А.В., Пухов Ю.М., Прометной В.И., Пичурин Н.Л. Результаты использования нового комплекса питательных сред для диагностики холеры в ходе тактико-специального учения специализированной противо-эпидемической бригады 54

Reviews

Popov N.V., Koshel E.I., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Formation of Modern Concepts on the Mechanism of Plague Enzooty 5

Epidemiology, Biosafety

Dugarzhapova Z.F., Rodzikovsky A.V., Chesnokova M.V. Scientific-Methodological Approaches to the Development of Algorithm for Anthrax Epidemiological Diagnostics 9

Krasovskaya T.Yu., Shcherbakova S.A., Sharova I.N., Naydenova E.V., Bil'ko E.A., Chekashov V.N., Matrosov A.N., Yakovlev S.A., Porshakov A.M., Shilov M.M., Ryabova A.V., Knyazeva T.V., Mokrousova T.V., Fedorova Z.P., Kresova U.A., Talaeva E.A., Mironova N.I., Kutyrev V.V. Studies of West Nile Virus Circulation in the Territory of the Saratov Region in 2010 13

Lyapin M.N., Sukhonosov I.Yu., Ezhov I.N., Toporkov A.V., Toporkov V.P., Chesnokova M.V., Kosilko S.A., Zakhlebnyaya O.D. Epidemiological Situation Control at Biohazardous Facility 18

Safronov V.A., Lopatin A.A., Razdorsky A.S., Kuklev E.V., Toporkov V.P., Kovtunov A.I., Piskunova N.V., Kabin V.V., Shendo G.L., Maletskaya O.V., Bachinsky A.G., Polovinkina A.V. Results of the Test-Run of the Computer Software Model "Support System for Managerial Decision Making" 23

Microbiology

Golovinskaya T.M., Buravtseva N.P., Tsygankova O.I., Eremenko E.I. Comparative Study of Lytic Activity and Specificity of Anthrax Bacteriophages Gamma A-26, K VIEV, VA-9 and Fah-VNIIVV&M Batches 28

Kochneva G.V., Manuylov V.A., Netesova I.G., Chub E.V., Bayandin R.B., Sivolobova G.F., Grazhdantseva A.A., Netesov S.V. Genotypes and Subtypes of Hepatitis B Virus Isolates in the Territory of Siberia 31

Lapin A.A., Kravchenko T.B., Mokrievich A.N., Vakhrameeva G.M., Kombarova T.I., Dyatlov I.A., Pavlov V.M. Study of the UV Irradiation and Nalidixic Acid Effect on the RecA-protein Induction in *Francisella tularensis* 15/10 Cells 36

Sergeev A.A., P'yankov O.V., Demina O.K., P'yankova O.G., Ryabchikova E.I., Agafonov A.P., Sergeev A.N. Infectious Properties of Avian Influenza A/H5N1 Virus Strains Studied by means of Experiments on Mice 40

Immunology

Zhukova S.I., Alekseev V.V., Lipnitsky A.V., Zankovich A.A., Avrorova I.V., Antonov V.A., Smelyansky V.P., Tkachenko G.A., Putintseva E.V., Zinchenko O.V. Several Cytokine Profile Parameters in West Nile Fever Patients 43

Kuznetsova E.M., Volokh O.A., Smol'kova E.A., Shchukovskaya T.N., Shepelev I.A., Avdeeva N.G., Kravtsov A.L., Nikiforov A.K. Immunobiological Properties of *Francisella tularensis* Antigen Complexes 46

Diagnostics

Vetchinin S.S., Kopylov P.Kh., Kiseleva N.V., Nikolaeva O.G., Gavryushkin A.V. Obtainment of the Immunomagnetic Particles for *Francisella tularensis* Cells Detection 50

Mazrukho A.B., Kaminsky D.I., Lomov Yu.M., Telesmanich N.R., Rozhkov K.K., Kruglikov V.D., Goncharenko E.V., Trishina A.V., Pukhov Yu.M., Prometnoy V.I., Pichurina N.L. Results of Application of the New Nutrient Media Set for Cholera Diagnostics within the Frames of the Special Tactical Training Exercises for Specialized Anti-Epidemic Team 54

Малахаева А.Н., Саяпина Л.В., Барулина И.С., Касина И.В., Абдрашитова А.С., Осина Н.А., Шарова И.Н., Яцышина С.Б., Майоров Н.В., Зайцева Л.В., Миронова Н.П. Оценка нового набора реагентов «АмплиСенс *Brucella spp.*-FL» с гибридизационно-флуоресцентной детекцией 58

Орлова Т.Н., Василенко Н.Ф., Афанасьев Е.Н., Тюменцева И.С., Котти Б.К., Малецкая О.В., Исмаилова Г.К., Тохов Ю.М., Антоненко А.Д., Куличенко А.Н. Совершенствование методов индикации возбудителя Лайм-боррелиоза 61

Семенцова А.О., Шиков А.Н., Терновой В.А., Винокурова А.В., Костина Н.Е., Ставский Е.А., Агафонов А.П. Разработка мультиплексной ПЦР в режиме реального времени для идентификации вирусов Марбург, Эбола и Ласса 64

Шиленко И.В., Титов А.А., Ярков С.П., Злобин В.Н. Разработка мультианалитного иммунохроматографического теста для выявления ботулинических токсинов 68

Биотехнология

Громова О.В., Нижегородцев С.А., Дятлов И.А., Кутырев В.В. Оптимизация процесса производства холерной химической таблетированной вакцины с помощью технологии ультрафильтрации 71

Комиссаров А.В., Еремин С.А., Ульянов А.Ю., Алешина Ю.А., Никифоров А.К., Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Белякова Н.И. Разработка экспериментальной технологии концентрирования протективных антигенов штамма *Vibrio cholerae* 569B Инаба методом тангенциальной ультрафильтрации 75

Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Киреев М.Н., Белякова Н.И. Некоторые биохимические различия между производственными штаммами-продуцентами холерной химической вакцины 78

Никифоров А.К., Волох О.А., Еремин С.А., Алёнкина Т.В. Сравнительная оценка штаммов *Yersinia pestis* по уровню продукции капсульного антигена чумного микроба 81

Шепелёв И.А., Еремин С.А., Васин Ю.Г., Волох О.А., Алёнкина Т.В., Белякова Н.И., Кузнецова Е.М., Никифоров А.К. Перспективы применения процессов ультрафильтрации для масштабированного получения основных антигенов чумного микроба и холерного вибриона 84

Информация

О совещании специалистов НИИ по вопросу «Стандартизация молекулярных методов типирования возбудителей особо опасных инфекционных болезней» 88

О рабочем совещании и учениях СПЭБ РосНИПЧИ «Микроб» с участием представителей учреждений Роспотребнадзора и здравоохранения г. Казань 88

О совещании специалистов Роспотребнадзора и противочумных учреждений по проблеме «Холера и патогенные для человека вибрионы» 88

Юбилей

К 80-летию со дня рождения Дмитрия Константиновича Львова 89

К 70-летию со дня рождения Тамары Ивановны Иннокентьевой 89

Памяти коллеги

Памяти Александра Ивановича Кологорова (1936–2011) 90

Памяти Михаила Петровича Иванова (1945–2011) 90

Malakhaeva A.N., Sayapina L.V., Barulina I.S., Kasina I.V., Abdrashitova A.S., Osina N.A., Sharova I.N., Yatsyshina S.B., Mayorov N.V., Zaytseva L.V., Mironova N.P. Assessment of the New Set of Reagents “AmpliSens *Brucella spp.*-FL” with Hybridization-Fluorescent Detection

Orlova T.N., Vasilenko N.F., Afanas'ev E.N., Tyumentseva I.S., Kotti B.K., Maletskaya O.V., Ismailova G.K., Tokhov Yu.M., Antonenko A.D., Kulichenko A.N. Improvement of Lyme Borreliosis Agent Indication Methods

Sementsova A.O., Shikov A.N., Ternovoy V.A., Vinokurova A.V., Kostina N.E., Stavsky E.A., Agafonov A.P. Development of the Multiplex Real-Time PCR for Marburg, Ebola, and Lassa Viruses Identification

Shilenko I.V., Titov A.A., Yarkov S.P., Zlobin V.N. Development of the Multi-Analyte Test for Immune-Chromatographic Detection of Botulinum Toxins

Biotechnology

Gromova O.V., Nizhegorodtsev S.A., Dyatlov I.A., Kutyrev V.V. Optimization of the Process of Cholera Chemical Pelleted Vaccine Production Using Ultrafiltration Technology

Komissarov A.V., Eremin S.A., Ul'yanov A.Yu., Alezhina Yu.A., Nikiforov A.K., Vasin Yu.G., Klokova O.D., Belyakova N.I. Development of the Experimental Technology for Protective Antigens of *Vibrio cholerae* 569B Inaba Concentration by Means of Tangential Ultrafiltration

Kuz'michenko I.A., Gromova O.V., Kireev M.N., Belyakova N.I. Several Biochemical Differences between the Production Strains, Cholera Chemical Vaccine Producers

Nikiforov A.K., Volokh O.A., Eremin S.A., Alenkina T.V. Comparative Assessment of *Yersinia pestis* Strains on the Level of Plague Microbe Capsular Antigen Production

Shepelev I.A., Eremin S.A., Vasin Yu.G., Volokh O.A., Alenkina T.V., Belyakova N.I., Kuznetsova E.M., Nikiforov A.K. Prospects for Application of Ultrafiltration Technology for the Scaled Preparation of Plague Microbe and Cholera *Vibrio* Major Antigens

Information

About the Meeting of specialists from the Russian Research Institutions regarding “Standardization of the molecular methods of typing of the causative agents of particularly dangerous infectious diseases”

About the Working Session and Maneuvers of the specialized anti-epidemic team of the Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe” with participation of representatives from Rospotrebnadzor and Healthcare Institutions, Kazan city

About the Meeting of specialists from Rospotrebnadzor and Plague Control Institutions on the subject of “Cholera and Human Pathogenic Vibrios”

Anniversaries

To the 80-th anniversary of Dmytry Konstantinovich L'vov

To the 70-th anniversary of Tamara Ivanovna Innokent'eva

Revering the Memory of the Colleague

Of blessed memory of Alexander Ivanovich Kologorov (1936–2011)

Of blessed memory of Mikhail Petrovich Ivanov (1945–2011)

Н.В.Попов, Е.И.Кошель, Г.А.Ерошенко, В.В.Кутырев

ФОРМИРОВАНИЕ СОВРЕМЕННЫХ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О МЕХАНИЗМЕ ЭНЗООТИИ ЧУМЫ*Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

В работе рассмотрены основные гипотезы, формирующие представления о природной очаговости чумы. Показана определяющая роль современных достижений в области изучения биопленок и генетики чумного микроба в расшифровке механизма энзоотии чумы. Обсуждена возможная роль нематод в заносе биопленок чумного микроба в организм личинок блох. Рассмотрена эпизоотологическая значимость трансларальной передачи чумного микроба для реализации его вертикальной передачи из почвенного биотопа в организм теплокровных животных. Исследование на чуму личинок блох, добытых на участках стойкого ее проявления, рассматривается как перспективный подход, поскольку он позволяет выявлять готовность паразитарной системы природного очага к возникновению и развитию эпизоотий.

Ключевые слова: природная очаговость, эпизоотия чумы, межэпизоотический период, микроочаговость, биопленка чумного микроба, нематоды.

N.V.Popov, E.I.Koshel, G.A.Eroshenko, V.V.Kutyrev

Formation of Modern Concepts on the Mechanism of Plague Enzoooty*Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov*

Considered are main hypotheses that explain plague natural focaloty. The modern advances in the investigation of plague microbe genetic structure and its biofilms are demonstrated to play determinative role in interpretation of plague enzoooty mechanism. Possible role of the nematodes in the transfer of plague microbe biofilms to the flea larvae is discussed. Considered is epizootiological significance of plague microbe trans-larval transfer for implementation of its vertical transmission from the soil biotope to the organism of warm-blooded animals. Analysis of flea larvae obtained in locations where plague persists, for the presence of plague agent, seems to be a promising approach as it can detect the readiness of the parasitic system of the natural focus for emergence and development of the epizooty.

Key words: plague natural focaloty, plague epizooty, inter-epizootic period, plague microfocaloty, plague microbe biofilm, nematodes.

В течение многих лет в качестве основного механизма поддержания эпизоотической активности природных очагов чумы рассматривалась трансмиссивная передача возбудителя этой инфекции по цепочке грызун-блоха-грызун [19]. Теоретической основой этой гипотезы служили представления об облигатном паразитизме возбудителя чумы и наличии в очагах постоянно текущих эпизоотий. Некоторые исследователи допускали возможность временного (в перерывах между эпизоотиями) сохранения возбудителя чумы в объектах внешней среды [31, 39, 42]. Об этом же свидетельствовали и данные, полученные позже при изучении пространственно-временных особенностей проявления чумы, которые входили в противоречие с классическими представлениями о механизмах распространения возбудителя в природе [9, 20, 26]. Классическая концепция не позволяла удовлетворительно объяснить феномен межэпизоотического периода в равнинных природных очагах чумы, факты «взрывного» развития эпизоотий и регистрации одиночно зараженных чумой животных, возобновления активности очагов после глубоких естественных депрессий численности носителей или смены доминирующих видов основных носителей, одновременного возникновения эпизоотий во многих пунктах энзоотичной территории. Для объяснения этих явлений

ранее привлекалось несколько групп гипотез [1, 18], в том числе – дальние заносы возбудителя чумы [10], его сохранение и циркуляция на ограниченных участках [2], фено- и генотипическая изменчивость чумного микроба [9, 11, 15]. Однако удовлетворительные ответы на ранее поставленные вопросы так и не получены. Вместе с тем на основе огромного фактического материала, полученного при изучении природной очаговости чумы, в 70-х гг. прошлого столетия было выдвинуто общее положение о наличии в природе механизма «первичных» заражений [27]. Среди условий, необходимых для действия такого механизма, рассматривалась возможность существования измененной формы чумного микроба вне организма носителей. Эта гипотеза способствовала возрождению интереса исследователей к различным модификациям гипотезы «теллурической» чумы, в том числе к возможности длительного независимого сохранения номинальной формы возбудителя в почвах нор [28, 30, 32], либо в продуктах метаболизма носителя или переносчика [5, 11]. Также были высказаны предположения о симбиозе возбудителя чумы с сапрофитной микрофлорой, поддерживающейся в субстрате нор грызунов [15].

Следует подчеркнуть, что имевшие место попытки доказать возможность длительного обитания *Y. pestis* в почве основывались на ошибочной мето-

логии. Способность возбудителя чумы существовать в почве оценивалась, исходя из его биологических особенностей, без учета механизмов межвидовых связей в почвенном экотопе. Работы, выполненные по изучению возможности длительного обитания возбудителя чумы в почвенных сообществах, показали перспективность этого направления для объяснения механизма энзоотии чумы [17, 18]. Эти данные послужили косвенным основанием для обоснования гипотезы о том, что чумной микроб может длительно существовать в почве как облигатный паразит одноклеточных организмов [17].

Новым вкладом в теорию природной очаговости чумы явилось открытие способности чумного микроба к образованию биопленки, представляющей собой сообщество клеток, окруженных внеклеточным матриксом [33, 34]. Биопленка *Y. pestis* может обеспечивать длительное сохранение чумного микроба во внешней среде [4, 35]. Появление этих данных создало предпосылки к очередной ревизии сложившихся представлений. В отличие от теоретических разработок двадцатого столетия, оценивающих состояние популяций возбудителя чумы по группе косвенных вторичных признаков (динамика численности носителей и переносчиков, их генерационная и миграционная активность, а также другие экологические особенности), появилась возможность ответить на дискуссионные вопросы с учетом особенностей экологии самого возбудителя чумы. Современные данные о биопленках *Y. pestis* позволяют значительно расширить представления о значении блока преджелудка блох, играющего ключевую роль в классической концепции механизма энзоотии чумы [3]. Доказано, что в преджелудке блох образуются многочисленные микроколонии чумного микроба, которые впоследствии формируют конгломераты, погруженные в органический полимерный матрикс в преджелудке («чумной блок») и средней кишке («глыбки») этих насекомых [3, 12, 38]. Выявление этого феномена имеет особое эпизоотологическое значение, так как раскрывает механизм попадания биопленок чумного микроба в почву нор грызунов путем выведения из кишечника блох мелких «глыбок» при дефекации [5].

В настоящее время установлено, что ведущую роль в выживании *Y. pestis* в блохе играет плаزمида pFra и кодируемый этой плазмидой белок Ymt. Белок Ymt, или «мышинный токсин», является фосфолипазой и образуется только при температуре ниже 37 °C. Штаммы, лишённые плазмиды pFra, утрачивают способность к колонизации пищеварительного тракта блохи [36, 40].

Большую роль в реализации феномена блокообразования играют также продукты хромосомной области пигментации (*pgm* область) [41, 43]. Образование блока в преджелудке блохи коррелирует у чумного микроба с фенотипом пигментсорбции и образованием пигментированных колоний при добавлении в среду роста гема или Конго красного. Установлено, что клетки с Pgm⁺ фенотипом образуют

плотные конгломераты, которые закрепляются среди акантов преджелудка блохи. Клетки с Pgm⁺ фенотипом растут в преджелудке в виде рыхлой массы, легко смываемой с акантов при кровососании [3]. Спонтанная потеря области пигментации приводит к появлению непигментированных мутантов *Y. pestis* [37], которые не способны образовывать блок в преджелудке блох [41, 43]. По-видимому, именно феномен образования биопленок чумного микроба в организме блох служит основой длительного его сохранения в сухих фекалиях и трупах этих насекомых, а также в почве нор теплокровных животных [5, 8, 23].

Формирование биопленок чумного микроба в преджелудке блох происходит в диапазоне температур от 8 до 26 °C. При более высокой температуре процесс образования биопленки прекращается [33, 38]. Температурозависимая регуляция образования биопленки *Y. pestis* свидетельствует о начальной адаптации этого свойства к существованию в беспозвоночных животных и во внешней среде, но не в теплокровных животных (37 °C), в организме которых действуют другие механизмы выживания и защиты клеток возбудителя [13, 14, 43]. Наличие относительно узкого температурного «коридора» для образования биопленок чумного микроба позволяет понять причину четко выраженной сезонности развития эпизоотий чумы в различных ландшафтно-географических зонах равнин и гор [22].

Ведущую роль биопленок в инициации эпизоотий чумы подтверждают также представления о наличии в природе механизма, обеспечивающего автономную передачу бактерий *Y. pestis* из почвенного биоценоза в организм блох [21, 23]. Возможность такой передачи основывается на широко известной способности различных паразитических нематод активно проникать в тело насекомых, в том числе блох [24]. В экспериментах зарубежных и отечественных ученых показана способность к переносу нематодами биопленок *Y. pestis*, формируемых микробом как на их кутикуле, так и в пищеварительном тракте. Показано, что формирование биопленки на кутикуле нематод четко коррелирует с Pgm⁺ фенотипом чумного микроба [6, 33, 34]. Личинки нематод, заселяя организм насекомых, вносят в него различные микроорганизмы, в том числе патогенные бактерии [29]. Эти факты дают основания для предположения о возможности заноса возбудителя чумы в организм блох по цепочке: биопленка чумного микроба – нематода – личинка блох – куколка блох – имаго блох [13, 21]. В почве свободноживущие личинки нематод могут поглощать возбудителя чумы при утилизации его биопленок и поедании различных простейших, которые, возможно, способны длительно сохранять *Y. pestis* [4, 17]. Реализация трансларвальной передачи чумного микроба с дальнейшим завершением метаморфоза личинок блох и выплодом в норах теплокровных животных инфицированных чумой имаго позволяет объяснить причину появления в природных очагах единично зараженных животных в межэпизоотический период. Этот же механизм объясняет нали-

чие стойких участков проявления чумы, так называемых микроочагов, в границах которых эдафические факторы (влажность, наличие органических веществ и др.) наиболее благоприятны для сохранения и воспроизводства биопленок *Y. pestis*. Важно, что оптимум существования в почве личинок нематод и блох, равно как и условий формирования биопленок чумного микроба, полностью совпадают. Последнее позволяет предполагать, что наблюдаемый в природных очагах «взрывной» сезонный и многолетний характер возникновения эпизоотий чумы происходит за счет одновременного пика численности в почве личинок блох и личинок свободно живущих нематод. Поэтому эпизоотии чумы чаще регистрируются в увлажненных, богатых органикой участках очага (понижения рельефа, приколодезные «пятна» и др.) [9, 20], оптимально подходящих для обитания свободно живущих нематод. Все это в целом объясняет хорошо выраженную в границах энзоотичной территории микроочаговость чумы [2], равно как и четко выраженную зависимость эпизоотической активности природных очагов чумы от климатических и эдафических факторов. Возможно также, что в межэпизоотические периоды возбудитель чумы, защищенный биопленкой, способен длительно сохраняться в почве, в том числе в простейших и их цистах [17]. Наступление благоприятных условий для воспроизводства биопленок *Y. pestis* с участием различных представителей почвенной биоты может служить пусковым моментом для начала эпизоотий. Именно с этим, по нашему мнению, связана выраженная цикличность развития в природных очагах крупных эпизоотических волн [20]. При реализации в почве многочисленных цепочек трансларвальной передачи чумного микроба создаются условия для заражения имаго блох, а впоследствии и фоновых видов теплокровных животных – норников (в первую очередь, грызуны и зайцеобразные).

В зависимости от интенсивности воспроизводства чумного микроба в форме биопленок в микроочагах спорадически регистрируют как единичные находки зараженных чумой животных (в первую очередь, блохи), так и взрывные эпизоотии с вовлечением всех фоновых видов грызунов и эктопаразитов. С этих позиций становится понятным отсутствие четкой взаимосвязи между численностью грызунов и эпизоотической активностью природных очагов чумы [25]. Заражения фоновых видов грызунов (зайцеобразных и др.) могут спорадически возникать практически при любой численности зверьков. При установлении оптимальных условий для массового воспроизводства биопленок чумного микроба в микроочагах становится возможным развитие интенсивных эпизоотий среди фоновых видов теплокровных животных – норников. При развитии эпизоотий в многовидовых сообществах грызунов отдельные их виды имеют практически равные шансы заражения чумой. С этим связано отмечаемое непостоянство эпизоотологического статуса отдельных видов носителей чумы при смене их доминирования на конкретной очаговой территории.

Вероятно, что этот механизм определяет полигостальность и поливекторность природных очагов чумы, как и относительность принятого термина – «основной носитель» чумной инфекции [20].

Очевидно, что при развитии эпизоотии имаго фоновых видов блох начинают инфицироваться при кровососании на агонирующих зверьках. Образование очередных генераций биопленок в преджелудке блох завершается отбором Pgm⁺ штаммов, что приводит к накоплению их в виде биопленок в почве.

В качестве заключения отметим, что опираясь на новые данные, касающиеся экологических особенностей чумного микроба, можно ответить практически на все проблемные вопросы эпизоотологии чумы. Кроме того, в целях повышения эффективности эпизоотологического обследования целесообразно расширить спектр исследуемых биологических объектов за счет личинок фоновых видов блох. Ранее в высокогорьях хребта Хангая имела место находка зараженных чумой личинок блох *Oropsylla silantiewi* [7]. Регистрация личинок блох, зараженных *Y. pestis*, на участках стойкого проявления чумы может служить своеобразным индикатором готовности паразитарной системы природного очага к возникновению эпизоотий. В связи с этим также требуется дальнейшее совершенствование методов прогнозирования эпизоотической активности природных очагов чумы, санации микроочагов, предупреждения распространения чумной инфекции за их границы.

Работа поддержана грантом РФФИ 08-04-00731.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акиев А.К. Состояние вопроса по изучению механизма сохранения возбудителя чумы в межэпизоотические годы. Пробл. особо опасных инф. 1970; 4(14):13–33.
2. Акиев А.К. О микроочаговости чумы диких грызунов. В кн.: Природная очаговость, микробиология и профилактика зоонозов. Саратов; 1989. С. 53–60.
3. Бибилова В.А., Классовский Л.Н. Передача чумы блохами. М.: Медицина; 1972. 188 с.
4. Бухарин О.В., Гинцбург А.Л., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизм выживания бактерий. М.: Медицина; 2005. 367 с.
5. Величко Л.Н., Кондрашкина К.И., Ермилов А.П. и др. Экскременты блох – естественная среда долговременного хранения микроба чумы. Пробл. особо опасных инф. 1978; 6(64):51–3.
6. Видяева Н.А., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Кузнецов О.С., Кутырев В.В. Образование биопленки у штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в Астраханской области. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2010; 3:3–7.
7. Демидова Е.К., Емельянова Н.Д. Случай выделения микроба чумы от личинок блох *Oropsylla silantiewi* W., инфицированных в естественных условиях. Докл. Иркут. противочумн. ин-та. 1971; 9:231–2.
8. Донская Т.Н., Попов Н.В., Бережнов А.З., Топорков В., Князева Т. В., Хинц И.В. Обнаружение возбудителя чумы в почве нор малого суслика. В кн.: Эпизоотология и профилактика природноочаговых инфекций. Саратов; 1982. С. 6–9.
9. Дятлов А.П. Эволюционные аспекты в природной очаговости чумы. Ставрополь; 1989. 198 с.
10. Калабухов Н.И. Явление длительных перерывов эпизоотической активности природных очагов чумы и его вероятные причины. Зоол. журн. 1969; 2(48):165–75.
11. Кондрашкина К.И., Величко Л.Н. Анабиоз чумного микроба – одна из форм его долговременного существования во внешней среде. Пробл. природной очаговости чумы. 1980; 2:23–4.
12. Коннов Н.П., Попов Н.В., Величко Л.Н., Князева Т.В. Феномен образования биопленок *Yersinia pestis* в организме блох. Паразитология. 2009; 43(4):330–7.
13. Кутырев В.В., Ерошенко Г.А., Попов Н.В., Видяева Н.А., Коннов Н.П. Молекулярные механизмы взаимодействия возбу-

теля чумы с беспозвоночными животными. Мол. генет. микробиол. и вирусол. 2009; 24(4):169–76.

14. Кутырев В.В., Коннов Н.П., Волков Ю.П. Возбудитель чумы: ультраструктура и локализация в переносчике. М.: Медицина; 2007. 224 с.

15. Лавровский А.А., Попов Н.В. Межэпизоотический период как одна из фаз саморазвития экосистемы природного очага чумы. Пробл. особо опасных инф. 1978; 2(60):5–9.

16. Леви М.И. Гипотезы, объясняющие эпизоотический процесс при чуме. Мед. паразитол. и паразитарн. бол. 1985; 1:36–42.

17. Литвин В.Ю. Сапронозные аспекты энзоотии чумы. Усп. совр. биол. 2003; 123(6):543–52.

18. Никульшин С.В., Онацкая Т.Г., Луканина Л.М. Изучение ассоциации почвенных амёб *Hartmannella rhyssodes* с бактериями – возбудителями чумы и псевдотуберкулеза в эксперименте. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1992; 9–10:2–4.

19. Павловский Е.Н. Природная очаговость трансмиссивных болезней в связи с ландшафтной эпидемиологией зооантропонозов. М.–Л.; 1964.

20. Попов Н.В. Дискретность – основная пространственно-временная особенность проявлений чумы в очагах сусликового типа. Саратов: Изд-во Сарат. ун-та; 2002. 189 с.

21. Попов Н.В., Слудский А.А., Удовиков А.И., Аникин В.В., Яковлев С.А., Каравая Т.Б. К роли нематод [*Secernentea*, *Rhabdidae*] – паразитов блох в энзоотии чумы. Энтомол. и паразитол. исследования в Поволжье. 2006; 5:88–93.

22. Попов Н.В., Слудский А.А., Завьялов Е.В., Удовиков А.И., Табачишин В.Г., Аникин В.В. Оценка возможной роли *Oenanthis isabellina* и других птиц в механизме энзоотии чумы. Поволжский экол. журн. 2007; 3:215–26.

23. Попов Н.В., Слудский А.А., Удовиков А.И., Коннов Н.П., Каравая Т.Б., Храмов В.Н. Оценка роли биоплёнок *Yersinia pestis* в механизме энзоотии чумы. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2008; 4:118–20.

24. Рубцов И.А. Паразиты и враги блох. Л.: Наука; 1981. 99 с.

25. Руденчик Ю.В., Солдаткин И.С., Лубкова И.В., Лобанов К.Н. Оценка связи эпизоотий чумы с численностью носителей и переносчиков в природных очагах. В кн.: Эпидемиология и профилактика чумы и холеры. Саратов; 1983. С. 3–11.

26. Соколов В.Е., Ротшильд Е.В., Дорожко О.В. Развитие взглядов на природную очаговость болезней и современные проблемы этой концепции. Изв. АН СССР. Серия биол. 1984; 4:485–95.

27. Солдаткин И.С., Иванов В.А. Перспективы изучения природных очагов чумы. В кн.: Эпидемиология и эпизоотология чумы. Саратов; 1980. С. 3–8.

28. Тимофеева Л.А., Головачева В.А. Итоги экспериментального изучения роли почвы в сохранении и передаче чумного микроба. В кн.: Состояние и перспективы профилактики чумы. Саратов; 1978. С. 21–2.

29. Adams B.J., Fodor A., Koppenhöfer H.S., Stackebrandt E., Stock S.P., Klein M.G. Biodiversity and systematics of nematode – bacterium entomopathogens. Biological Control. 2006; 37:32–49.

30. Ayyadurai S., Houhamdi L., Lepidi H., Nappes C., Raoult D., Drancourt M. Long-term persistence of virulent *Yersinia pestis* in soil. Microbiology. 2008; 154:2865–71.

31. Baltazard M., Karimi J., Efekhari M. La conservation interepizootique de la peste en foyer invetere. Hypothese de travail. Bull. Soc. Pathol. Exot. 1963; 56:1230–41.

32. Eisen R.G., Gage K.L. Adaptive strategies of *Yersinia pestis* to persist during inter-epizootic and epizootic periods. Vet Res. 2009; 40(2):1.

33. Darby G., Hsu J.W., Ghory N., Falkow S. Plague bacteria biofilm blocks food intake. Nature. 2002; 417:243.

34. Darby C., Chakraborti A., Polit S.M., Daniels C.C., Li Tan, Drace K. *Molnarhadtis elegans* Mutants Resistant To Attachment of *Yersinia* Biofilms. Genetic. 2007; 176: 221–30.

35. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat. Rev. Microbiol. 2004; 2:95–108.

36. Hinnebusch B.J., Rudolf A.E., Cherepanov P. et al. Role of *Yersinia* murine toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. Science. 2002; 296:733–5.

37. Fetherston J.D., Perry R.D. The pigmentation locus of *Yersinia pestis* KIM6+ is flanked by an insertion sequence and includes the structural genes for pesticin sensitivity and HMWP2. Mol. Microbiol. 1994; 4:697–708.

38. Jarret C.O., Deak E., Ishewood K.E., Oyston P.C., Fischer E.R., Whitney A.R. et al. Transmission of *Yersinia pestis* from an infections biofilm in the flea vector. J. Infect. Dis. 2004; 190:783–92.

39. Karimi J. Conservation naturelle de la peste dans le sol. Bull. Soc. Pathol. Exot. 1963; 6:1183–6.

40. Kutyrev V.V., Vidyayeva N.A., Bobrov A.G. et al. The murine toxin gene encodes for a secreted phospholipase D. Bacterial protein toxins. 1997. P. 59–60.

41. Kutyrev V.V., Filippov A.A., Oparina O.S. et al. Analysis of *Yersinia pestis* chromosomal determinants Pgm⁺ and Pst⁺ associated with virulence. Microb. Patog. 1992; 12:177–86.

42. Molaret H.H. Du bacille de la peste durant 28 mois an ter-

rier artificiel demonstration experimentall de la peste dans ses foyers inveteres. C. R. Acad. Sci. 1968; 267:972–3.

43. Perry R.D. A plague of fleas: survival and transmission of *Yersinia pestis*. ASM News. 2003; 69(7):385–9.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Akiev A.K. [State-of-the-art in studying the mechanism of plague agent preservation in the inter-epizootic years]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 1970; 4(14):13–33.
2. Akiev A.K. [About plague microfocus in wild rodents] In: [Natural focality, microbiology and prophylaxis of zoonoses]. Saratov; 1989. P. 53–60.
3. Bibikova V.A., Klassovsky L.N. [Plague transmission by fleas]. M.: Meditsina; 1972. 188 p.
4. Bukharin O.V., Gintsburg A.L., Romanova Yu.M., El-Registan G.I. [Mechanisms of bacterial survivability]. M.: Meditsina; 2005. 367 p.
5. Velichko L.N., Kondrashkina K.I., Ermilov A.P. et al. [Fleas' excrements is a natural environment for long-lasting preservation of plague microbe]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 1978; 64:51–3.
6. Vidiyeva N.A., Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Shavina N.Iu., Kuznetsov O.S., Kutyrev V.V. [The biofilm formation in *Yersinia pestis* strains isolated in Astrakhan region]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2010; 3:3–7.
7. Demidova E.K., Emelianova N.D. [Plague microbe isolation from larvae of the fleas *Oropsylla silantiewi* W. infected in natural conditions]. Dokl. Irkutsk. Protivochoch. Instit. 1971; 9:231–2.
8. Donskaya T.N., Popov N.V., Berezhnov A.Z., Toporkov V.P., Kniazeva T.V., Khintil V. [Plague agent detection in the soil of the little souslik burrows]. In: [Epizootiology and prophylaxis of the natural-focal infections]. Saratov; 1982. P. 6–9.
9. Dyalov A.I. [Evolutionary aspects in plague natural focality]. Stavropol; 1989. 198 p.
10. Kalabukhov N.I. [Phenomenon of the long-lasting pauses in plague natural foci epizootic activity and its probable reasons]. Zool. Zhurnal. 1969; 2(48):165–75.
11. Kondrashkina K.I., Velichko L.N. [Plague microbe anabiosis is one of the modes of its long-lasting existence in the environment]. Probl. Prirodn. Ochagovosti Chumy. 1980; 2:23–4.
12. Konnov N.P., Popov N.V., Velichko L.N., Kniazeva T.V. [The phenomenon of *Yersinia pestis* biofilms formation in the organism of fleas]. Parazitologia. 2009; 43(4):330–7.
13. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Popov N.V., Vidiyeva N.A., Konnov N.P. [Molecular mechanisms of the plague pathogenic agent interaction with invertebrates]. Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. 2009; 4:6–13.
14. Kutyrev V.V., Konnov N.P., Volkov Yu.P. [Plague agent: ultrastructure and localization in the vector]. M.: Meditsina; 2007. 224 p.
15. Lavrovsky A.A., Popov N.V. [Inter-epizootic period as one of the phases of the self-development of the plague natural focus ecosystem]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 1978; 60:5–9.
16. Levi M.I. [Hypotheses that explain plague epizootic process]. Med. Parazit. Parazit. Bol. 1985; 1:36–42.
17. Litvin V.Yu. [Sapronotic aspects of plague enzoooty]. Uspekhi Sovremen. Biol. 2003; 123(6):543–52.
18. Nikulshin S.V., Onatskaia T.G., Lukanina L.M., Bondarenko A.I. [Associations of the soil amoeba *Hartmannella rhyssodes* with the bacterial causative agents of plague and pseudotuberculosis in an experiment]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1992; 9–10:2–5.
19. Pavlovsky E.N. [Natural focality of transmissible diseases associated with landscape epidemiology of zooanthroposes]. M.–L.; 1964.
20. Popov N.V. [Discontinuity is the main spatial-temporal peculiarity of plague manifestations in the foci of the souslik type]. Saratov: Izd-vo Saratov Univ.; 2002. 189 p.
21. Popov N.V., Sludsky A.A., Zavalov E.V., Udobikov A.I., Anikin V.V., Yakovlev S.A., Karavaeva T.B. [On the role of nematodes [*Secernentea*, *Rhabdidae*], flea parasites, in the plague enzoooty]. Entomol. Parazit. Issled. v Povolzh'e. 2006; 5:88–93.
22. Popov N.V., Sludsky A.A., Udobikov A.I., Tabachishchin V.G., Anikin V.V. [Evaluation of the possible role of *Oenanthis isabellina* and other birds in plague enzoooty mechanism]. Povolzhskiy Ekol. Zhurn. 2007; 3:215–26.
23. Popov N.V., Sludsky A.A., Udobikov A.I., Konnov N.P., Karavaeva T.B., Khramov V.N. [Role of *Yersinia pestis* biofilms in mechanisms of plague enzoooties]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2008; 4:118–20.
24. Rubtsov I.A. [Parasites and enemies of the fleas]. L.: Nauka; 1981. 99 p.
25. Rudenichik Yu.V., Soldatkin I.S., Lubkova I.V., Lobanov K.N. [Evaluation of association of plague epizooties with abundance of carriers and vectors in the natural foci]. In: [Epidemiology and prophylaxis of plague and cholera]. Saratov; 1983. P. 3–11.
26. Sokolov V.E., Rotshild E.V., Dorozhko O.V. [Development of views about natural focality of the diseases and modern problems of this conception]. Izv. AN SSSR. Seria Biol. 1984; 4:485–95.
27. Soldatkin I.S., Ivanov V.A. [The prospects of plague natural foci studying]. In: [Epidemiology and epizootiology of plague]. Saratov; 1980. P. 3–8.
28. Timofeeva L.A., Golovacheva V.A. [The results of experimental studying of the soil role in preservation and transmission of plague microbe]. In: [Modern status and prospects of plague prophylaxis]. Saratov; 1978. P. 21–2.

Authors:

Popov N.V., Koshel E.I., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Попов Н.В., Кошель Е.И., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 20.01.11.

З.Ф.Дугаржапова, А.В.Родзиковский, М.В.Чеснокова**НАУЧНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ АЛГОРИТМА
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ***Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока, Иркутск*

Проведен анализ научно-методических подходов к созданию алгоритма эпизоотолого-эпидемиологического расследования случаев сибирской язвы на административной территории. Предложены пять критериев анализа эпидемиологического расследования спорадических случаев и вспышек сибирской язвы для разработки комплекса административных, информационных, противоэпизоотических, противоэпидемических и профилактических мероприятий, целью которых является локализация и ликвидация очага сибирской язвы.

Ключевые слова: сибирская язва, стационарно-неблагополучный пункт, алгоритм, эпидрасследование.

Z.F.Dugarzhapova, A.V.Rodzikovsky, M.V.Chesnokova**Scientific-Methodological Approaches to the Development of Algorithm
for Anthrax Epidemiological Diagnostics***Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk*

Carried out is the analysis of scientific-methodological approaches to the development of algorithm for epizootic and epidemiological investigation of anthrax cases in the administrative territory. Put forward are five criteria of analysis for epidemiological investigation of anthrax sporadic cases and outbreaks, in order to develop the package of administrative, informational, anti-epizootic, anti-epidemic, and preventive measures, aimed at localization and elimination of anthrax focus.

Key words: anthrax, specified potentially-hazardous area, algorithm, epidemiological investigation.

В Российской Федерации учтены более 35 тысяч стационарно-неблагополучных по сибирской язве пунктов (СНП), из них в Сибирском федеральном округе (ФО) – 5609, Южном – 2038, Приволжском – 2534, Центральном – 2206. Наиболее часто спорадические случаи и эпизоотии сибирской язвы с эпидемическими осложнениями отмечаются в субъектах Южного, Приволжского и Сибирского ФО [1, 2, 3, 4].

Эпизоотологические закономерности проявления сибирской язвы в сибирском регионе за 1985–2008 гг. характеризуются неравномерностью территориального распределения с выраженным неблагополучием в южных районах Сибири (Алтайский край, Омская область, республики Бурятия и Тыва); снижением числа заболевших сельскохозяйственных животных (СХЖ) на фоне уменьшения поголовья скота; преобладанием вспышечных случаев (84,8 %); удельного веса заболеваний КРС (45,5 %); заболеваниями животных крестьянских фермерских хозяйств (58,6 %) и личных подворий (41,4 %). Эпидемические осложнения сибирской язвы носят случайный характер, реализуются в бытовых условиях и характеризуются преимущественно контактным путем передачи. Преобладает непрофессиональная заболеваемость приусадебного типа животноводческого подтипа (91,6 %) среди владельцев индивидуального скота при бесконтрольном вынужденном убое пораженных сибирской язвой домашних животных. Основная доля заболевших отмечается среди сельского населе-

ния (95,8 %) мужского пола (90,3 %) трудоспособного возраста – 20–49 лет (72,2 %), не привитых против сибирской язвы. Факторами передачи сибиреязвенного микроба служат мясо и мясoproductы (95,8 %), редко шкуры и кожа СХЖ (4,2 %).

Эпизоотологическая характеристика региона является основой для прогноза возможных эпидемиологических осложнений по сибирской язве и позволяет выявить наиболее активные пункты, определить виды СХЖ, подверженных риску заражения сибирской язвой. Эпидемиологический анализ направлен на основные, а при необходимости и дополнительные показатели заболеваемости людей в СНП для выяснения наиболее вероятного источника инфекции, путей, факторов передачи возбудителя и оценки уровня лабораторной диагностики, лечения, объема профилактической и экстренной профилактики, дезинфекционных мероприятий.

Цель исследования – разработка научно-методических подходов алгоритма эпизоотолого-эпидемиологического расследования спорадических случаев и вспышечной заболеваемости сибирской язвы на административной территории.

Материалы и методы

На основании сбора и анализа собственных данных по эпизоотологии и эпидемиологии сибирской язвы, статистических и отчетных форм

Роспотребнадзора и Россельхознадзора в субъектах Сибири, а также официальных сообщений об основных эпизоотолого-эпидемиологических осложнениях и мероприятиях по профилактике сибирской язвы, состоянии и оснащенности лабораторий особо опасных инфекций управлений Роспотребнадзора и ветеринарной службы, а также оценки эпизоотической и эпидемической активности СНП при анализе кадастров стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов административных территорий, субъектов Сибири и Российской Федерации [6] предложены критерии эпизоотолого-эпидемиологического расследования случаев сибирской язвы и комплекс профилактических мероприятий.

Результаты и обсуждение

Заболевания сибирской язвой встречаются в виде спорадических случаев, реже в виде эпизоотий и эпидемических вспышек. На ряде административных территорий в течение десятилетий болезнь не регистрируется. В настоящее время приобретает особую актуальность проведение эпидемиологического расследования фактов биотерроризма с использованием возбудителя сибирской язвы в качестве биологического поражающего агента. В связи с этим возникает необходимость разработки алгоритмов эпизоотолого-эпидемиологического расследования для объективной оценки ситуации по сибирской язве на конкретной территории с целью разработки или коррекции противосибиреязвенных мероприятий. Для проведения наиболее полного анализа эпизоотологической и эпидемиологической обстановки по сибирской язве и возможности прогнозирования ситуации, необходим широкий спектр информационных данных различного характера, которые определяют основные причины, способствующие возникновению инфекции.

При проведении эпизоотолого-эпидемиологического расследования необходимо использовать следующие критерии анализа: клинический, эпизоотологический, эпидемиологический, лабораторный и информационный. На их основе разрабатывается комплекс административных, информационных, противозооотических, противоэпидемических и профилактических мероприятий, целью которых является локализация и ликвидация очага сибиреязвенной инфекции (рисунок).

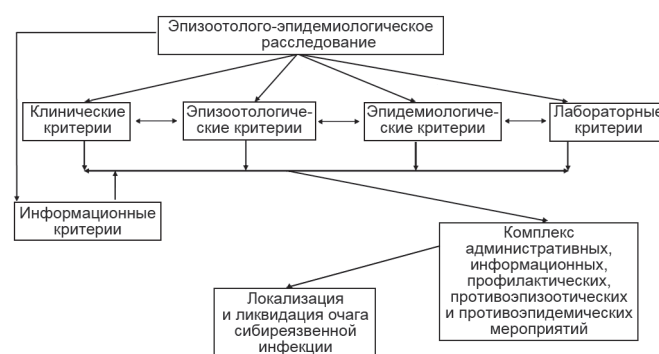
Клинические критерии сибирской язвы разнообразны и зависят от форм болезни, согласно Международной классификации болезней десятого пересмотра (МКБ-10): кожная (A22.0), легочная (A22.1), желудочно-кишечная (A22.2), сибиреязвенная септицемия (A22.7), другие формы сибирской язвы (A22.8), а также сибирская язва неуточненная (A22.9). Инкубационный период составляет в среднем 2–8 дней. Основным методом клинической диагностики остается кожно-аллергическая антраксиновая проба, при постановке которой необходимо

выяснить данные о специфической иммунизации. В 95 % случаев встречается кожная форма болезни [5, 9], возникающая в результате разделки туш и снятия шкур при вынужденном убое скота. Легочная форма сибирской язвы регистрировалась в США во время актов почтового биотерроризма в 2001 г. [7, 8].

Больные подлежат изоляции, госпитализации, этиотропному и симптоматическому лечению. Лабораторное исследование различных видов материала от больных проводится в лабораториях, аккредитованных для работы с микроорганизмами I–II групп патогенности.

Эпизоотологическими критериями являются наличие резервуаров сибиреязвенной инфекции на административной территории (СНП, сибиреязвенный скотомогильник); заболевания животных в течение инкубационного периода и в ходе изучаемой вспышки; сроки заболевания животного; места их содержания до и после заболевания, вынужденного убоя; вид и возраст животного; первичный и окончательный диагноз заболевания; заболеваемость СХЖ и людей в предыдущие годы; объем и сроки проведения плановой иммунизации против сибирской язвы по видам СХЖ, полнота охвата прививками, данные о наличии и использовании вакцины против сибирской язвы, условиях ее транспортировки и хранения. Дополнительно учитываются сведения сельских администраций и других органов местного самоуправления о количестве СХЖ разных видов и форм собственности.

Эпидемиологические критерии включают выявление источника инфекции, пути и факторы передачи. При сборе эпидемиологического анамнеза выясняются возможные условия, способствовавшие заражению: уход за больными и павшими животными; участие в вынужденном убое скота, разделка и транспортировка туш животных, кулинарная обработка мяса и мясopодуkтов; употребление сырых мясopодуkтов; работа с сырьем животного происхождения и культурами микроорганизмов; получение и вскрытие пакетов, емкостей с «белым порошком». В ходе эпидрасследования изучается динамика заболеваемости людей, количество заболевших и сроки заболевания, клинические формы, тяжесть течения и исходы болезни, результаты лабораторного исследования, а



Алгоритм эпизоотологического расследования вспышки сибирской язвы

также определяются группы риска (профессиональные и половозрастные данные). Выясняется количество лиц, контактировавших с источником инфекции и факторами передачи, проводится их активное выявление, наблюдение и экстренная профилактика по эпидемиологическим показаниям. Для оценки иммунной прослойки населения учитывается контингент населения, подлежащий плановой вакцинации и ревакцинации против сибирской язвы, полнота охвата профилактическими прививками профессиональных групп населения. Необходимо учитывать, что группой риска могут быть лица, не имеющие прямого отношения к животным и предприятиям по переработке продуктов животноводства.

Лабораторными критериями установления диагноза сибирской язвы являются положительные результаты ускоренных (ПЦР, МФА) и иммуносерологических методов (РНГА и реакция Асколи), выделение и идентификация культуры *Bacillus anthracis*. Положительный результат в ПЦР позволяет сделать вывод о наличии ДНК возбудителя сибирской язвы в исследуемом материале от животных и больных людей, подтвердить клинический диагноз болезни, наметить направления работы в микробиологической диагностике и эпидемиологическом расследовании. Для определения путей и факторов передачи возбудителя при мониторинге территории СНП проводятся исследования объектов окружающей среды (почва, корма, вода).

Для оценки ситуации по сибирской язве необходимы **информационные критерии**, основанные на анализе многих факторов, в том числе климатических и почвенных характеристик: температура окружающей среды и почв на момент возникновения эпизоотии; типы почв, их кислотность, наличие питательных свойств и токсичность по отношению к сибиреязвенному микробу. На риск возникновения заболеваний оказывают влияние занятия населения и развитие животноводства в личных подворьях, фермерских хозяйствах. Проведение земельных, строительных работ на месте сибиреязвенных скотомогильников и мест убоя скота могут значительно усугубить эпизоотологическую ситуацию по сибирской язве. Кроме того, необходимо оценить степень готовности аккредитованных микробиологических лабораторий учреждений Роспотребнадзора, службы ветеринарии и госпитальных баз муниципальных учреждений здравоохранения.

В ходе проведения расследования разрабатывается комплекс административных, информационных, противоэпизоотических, противоэпидемических и профилактических мероприятий, объем которых зависит от эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по сибирской язве на административной территории.

Противоэпидемические мероприятия по локализации и ликвидации очага сибиреязвенной инфекции проводятся согласно требованиям санитарно-эпидемиологических правил, согласно которым накладывается карантин, определяются

методы уничтожения трупов павших и вынужденно забитых животных. Проводится анализ причин вынужденного убоя СХЖ и уточняются условия, способствовавшие заражению скота (размыв почвы поверхностными и грунтовыми водами, земляные работы, использование земельных участков сибиреязвенных скотомогильников и скотопрогонных трасс). Осуществляется ветеринарное наблюдение за поголовьем скота, лечение и экстренная профилактика, разрабатываются дополнительные противоэпизоотические мероприятия в очаге, связанные с отдельными особенностями ведения животноводства на административной территории.

Дезинфекционные мероприятия в очаге проводятся различными методами с использованием дезинфицирующих средств, обладающих спороцидным действием в соответствующих режимах. При утилизации материалов животного происхождения предпочтение должно отдаваться методу кремации. Контроль качества дезинфекции обязателен и проводится с использованием химических, бактериологических тестов, а также метода ПЦР.

Организация и проведение противоэпизоотических, противоэпидемических и профилактических мероприятий проводится комплексно с участием всех заинтересованных служб и ведомств. Межведомственное взаимодействие, финансирование и информационное обеспечение в очаге возлагается на главу административной территории как руководителя санитарно-противоэпидемической комиссии (СПЭК). Проведение противоэпизоотических профилактических мероприятий в отношении больных, контактировавших и павших животных, возлагается на руководителя территориального ветеринарного управления и противоэпизоотическую группу СПЭК. Противоэпидемические профилактические мероприятия проводятся санитарно-противоэпидемической группой и контролируются руководителем территориального управления Роспотребнадзора. Медицинское наблюдение за больными, лицами с подозрением на заболевание и контактировавшими с источником инфекции и факторами передачи, текущая дезинфекция обеспечивается руководителем муниципальных учреждений здравоохранения и лечебно-профилактической группой СПЭК. Дезинфекционные мероприятия в очаге, использование методов, оценка их объема, качества и эффективности проводятся дезинфекционной группой под контролем руководителей дезинфекционного учреждения, центров гигиены и эпидемиологии, другими учреждениями и организациями различных форм собственности. Микробиологические исследования материала от больных и павших животных, больных людей и лиц, с подозрением на заболевание, объектов окружающей среды проводятся бактериологической группой. Контролируются соответственно руководителями лабораторий службы ветеринарии и Роспотребнадзора, противочумных учреждений в соответствии с требованиями санитар-

ных правил биологической безопасности работы с микроорганизмами I–II групп патогенности и нормативной документации по лабораторной диагностике.

Использование данного алгоритма эпизоотолого-эпидемиологического расследования спорадического случая и вспышечной заболеваемости сибирской язвы позволит достигнуть выполнения поставленной цели по локализации и ликвидации очага сибирской язвы.

Работа выполнена по государственному контракту № 130-Д от 15.06.2010 г. в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 гг.)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балахонов С.В., Болوشيнов А.Б., Дугаржапова З.Ф., Шобоева Р.С., Родзиковский А.В., Иванова Т.А. и др. Эпидемиологическая ситуация по сибирской язве в Республике Бурятия. Дез. дело. 2009; 2:44–7.
2. Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Буравцева Н.П., Куличенко А.Н. Сибирская язва в Российской Федерации в 2009 году: анализ и прогноз. Здоровье населения и среда обитания. 2010; 5(206): 38–9.
3. Инфекционная заболеваемость в Российской Федерации. http://rospotrebnadzor.ru/epidemiologic_situation/33277 (дата обращения 10.01.2011).
4. Ладный В.И., Ющенко Г.В. Сибирская язва на территории Российской Федерации. Эпидемиол. и инф. бол. 2009; 2:36–40.
5. Онищенко Г.Г., Васильев Н.Т., Литусов Н.В., Харченко А.Т., Васильев П.Г., Садовой Н.В., Кожухов В.В. Сибирская язва: актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики. М.: ВУНМЦ МЗ РФ; 1999. 448 с.
6. Черкасский Б.Л., редактор. Кадастр стационарно-неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации: Справочник. М.: ИНТЕРСЭН; 2005. 829 с.

7. Черкасский Б.Л. Эпидемиология и профилактика сибирской язвы. М.: ИнтерСЭН; 2002. 384 с.
8. Artenstein A.W. Anthrax: from antiquity to answers. J. Infect. Dis. 2007; 195(4):471–3.
9. Bossi P., Bricaire F. Anthrax in the era of biowarfare. Presse Med. 2003; 32(4):167–73.
10. Celia F. Cutaneous anthrax: an overview. Dermatol. Nurs. 2002; 14(2):89–92.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Balakhonov S.V., Boloshinov A.B., Dugarzhapova Z.F., Shoboeva R.S., Rodzиковsky A.V., Ivanova T.A. et al. [Epidemiological situation on anthrax in the Republic of Buryatia]. Dез. Delo. 2009; 2:44–7.
2. Eremenko E.I., Ryzanova A.G., Buravtseva N.P., Kulichenko A.N. [Anthrax in the territory of the Russian Federation in 2009: analysis and prognosis]. Zdr. Nas. Sreda Obit. 2010; 5 (206): 38–9.
3. [Infection morbidity in the territory of the Russian Federation] Available from: http://rospotrebnadzor.ru/epidemiologic_situation/33277/ [cited 10 Jan 2011].
4. Ladnyi V.I., Yushchenko G.V. [Anthrax in the territory of the Russian federation.] Epidemiol. Infek. Bol. 2009; 2: 36 – 40.
5. Onishchenko G.G., Vasil'ev N.T., Litusov N.V., Kharechko A.T., Vasil'ev P.G., Sadovoy N.V., Kozhukhov V.V. [Anthrax: relevant aspects of microbiology, epidemiology, clinical picture, diagnostics, treatment, and prophylaxis.] M.: Ministry of Public Health; 1999. 448 p.
6. Cherkassky B.L., editor [Cadastral of the specified potentially-hazardous areas (as related to anthrax) in the territory of the Russian Federation: Reference Book. M.: INTERSEN; 2005. 829 p.
7. Cherkassky B.L. [Epidemiology and prophylaxis of anthrax.] M.: INTERSEN; 2002. 384 p.

Authors:

Dugarzhapova Z.F., Rodzиковsky A.V., Chesnokova M.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. Trilissera St., 78, Irkutsk, 664047, Russia. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Об авторах:

Дугаржапова З.Ф., Родзиковский А.В., Чеснокова М.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и ДВ. 664047, Иркутск, ул. Трилисера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Поступила 18.01.11.

Т.Ю.Красовская¹, С.А.Щербак¹, И.Н.Шарова¹, Е.В.Найденова¹, Е.А.Билько¹, В.Н.Чекашов¹,
А.Н.Матросов¹, С.А.Яковлев¹, А.М.Поршаков¹, М.М.Шилов¹, А.В.Рябова¹, Т.В.Князева¹,
Т.В.Мокроусова¹, З.П.Фёдорова², У.А.Кресова³, Е.А.Талаева⁴, Н.И.Миронова⁴, В.В.Кутырев¹

ИЗУЧЕНИЕ ЦИРКУЛЯЦИИ ВИРУСА ЗАПАДНОГО НИЛА НА ТЕРРИТОРИИ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ В 2010 г.

¹Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»,

²Управление Роспотребнадзора по Саратовской области, ³Центр гигиены и эпидемиологии
в Саратовской области, Саратов; ⁴МУЗ «Городская больница № 2», г. Энгельс

Представлены результаты эколого-эпизоотологического обследования территории Саратовской области, проведенного осенью 2010 г. с целью выявления циркуляции вируса Западного Нила (ЗН) и предпосылок к формированию природного очага лихорадки Западного Нила (ЛЗН). Показано, что в 2010 г. на территории Саратовской области происходила циркуляция вируса ЗН, приуроченная к влажным биотомам, в которую вовлечены фоновые виды мелких млекопитающих.

Ключевые слова: лихорадка Западного Нила, вирус Западного Нила, Саратовская область, эколого-эпизоотологическое обследование, лабораторная диагностика.

T.Yu.Krasovskaya¹, S.A.Shcherbakova¹, I.N.Sharova¹, E.V.Naydenova¹, E.A.Bil'ko¹, V.N.Chekashov¹,
A.N.Matrosov¹, S.A.Yakovlev¹, A.M.Porshakov¹, M.M.Shilov¹, A.V.Ryabova¹, T.V.Knyazeva¹, T.V.Mokrousova¹,
Z.P.Fedorova², U.A.Kresova³, E.A.Talaeva⁴, N.I.Mironova⁴, V.V.Kutyrev¹

Studies of West Nile Virus Circulation in the Territory of the Saratov Region in 2010

¹Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", ²Rospotrebnadzor Administration in the Saratov Region,

³Centre of Hygiene and Epidemiology in the Saratov Region, Saratov; ⁴Municipal Hospital № 2, Engels

Presented are the results of ecological and epizootiological surveillance of the territory of the Saratov region, which was carried out in autumn of 2010. The surveillance was aimed at detection of West Nile (WN) virus circulation and premises for WN Fever natural focus formation. It is demonstrated that in 2010 WN virus circulation took place in damp biotopes of the Saratov region territory, and that common species of small mammals were involved in it. Presented are the results of analysis of the WN virus role in the infectious pathology in the territory of the Saratov region.

Key words: West Nile fever, West Nile virus, the Saratov Region, ecological and epizootiological surveillance, laboratory diagnostics.

С конца 90-х годов прошлого века лихорадка Западного Нила (ЛЗН) ежегодно регистрируется на юге Европейской части России. Глобальное потепление климата, антропогенное воздействие на природу приводят к расширению ареалов носителей и переносчиков ЛЗН и, как следствие, ее возбудителя. Повышает риск заражения людей этой инфекцией посещение мест с высокой численностью комаров. Ослабление эпидемиологического надзора способствует ухудшению эпидемиологической ситуации по ЛЗН.

По данным Референс-центра по мониторингу за лихорадкой Западного Нила (ФГУЗ Волгоградский НИПЧИ Роспотребнадзора), в 2010 г. в Российской Федерации зарегистрировано 523 лабораторно подтвержденных случая заболеваний ЛЗН, из них 6 с летальным исходом. Наибольшее число заболевших отмечено на территориях Волгоградской и Ростовской областей. Вспышки ЛЗН зарегистрированы в Воронежской, Астраханской областях и Краснодарском крае, единичные случаи – в Челябинской области и Республике Калмыкия. Были выявлены завозные случаи инфекции в Республике

Татарстан и Москве [3].

Осложнение летом–осенью 2010 г. эпидемиологической ситуации по ЛЗН в Российской Федерации, в частности в Волгоградской и Воронежской областях, граничащих с Саратовской областью, потребовало от медицинских работников Саратовской области повышенной настороженности в отношении этой инфекции и усиления эпидемиологического надзора и проведения эколого-эпизоотологического обследования территории области.

Основные цели проведенного нами исследования – выявление циркуляции вируса Западного Нила (ЗН) на территории Саратовской области в 2010 г. и предпосылок к формированию природного очага ЛЗН, определение роли вируса ЗН в инфекционной патологии на территории области. Основные задачи – исследование в сезон передачи возбудителя сыновороток крови больных, диагноз которых не исключал роли вируса ЗН в этиологии, на наличие антител к этому вирусу; обследование млекопитающих, птиц и комаров на наличие маркеров (антигенов и/или РНК) вируса.

Материалы и методы

Клинический материал. Осенью 2010 г. было исследовано 50 сывороток крови от 32 больных, находившихся на лечении в МУЗ «Городская больница № 2» (Энгельс Саратовской области) с предварительными диагнозами: лихорадка неясного генеза (4 чел.), ОРВИ (28 чел.). Все обследуемые – жители Энгельса и Энгельсского района, заболевшие с 29 августа по 16 октября 2010 г. От 18 чел. получены парные сыворотки крови. Первый забор крови осуществлялся на 2–19-й день болезни, повторный – на 7–27-й день. От 14 больных исследовано по одной сыворотке крови, взятой на 3–22-й день болезни.

Полевой материал. В период с 22 сентября по 15 октября 2010 г. проведено эколого-эпизоотологическое обследование территорий трех районов Саратовской области: Энгельсского, расположенного в центре области на левом берегу Волги, и южных районов – левобережного Ровенского и правобережного Красноармейского, граничащих с Волгоградской областью. Основное внимание при выборе участков обследования уделяли окрестностям населенных пунктов, располагающихся по берегам водоемов, а также волжским островам.

Птиц добывали отстрелом, мелких млекопитаю-

щих – ловушками. Геро, комаров отлавливали с помощью эксгаустеров. С целью выявления маркеров (антигены и РНК) вируса ЗН исследовано 19 особей птиц 10 видов, 310 экз. мелких млекопитающих 9 видов, 168 экз. комаров 2 родов (таблица).

Для исследования от птиц и млекопитающих брали головной мозг, ткани печени и селезенки. Из органов птиц комплектовали индивидуальные пробы, а из органов млекопитающих – индивидуальные или объединенные пробы (от 2–4 животных с учетом вида животного и места добычи). Всех собранных членистоногих определяли до рода и объединяли в пробы с учетом места сбора в количестве 2–40 экз.

Всего протестировано 200 проб биологического материала: 19 – суспензий органов птиц; 170 – объединенных суспензий органов млекопитающих; 11 – суспензий комаров.

Сыворотки крови людей исследовали на наличие антител классов IgM и IgG к вирусу ЗН с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Использовали тест-системы производства ЗАО «Биосервис» (Боровск Калужской обл.): «Набор реагентов для выявления IgM-антител к вирусу Западного Нила» и «Набор реагентов для выявления IgG-антител к вирусу Западного Нила».

Пробы полевого материала тестировали с це-

Реестр животных и эктопаразитов, добытых на территории трех районов Саратовской области в сентябре–октябре 2010 г., и результаты их исследования на наличие антигенов вируса Западного Нила

Объекты исследования	Количество экземпляров				Всего			
	Энгельсский район		Ровенский район	Красно-армейский район	Кол-во экземпляров	Кол-во проб	Кол-во положительных проб	Положи-тельные пробы, %
	окрестности с. Шумейка	окрестности с. Подгорное						
Млекопитающие								
Домовая мышь	-	3	36	27	66	30	5	16,7±6,9
Малая лесная мышь	17	50	117	18	202	107	2	1,9±1,3
Полевая мышь	-	-	-	15	15	7	0	0
Желтогорлая мышь	-	-	-	3	3	2	0	0
Обыкновенная полевка	3	-	1	1	5	5	3	60,0±24,5
Рыжая полевка	14	-	-	-	14	14	2	14,3±9,7
Малая белозубка	-	-	1	-	1	1	0	0
Обыкновенная бурозубка	1	2	-	-	3	3	0	0
Хомячок Эверсмана	-	-	1	-	1	1	0	0
Итого	35	55	156	64	310	170	12	7,1±2,0
Птицы								
Грач	-	-	-	1	1	1	0	0
Серая ворона	-	-	-	2	1	1	0	0
Обыкновенная горихвостка	-	-	-	1	1	1	0	0
Большая синица	-	-	-	3	3	3	0	0
Сорока	-	-	1	-	1	1	0	0
Речная чайка	-	-	5	-	5	5	0	0
Сизая чайка	-	-	1	-	1	1	0	0
Серебристая чайка	-	-	1	-	1	1	0	0
Большой баклан	-	-	3	-	3	3	0	0
Чомга	-	-	1	-	1	1	0	0
Итого	-	-	12	7	19	19	0	0
Комары								
Род <i>Aedes</i>	68	31	-	-	99	4	0	0
Род <i>Culex</i>	39	5	25	-	69	7	0	0
Итого	107	36	25	-	168	11	0	0

люю обнаружения антигенов вируса ЗН в ИФА с помощью «Набора реагентов для выявления антигенов вируса Западного Нила» (того же производителя), а для выявления РНК вируса использовали две ПЦР-тест-системы: «ГенНил», разработанную в ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов) и родоспецифическую АмплиСенс *Flavivirus-Erh* производства ООО «ИнтерЛабСервис» (Москва). Все исследования проводили в соответствии с инструкциями по применению тест-систем.

Результаты и обсуждение

При исследовании сывороток крови людей специфические антитела к вирусу ЗН и сероконверсия в парных сыворотках выявлены у одного больного – мужчины 49 лет (Ш.), жителя Энгельса. Пациент заболел 3 сентября, находился на лечении в стационаре с предварительным диагнозом лихорадка неясного генеза. Первая сыворотка была взята на 9-й день болезни (11.09.10), титр антител к вирусу ЗН в ней составил: IgM 1:800, IgG 1:100, вторая – на 18-й день болезни (20.09.10) – IgM 1:3200, IgG 1:3200. В эпиданамнезе пациента отсутствовал факт посещения неблагополучных по ЛЗН регионов, но был отмечен выезд на волжские острова в районе с. Шумейка (в 10 км севернее Энгельса) и нападение комаров.

В соответствии с методическими указаниями МУ 3.1.3.2600-10 «Мероприятия по борьбе с лихорадкой Западного Нила на территории Российской Федерации», серологическая диагностика заболевания базируется на результатах однократного обнаружения методом ИФА специфических IgM в сыворотке крови, взятой в острый период болезни, в титре больше или равном 1:800. При тестировании парных сывороток крови (в одном опыте) на наличие IgG к вирусу ЗН о заболевании свидетельствует четырехкратное и более значительное нарастание титра антител во второй пробе по сравнению с первой. Полученные результаты соответствуют диагностическим критериям. Данные были подтверждены Референс-центром по мониторингу за лихорадкой Западного Нила (ФГУЗ Волгоградский НИПЧИ Роспотребнадзора).

В связи с этим РосНИПЧИ «Микроб» и ФГУЗ «ЦГиЭ в Саратовской области» проведено эколого-эпизоотологическое обследование территорий Красноармейского, Ровенского и Энгельского районов области. Первые два района включены в план обследования в связи с тем, что они граничат с Волгоградской областью, неблагополучной по ЛЗН, а Энгельский район – в связи с указанием в эпиданамнезе больного Ш. на отсутствие выезда за пределы этого района и нападение комаров при посещении волжских островов вблизи с. Шумейка Энгельского района.

Красноармейский район расположен в Правобережье на Приволжской возвышенности. Его территория характеризуется выраженной расчлененностью овражно-балочной сетью, усиливаю-

щейся в приволжской части. Природные условия района не способствуют высокой численности птиц. Наибольшая концентрация их отмечена в лесах (воробьиные), окрестностях населенных пунктов (врановые), балочных заливах и устьях рек и по берегам Волги (ржанковые, утки). Наиболее многочисленны птицы антропогенного комплекса (сизый голубь, грач, сорока, ворона, воробы) – 43,9 % от общего числа учтенных птиц. Численность птиц околотоводного комплекса (утки, чайки, кулики) невысокая – 4,4 %. В результате изучения состояния популяций мелких млекопитающих на территории Красноармейского района было установлено негативное влияние засухи лета 2010 г. Средняя численность мелких млекопитающих во влажных биотопах составила 10,5 % попадания в давилки. В отловах они были представлены пятью видами: домовая, малая лесная, полевая и желтогорлая мыши, обыкновенная полевка. При этом явно доминировала домовая мышь – 40,3 % от общего числа грызунов. Добыта всего одна обыкновенная полевка.

Энгельский и Ровенский районы расположены на левом берегу Волги, в низменной долине. Их территория представляет собой равнину со слабо выраженным холмистым рельефом. Природные условия обследованной территории Левобережья благоприятны для популяций птиц и мелких млекопитающих. Их видовой состав здесь более разнообразен, а численность значительно превышает таковую на обследованной территории правого берега Волги. Из птиц наиболее многочисленны представители антропогенного (39,4 % от общего числа учтенных птиц) и околотоводного (35,5 %) комплексов. Средняя численность мелких млекопитающих в 3,6 раза выше, чем в Правобережье (37,7 % попадания в давилки). В отловах было представлено 7 видов мелких млекопитающих: домовая и малая лесная мыши, рыжая и обыкновенная полевки, хомячок Эверсмана, обыкновенная бурозубка и малая белозубка. Явно доминировала малая лесная мышь – 74,8 % от общего числа зверьков. Индекс доминирования домовой мыши составил 16,3 %. Следует отметить, что рыжая полевка была добыта только на островах в пойме Волги в Энгельском районе (10,0 % попадания), а на юге области не встречалась. Численность обыкновенной полевки была низкой (0,6 % попадания, максимум до 6,0 %). Полевая мышь, распространенная в Правобережье как обычный вид, не была отловлена на левом берегу Волги.

В связи с неблагоприятными погодными условиями периода обследования (температура воздуха в ночные часы понижалась до 0 °С, средние дневные температуры составляли 10–12 °С, а в отдельные дни достигали 15–16 °С), комаров удалось отловить только в помещениях дворовых построек (сарай, курятники) и зарослях тростника. Этим объясняется малое количество добытых комаров.

При тестировании 170 проб суспензий органов мелких млекопитающих методом ИФА антигены ви-



Карта-схема расположения пунктов обследования и обнаружения антигенов вируса Западного Нила:
1 – отрицательные результаты; 2 – обнаружены антигены вируса Западного Нила

руса ЗН выявлены в 12 пробах ($7,1 \pm 2,0$) %, таблица, рисунок. При этом из 37 проб органов от млекопитающих, добытых на территории Красноармейского района, антигены вируса содержали 5 проб ($13,5 \pm 5,7$) %: 4 – от домашних мышей, 1 – от малой лесной мыши. Из 90 проб от млекопитающих, добытых на территории Энгельсского района, антигены вируса обнаружены в 5 пробах ($5,6 \pm 2,4$) %: в 3 – от обыкновенной полевки, 2 – от рыжей полевки. Из 43 проб от млекопитающих из Ровенского района положительными были 2 ($4,7 \pm 3,3$) %: 1 – от домашней мыши, 1 – от малой лесной мыши. Следует отметить, что в Энгельсском районе все положительные пробы получены от животных, добытых в окрестностях с. Шумейка (острова на р. Каюковка): из 35 проб суспензий органов мелких млекопитающих, отловленных на этой территории, в 5 ($14,3 \pm 6,0$) % выявлены антигены вируса ЗН.

Все положительные находки зарегистрированы вблизи населенных пунктов: в Красноармейском районе – в окрестностях сел Золотое, Нижняя Студенка, Трубино, Ревино (в окрестностях детского оздоровительного лагеря «Дубрава»), в Энгельсском районе в окрестностях с. Шумейка, в Ровенском районе в окрестностях с. Привольное и п. Береговой.

Анализ видового состава мелких млекопитающих, инфицированных вирусом, показал, что положительные результаты получены при исследовании суспензий органов от обыкновенных полевок – в 3 случаях ($60,0 \pm 24,5$) % исследованных проб от этого вида грызунов, домашних мышей – в 5 ($16,7 \pm 6,9$) %, рыжих полевок – в 2 ($14,3 \pm 9,7$) %, малых лесных мышей – в 2 ($1,9 \pm 1,3$) %, таблица. Домовые и малые лесные мыши

доминируют на обследованной территории.

Пробы биологического материала от птиц и суспензии комаров при исследовании на антигены вируса ЗН были отрицательными. Методом ПЦР РНК вируса в исследованных пробах не обнаружено.

При проведении на протяжении последних 15 лет эколого-эпизоотологических обследований территории Саратовской области мы неоднократно регистрировали антигены и РНК вируса ЗН при тестировании суспензий органов птиц, мелких млекопитающих, суспензий кровососущих членистоногих [2, 5, 6]. Было установлено, что циркуляция вируса наиболее интенсивно осуществляется в степной и полупустынной природно-климатических зонах Саратовской области [5]. Вероятно, занос возбудителя ЛЗН на территорию области происходит в период весенних миграций птиц с территории Волгоградской области, где сформирован стойкий природный очаг инфекции, а также с территории Казахстана, которую охватывает ареал вируса. Климато-географические особенности Саратовской области, разнообразие видового состава животных, среди которых возможна циркуляция вируса ЗН, могут способствовать созданию сезонных, а при адаптации вирусной популяции к местным элементам фауны членистоногих и позвоночных – стойких природных очагов ЛЗН.

Контакт населения области с вирусом подтверждался выявлением иммунной прослойки к возбудителю [1, 4].

Полученные в 2010 г. при серологическом обследовании больных, диагноз которых не исключал роли вируса ЗН в этиологии заболевания, данные, по всей видимости, являются следствием активизации природного очага ЛЗН на территории Волгоградской области, приведшей к расширению ареала вируса ЗН. Об этом свидетельствуют и результаты эколого-эпизоотологического обследования, в ходе которого было показано, что в 2010 г. на территории Саратовской области происходила циркуляция вируса ЗН, приуроченная к влажным биотомам (берега водоемов, волжские острова, овражно-балочные комплексы, интразональные массивы лесов). В циркуляцию вируса были вовлечены фоновые, для обследованных территорий, виды мелких млекопитающих.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о расширении ареала возбудителя ЛЗН на север. При соответствующих погодных условиях можно ожидать осложнения эпидемиологической ситуации по этой инфекции в Саратовской области в 2011 г. В связи с этим разработан и утвержден комплексный план профилактических и противоэпидемических мероприятий по предупреждению случаев ЛЗН на территории области. План включает мероприятия по контролю за циркуляцией вируса ЗН, его верификацией, а также эпидемическими проявлениями ЛЗН. Реализация указанного плана всеми заинтересованными службами и ведомствами направлена на предупреждение возникновения и распространения ЛЗН среди населения области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Красовская Т.Ю., Билько Е.А., Данилов А.Н., Матвеева Т.Ф., Моисеенко О.Г., Щербакова С.А. и др. Результаты исследования сывороток крови населения Пугачёвского и Балаковского районов Саратовской области на антитела к арбовирусам. *ЗНИСО*. 2004; 12(141):25–7.
2. Кутырев И.В., Билько Е.А., Шарова И.Н., Красовская Т.Ю., Чекашов В.Н., Матросов А.Н. Оценка роли фоновых видов мышевидных грызунов в сохранении возбудителей арбовирусных инфекций в полупустынной зоне Саратовского Заволжья. *Пробл. особо опасных инф.* 2008; 3(97):19–22.
3. Путинцева Е.В., Липницкий А.В., Алексеев В.В., Смельянский В.П., Антонов В.А., Мананков В.В. и др. Распространение лихорадки Западного Нила в мире и Российской Федерации в 2010 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 1(107):38–41.
4. Щербакова С.А., Головинская О.Н., Ключева Е.В., Гаранина С.Б., Савицкая Л.В., Куличенко А.Н. и др. Результаты исследования сывороток крови населения Саратова на антитела к арбовирусам. *Вопр. вирусол.* 2002; 3:32–4.
5. Щербакова С.А., Билько Е.А., Ключева Е.В., Данилов А.Н., Плотникова Е.А., Тарасов М.А. и др. Экология распространения арбовирусов на территории Саратовской области. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2005; 5:27–30.
6. Щербакова С.А., Билько Е.А., Найденова Е.В., Кутырев И.В., Красовская Т.Ю., Слудский А.А. и др. Выявление антигенов арбовирусов в комарах и клещах, обитающих на территории Саратовской области. *Мед. паразитол. и паразитарн. бол.* 2009; 2:38–41.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Krasovskaya T.Yu., Bil'ko E.A., Danilov A.N., Matveeva T.F., Moiseenko O.G., Shcherbakova S.A. et al. [The results of blood sera examination for the presence of arbovirus-specific antibodies in the inhabitants of Pugachev and Balakovo districts of the Saratov Region]. *Zd. Nas. Sreda Obit.* 2004; 12(141):25–7.
2. Kutyrev I.V., Bil'ko E.A., Sharova I.N., Krasovskaya T.Yu., Chekashov V.N., Matrosov A.N. [Assessment of the role of mouse-like rodents background species in the preservation of arboviral infections agents in the territory of the semi-desert area of Saratov Zavolzhie]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2008; 3(97):19–22.
3. Putintseva E.V., Lipnitsky A.V., Alekseev V.V., Smelyansky V.P.,

Antonov V.A., Manankov V.V. et al. [Dissemination of West Nile fever in the Russian Federation and in the world in 2010]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 1(107):38–41.

4. Shcherbakova S.A., Golovinskaya O.N., Klyueva E.V., Garanina S.B., Savitskaya L.V., Kulichenko A.N. et al. [Anti-arbovirus antibodies-positive serum screening in population of Saratov]. *Vopr. Virusol.* 2002; 3:32–4.

5. Shcherbakova S.A., Bil'ko E.A., Klyueva E.V., Danilov A.N., Plotnikova E.A., Tarasov M.A., et al. [The ecology and prevalence of arboviruses in the territory of the Saratov Region]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2005; 5:27–30.

6. Shcherbakova S.A., Bil'ko E.A., Naydenova E.V., Kutyrev I.V., Krasovskaya T.Yu., Sludsky A.A., et al. [Arbovirus antigens detection in mosquitoes and ticks, habitat in the territory of the Saratov Region]. *Med. Parasitol. Parasitarn. Bol.* 2009; 2:38–41.

Authors:

Krasovskaya T.Yu., Shcherbakova S.A., Sharova I.N., Naydenova E.V., Bil'ko E.A., Chekashov V.N., Matrosov A.N., Yakovlev S.A., Porshakov A.M., Shilov M.M., Ryabova A.V., Knyazeva T.V., Mokrousova T.V., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Fedorova Z.P. Rospotrebnadzor Administration in the Saratov Region. Saratov, Russia.

Kresova U.A. Centre of Hygiene and Epidemiology in the Saratov Region. Saratov, Russia.

Talaeva E.A., Mironova N.I. Municipal Hospital № 2. Engels, Saratov Region, Russia.

Об авторах:

Красовская Т.Ю., Щербакова С.А., Шарова И.Н., Найденова Е.В., Билько Е.А., Чекашов В.Н., Матросов А.Н., Яковлев С.А., Поршаков А.М., Шиллов М.М., Рябова А.В., Князева Т.В., Мокроусова Т.В., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Фёдорова З.П. Управление Роспотребнадзора по Саратовской области. Саратов.

Кресова У.А. Центр гигиены и эпидемиологии в Саратовской области. Саратов.

Талаева Е.А., Миронова Н.И. Городская больница № 2. Саратовская область, г. Энгельс.

Поступила 08.06.11.

М.Н.Ляпин¹, И.Ю.Сухоносов¹, И.Н.Ежов¹, А.В.Топорков¹, В.П.Топорков¹, М.В.Чеснокова²,
С.А.Косилко², О.Д.Захлебная²

УПРАВЛЕНИЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИЕЙ НА БИОЛОГИЧЕСКИ ОПАСНОМ ОБЪЕКТЕ

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

²Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока, Иркутск

На основании анализа действующей законодательной и нормативно-методической документации, научных публикаций подтверждено наличие на потенциально опасном биологическом объекте подсистемы управления эпидемиологической ситуацией, являющейся элементом системы обеспечения биологической безопасности объекта. Разработан комплект моделей, содержащих схемы управления эпидемиологической ситуацией в случае выявления больного сотрудника учреждения с подозрением на заболевание, вызванное микроорганизмами I–II групп патогенности.

Ключевые слова: потенциально опасный биологический объект, модель, управление эпидситуацией, противоэпидемические мероприятия, оперативный план.

M.N.Lyapin¹, I.Yu.Sukhonosov¹, I.N.Ezhov¹, A.V.Toporkov¹, V.P.Toporkov¹, M.V.Chesnokova², S.A.Kosilko²,
O.D.Zakhlebnaya²

Epidemiological Situation Control at Biohazardous Facility

¹Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov; ²Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk

The analysis of current regulatory requirements and applicable guidelines, as well as scientific papers, confirmed the existence of the subsystem of the control over epidemiological situation at the potentially hazardous biological facility. This subsystem is an element of the facility biosafety support system. Developed is the set of models which contain schemes of epidemiological situation management in case a sick facility officer is detected whose disease is suspected to be caused by the microorganisms of I–II pathogenicity groups.

Key words: potentially hazardous biological facility, model, epidemiological situation management, anti-epidemic measures, operational plan.

Пристальное внимание мировой общественности к проблеме глобальности угрозы для человечества со стороны биологической опасности в последние годы не ослабевает. Источники угроз многочисленны, одна из них – учреждения, осуществляющие деятельность с использованием микроорганизмов-возбудителей инфекционных болезней. Вопросы обеспечения безопасности при работе с патогенными биологическими агентами (ПБА) подлежат государственному регулированию (№ 52-ФЗ от 30.03.1999 «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения», № 128-ФЗ от 08.08.2001 «О лицензировании отдельных видов деятельности») и выполняются в соответствии с профильными нормативными документами [1, 3]. Регламентированы все сферы деятельности: лицензирование учреждений; организация лабораторий; подготовка персонала; наличие специального оборудования; условия безопасной работы, транспортировки, передачи ПБА, обеззараживание инфекционного материала, направленные на обеспечение безопасности для персонала, населения и окружающей среды. Тем не менее, достичь абсолютной безопасности при наличии источника опасности, а в данном случае к ним относятся ПБА, невозможно. Об этом свидетельствуют регистрируемые факты реализации профессионального риска – внутрилабораторные зара-

жения персонала, осуществляющего манипуляции с возбудителями инфекций [5].

Особую опасность для общества представляют случаи заражения ПБА, при которых заболевший становится источником возбудителя тяжело протекающих с высоким процентом летальности инфекций, с естественным механизмом передачи возбудителя от больного человека здоровому.

Целью исследования является определение наличия системы и разработка модели управления эпидемиологической ситуацией на уровне одного биологически опасного объекта.

Материалы и методы

Действующая нормативная документация, приказы ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб», профильные научные публикации. При этом использовался аналитический метод с элементами системного анализа и моделирования.

Результаты и обсуждение

Нормативный документ «Биологическая безопасность» ГОСТ 12.1.008-76, введенный в рамках системы стандартов безопасности труда с 1977 г., распространяется на работы с биологическими объектами и

устанавливает общие требования безопасности. Под биологическими объектами понимаются способные вызывать заболевания микроорганизмы и макроорганизмы, а также продукты их жизнедеятельности. К макроорганизмам отнесены животные, растения и человек. Положения ГОСТа предписывают разработку комплекса государственных и отраслевых стандартов по биологической безопасности (ББ).

Определение понятия ББ в действующей редакции СП [1] представлено как «система медико-биологических, организационных и инженерно-технических мероприятий и средств, направленных на защиту работающего персонала, населения и окружающей среды от воздействия патогенных биологических агентов». Данная трактовка очертила круг специальных требований, выполнение которых признается необходимым при осуществлении работ с патогенными биологическими агентами и позволяет рассматривать противоэпидемические мероприятия как элемент системы организационных и медицинских мероприятий, осуществляемых на потенциально опасном объекте.

Как правило, элемент системы считается ее неделимой частью, что предполагает нецелесообразность исследования его внутреннего строения в пределах данной модели. В то же время рассматриваемый элемент имеет четкое целеполагание, сформулированное требованиями нормативных документов, направленное на предупреждение, а в случае появления – на локализацию и ликвидацию очагов инфекций, возникающих в результате внутрилабораторного заражения сотрудников учреждения. Данное положение заставляет провести более глубокое изучение структуры интересующего нас элемента.

Анализ требований к медицинскому наблюдению за персоналом [1] позволяет выделить наличие специализированной структуры – медицинской службы учреждения, осуществляющей следующие виды деятельности: мониторинг и оценка состояния здоровья персонала; профилактическая иммунизация; клинико-диагностические и лечебные мероприятия в случае появления заболевания сотрудника с характерными симптомами для инфекции, с возбудителем которой он работал.

Кроме того, согласно требованиям [1] в специализированной организации, проводящей работу с возбудителями чумы, сапа, мелиоидоза, глубоких микозов и вирусами I группы патогенности, должен быть изолятор (инфекционный стационар), размещенный в обособленном помещении, оборудованный и оснащенный всем необходимым для поддержания строгого противоэпидемического режима. В стационар изолируют сотрудников при выявлении у них симптомов, характерных для заболеваний, вызываемых указанными агентами, а также допустивших аварию при работе с ПБА или оказавшихся в зоне аварии, что определяет еще один вид деятельности для указанного типа учреждений: обеспечение готовности изолятора для размещения заболевших или оказавшихся в зоне ава-

рии, возникшей при работе с ПБА [1].

Другую структурную группировку, обеспечивающую мониторинг состояния здоровья, представляет персонал, осуществляющий манипуляции с ПБА. Содержание ряда нормативных требований направлено на обеспечение своевременного поступления информации в учреждение по фактам болезни или невыхода на работу сотрудников. Их выполнение возложено на сотрудников учреждения и не касается непосредственно медицинской службы, однако является чрезвычайно важным, выступая в качестве внешнего (в случае заболевшего дома сотрудника) или внутреннего (в случаях, когда заболевание развивается у сотрудника, находящегося на рабочем месте или происходит авария при работе с ПБА) побудителя ответной реакции на возникшую ситуацию.

Нормативной документацией предусмотрено наличие оперативного плана противоэпидемических мероприятий в случае выявления больного сотрудника с подозрением на заболевание, вызванное микроорганизмами I–II групп патогенности. В качестве исходного материала для анализа взят «Оперативный план противоэпидемических мероприятий в случае выявления больного сотрудника с подозрением на заболевание, вызванное микроорганизмами I–II групп патогенности», утвержденный директором ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (№ 46-П от 31.03.2010).

План вводится приказом по учреждению и устанавливает порядок проведения первичных противоэпидемических мероприятий при выявлении больного сотрудника с подозрением на заболевание, вызываемое микроорганизмами I–II групп патогенности, определяет схему взаимного информирования, содержание и последовательность действий должностного персонала учреждения при выявлении заболевшего (с подозрением на заболевание) сотрудника. Планом предусмотрены различные сценарии поступления информации о заболевании сотрудника, в соответствии с которыми закладываются отличающиеся на начальных этапах алгоритмы реализации Плана, представленные в его разделах.

План также содержит приложения, в которых представлены списки руководителей основного и резервного состава, задействованных в реализации оперативного плана, список сотрудников, обеспечивающих лабораторные исследования, дежурных эпидемиологических групп, перечень укладок для врачей, выезжающих на вызов.

На ключевых этапах реализации требований, касающихся введения в действие оперативного плана противоэпидемических мероприятий в случае выявления больного сотрудника с подозрением на заболевание, вызванное микроорганизмами I–II групп патогенности, изоляции сотрудников и проведения специфического лечения, решение принимает руководитель учреждения [5], что определяет единоначалие в медицинском, включая противоэпидемическое, обеспечении работ с патогенными микроорганизмами I–II групп.

Предусматривается передача информации о случаях заболевания сотрудников в результате аварии или лабораторного заражения во время работы с ПБА в территориальные органы Роспотребнадзора и вышестоящие организации [1].

Такими образом, анализ требований к медицинскому наблюдению за персоналом, задач, стоящих перед медицинской службой учреждения, осуществляющего деятельность с использованием ПБА, позволяет выделить в системе медицинского обеспечения, наряду с ежедневной мониторинговой деятельностью, и оперативную противоэпидемическую. Основу противоэпидемической деятельности составляет Оперативный план противоэпидемических мероприятий в случае выявления больного сотрудника с подозрением на заболевание, вызванное микроорганизмами I–II групп патогенности, разрабатываемый в учреждении в соответствии с положениями действующих нормативных документов.

При наличии в учреждении собственного изолятора для больных особо опасными инфекциями эпидемиологическая ситуация может не выйти за пределы объекта, работающего с ПБА. Однако в ряде случаев, например, при отсутствии изолятора или необходимости помещения больного в специализированный стационар, предусма-

тривается задействование Плана оперативного взаимодействия по проведению противоэпидемических мероприятий в случаях возникновения особо опасных инфекций и массовых инфекционных заболеваний на территории субъекта Российской Федерации.

При анализе системы управления часто используется моделирование. Модель, поскольку она абстрактна, ведет к упрощению, что способствует исследованию проблемы. В соответствии с целью анализа модель используется для выделения наиболее важных характеристик объекта в систематизированном виде.

Система управления, являющаяся сложным объектом, не всегда может быть отражена одной моделью, поэтому в подобных ситуациях, когда речь идет о сложных иерархических системах, необходима система моделей для наиболее адекватного отражения сущности объекта исследования [2].

Проведенный анализ Оперативного плана позволил разработать проект комплекта моделей управления эпидемиологической ситуацией на объектовом уровне (рис. 1, 2, 3).

Разработанный проектный комплект моделей содержит схемы управления эпидемиологической ситуацией в случае выявления больного сотрудни-

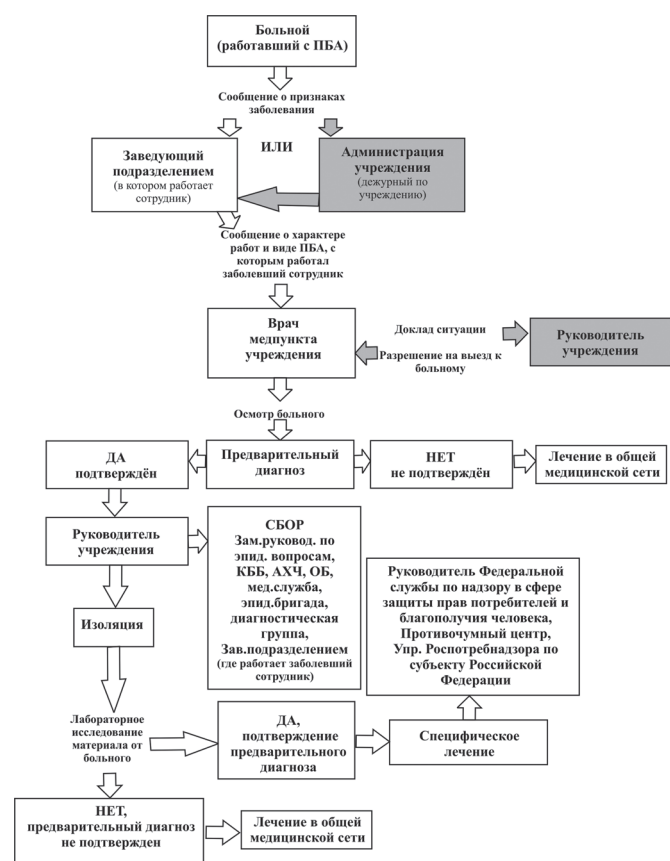


Рис. 1. Модель управления эпидемиологической ситуацией при получении информации о заболевании сотрудника, находящегося на рабочем месте / не вышедшего на работу, в течение рабочего дня:

□ – алгоритм прохождения информации и мероприятий при нахождении сотрудника на рабочем месте, ■ – изменение алгоритма прохождения информации и дополнительных мероприятий в случае невыхода сотрудника на работу

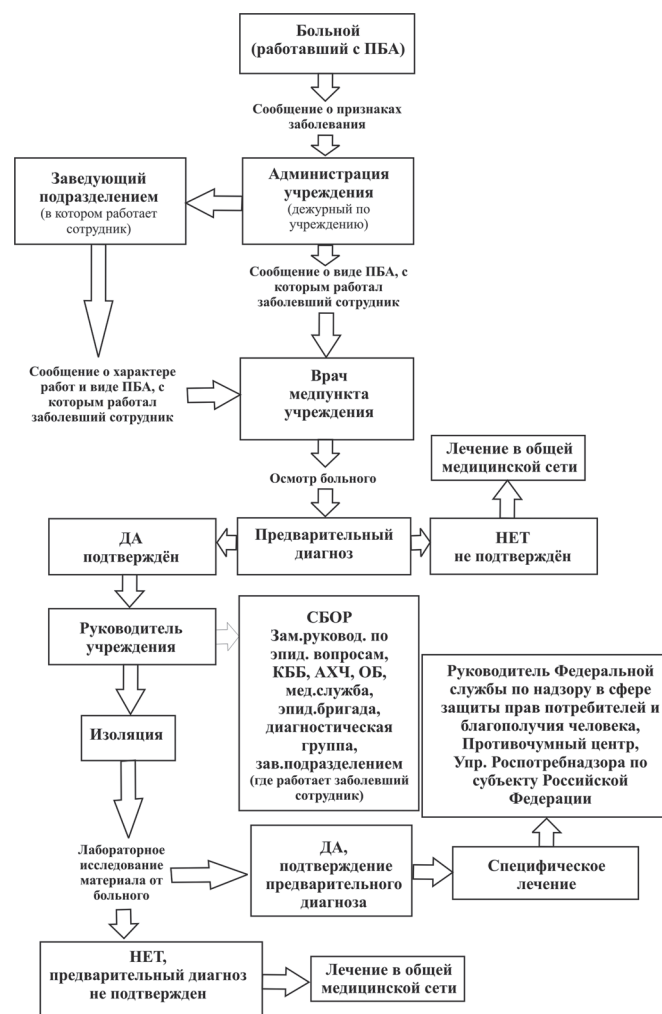


Рис. 2. Модель управления эпидемиологической ситуацией при получении информации о заболевании сотрудника в нерабочее время

ка учреждения с подозрением на заболевание, вызванное микроорганизмами I–II групп патогенности. Данные схемы отражают алгоритм взаимодействия персонала и служб, составлены с учетом требований действующей нормативной документации [1].

Окончанием возникшего осложнения эпидемиологической ситуации на объекте является локализация и ликвидация очага инфекционной болезни, вызванной возбудителем особо опасных инфекций, либо размещение больного в муниципальном (территориальном) учреждении специализированной медицинской сети, что, в соответствии с рискологической терминологией, равнозначно понятиям отказа от риска или передачи риска [4].

Таким образом, анализ нормативных положений, содержащих требования к медицинскому наблюдению за персоналом объекта, осуществляющим деятельность с использованием микроорганизмов I-II групп патогенности (опасности) и Оперативного

Работа выполнена по государственному контракту № 55-Д от 29.06.2010 в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

1. «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)». Санитарно-эпидемиологические правила. СП 1.3.1285-03. Бюл. норм. док. Госсанэпиднадзора. 2003; 3(13):66–144
2. Гулиев М.А., Епифанцев С.Н., Самыгин С.И. Социология и психология управления. Ростов н/Д : Феникс; 2006. 409 с.
3. Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека I–IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.2.1318-03. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России; 2003. 39 с.
4. Хохлов Н.В. Управление риском. М.: Юнити-дана; 2001. 239 с.

5. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL). 5th Edition. 2007 (revised December 2009) [cited 01 Nov 2010]. Available from: <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBL.pdf>

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. [Sanitary and Epidemiological Regulations "Safety of Work with the Microorganisms of I-II Pathogenicity (Hazard) Groups": SR 1.3.1285-03]. Bul. Norm. Method. Dok. Gossanepidnadzor. 2003, 3(13):66-144.
2. Guliev M.A., Epifantsev S.N., Samygin S.I. [Sociology and Psychology of Management]. Rostov-on-Don: Feniks; 2006. 409 p.
3. [Sanitary and Epidemiologic Regulations "Order of Issue of Sanitary and Epidemiological Conclusion on Possibility of Carrying out Work with Human Infectious Diseases Agents of I-IV Groups of Pathogenicity (Hazard), Gene-Engineering Microorganisms, Poisons of Biologic Origin and Helminths": SR 1.2.1318-03]. M.: Minzdrav RF, 2003. 39 p.
4. Khokhlov N.V. [Risk Management]. M.: Yuniti-dana; 2001. 239 p.

Authors:

Lyapin M.N., Sukhonosov I.Yu., Ezhov I.N., Toporkov A.V., Toporkov V.P. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Chesnokova M.V., Kosilko S.A., Zakhlebnyaya O.D. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. Trilissera St., 78, Irkutsk, 664047, Russia. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Об авторах:

Ляпин М.Н., Сухонос И.Ю., Ежов И.Н., Топорков А.В., Топорков В.П. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Чеснокова М.В., Косилко С.А., Захлебная О.Д. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и ДВ. 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Поступила 20.10.10.

В.А.Сафронов¹, А.А.Лопатин¹, А.С.Раздорский¹, Е.В.Куклев¹, В.П.Топорков¹, А.И.Ковтунов²,
Н.В.Пискунова², В.В.Кабин³, Г.Л.Шендо⁴, О.В.Малецкая⁵, А.Г.Бачинский⁶, А.В.Половинкина⁷

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПЫТАНИЙ ТЕХНИЧЕСКОГО ОБРАЗЦА КОМПЬЮТЕРНОЙ ПРОГРАММЫ «СИСТЕМА ПОДДЕРЖКИ ПРИНЯТИЯ УПРАВЛЕНЧЕСКИХ РЕШЕНИЙ»

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

²Управление Роспотребнадзора по Астраханской области, ³Астраханская противочумная станция,

⁴Центр гигиены и эпидемиологии в Астраханской области, Астрахань;

⁵Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, Ставрополь;

⁶Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово;

⁷ООО «Дата+», Москва

Рассмотрен опыт создания систем поддержки принятия решений (СППР) в области обеспечения биологической безопасности. Описаны цели, задачи, функции и архитектура СППР, приведены результаты опытной эксплуатации программы на модельной территории (Астраханская область). Показана эффективность СППР для информационного обеспечения деятельности по контролю внешних и внутренних угроз биологической безопасности. Представлены направления дальнейшего развития СППР.

Ключевые слова: система поддержки принятия решений, географическая информационная система, база данных, критерии, биотерроризм, биологическая безопасность.

V.A.Safronov¹, A.A.Lopatin¹, A.S.Razdorsky¹, E.V.Kuklev¹, V.P.Toporkov¹, A.I.Kovtunov², N.V.Piskunova²,
V.V.Kabin³, G.L.Shendo⁴, O.V.Maletskaia⁵, A.G.Bachinsky⁶, A.V.Polovinkina⁷

Results of the Test-Run of the Computer Software Model “Support System for Managerial Decision Making”

¹Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov; ²Rospotrebnadzor Administration in the Astrakhan

Region, ³Astrakhan Plague-Control Station, ⁴Centre of Hygiene and Epidemiology in the Astrakhan Region, Astrakhan;

⁵Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol; ⁶State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector”,

Kol'tsovo; ⁷“Data +” Ltd Liability Company, Moscow

Considered is the experience of development of the decision support system (DSS) in the sphere of biological safety provision. Described are the objectives, functions, and architecture of DSS. Represented are the results of operational program-testing in the model territory (the Astrakhan region). Indicated is the effectiveness of DSS for information support of the control activity over internal and external biosafety hazards. Determined are the directions for further development of DSS.

Key words: decision support system, geographic information system (GIS), database, criteria, bioterrorism, biosafety.

Основная масса литературы, касающейся использования СППР в области биобезопасности посвящена безопасности генетически модифицированных организмов, а также вновь синтезированных вакцин и лекарственных препаратов.

В качестве примера приведем только одну из последних Российских разработок – систему автоматизации задач выбора врачом наиболее безопасного лекарственного средства для конкретного пациента в условиях информатизации общества и врачебной практики [1]. Однако существуют СППР, решающие сходные задачи в других областях, а также комплексные системы поддержки принятия решений в кризисных ситуациях самого различного происхождения.

Система Экстремум – географическая информационная система, прогнозирующая чрезвычайные ситуации (ЧС) на опасных производственных объектах. Результаты прогнозов позволяют провести анализ промышленной безопасности опасных производственных объектов и разработать ряд важных документов: декларацию промышленной безопасности, план действий по предупреждению и ликви-

дации ЧС, план ликвидации аварийных ситуаций, план ликвидации аварийных разливов нефти и др. Помимо этого, прогнозирование является основой для принятия уполномоченными органами решений, направленных на снижение риска возникновения ЧС и смягчение их последствий. Составление прогнозов при помощи ГИС Экстремум осуществляется путем математического моделирования аварий на опасных производственных объектах [3].

Система ADASHI, по утверждению разработчиков, обеспечивает общий план действий для всех членов команды быстрого реагирования. В ней заложены автоматические функции отслеживания и контроля необходимых данных, в том числе: анализ источника опасности, прогнозирование области поражения, планирование медицинского вмешательства и т.д. Поддержка принятия решений осуществляется через прямые запросы оперативной информации и прогнозов относительно последствий принятия того или иного решения.

Следует также отметить программные продукты компании ABS Consulting, работающей в области

оценки целостности, безопасности и риска в самых разных областях:

- FACET3D™ – трехмерный анализ отдельных зданий или комплекса объектов при взрывах;
- IMSIS™ – управление комплексной безопасностью и целостностью промышленных систем;
- LEADER™ – анализ безопасности и рисков;
- RISKMAN® – вероятностный анализ безопасности сложных промышленных систем, включая отказы оборудования, системные сбои и опасные природные воздействия;
- THESIS™ – обеспечивает упрощенное, интегрированное управление рисками;
- WORLDCATenterprise™ – управление в случаях катастроф. Программное обеспечение включает 181 природную модель опасных ситуаций для 95 стран на шести континентах.

Наиболее интересной с точки зрения обеспечения биобезопасности, по-видимому, является система CIPDSS (Critical Infrastructure Protection Decision Support System). Это сложнейшая система, использующая при работе множество моделей. В частности, взаимодействие популяционной модели (обеспечивает систему информацией о миграционных процессах и трудоспособности населения), общей модели инфекционного заболевания, модели системы здравоохранения и экономической модели оценки стоимости ресурсов, позволило произвести подробную оценку экономических последствий пандемии гриппа в Соединенных Штатах Департаментом Национальной Безопасности США в 2007 г. [4].

С точки зрения противодействия биотерроризму следует отметить две группы СППР: системы для клиницистов и системы для чиновников органов здравоохранения. Перед ними стоят задачи диагностики, лечения, предотвращения дальнейшего распространения заболевания и связи с органами здравоохранения. Задачами органов здравоохранения являются наблюдения (например, как интерпретировать данные наблюдений, когда начинать исследования вспышки, как отслеживать масштабы и распространение эпидемии во время кризиса) и меры, которые следует принять для контроля вспышки или эпидемии [5].

Предпосылки создания СППР Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор). Известно, что в современном мире обеспечение биологической безопасности требует комплексного мониторинга биологических угроз и объективной оценки рисков, связанных с чрезвычайными ситуациями в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Для этого в учреждениях Роспотребнадзора ведется разработка системы поддержки принятия решений на основе ArcGIS в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

Система поддержки принятия решений в об-

ласти обеспечения биологической безопасности – это информационная система, предназначенная для поддержки принятия оптимальных управленческих решений в области биологической безопасности на местном, региональном и федеральном уровнях. Принципиальная сложность состоит в том, что для поддержки принятия оптимального управленческого решения необходимо собрать и проанализировать большое количество разрозненной информации. В целях организации комплексной системы сбора, анализа информации и предоставления ее в оперативно и в понятной форме руководителям для принятия управленческих решений в области биологической безопасности разрабатывается СППР.

Выбор ГИС в качестве одного из основных компонентов СППР обусловлен следующими особенностями деятельности Роспотребнадзора и подведомственных организаций:

Роспотребнадзор имеет территориально распределенную организационную структуру;

Роспотребнадзором и его подразделениями при осуществлении деятельности в рамках предметной области используется очень большой объем информации, в том числе требующей оперативного обновления;

вся информация, с которой работает Роспотребнадзор и его подразделения, соотносится с определенной территорией;

задачи мониторинга чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения характеризуются наличием массивов ретроспективных данных, а также задачами системы: пространственный анализ и районирование территории, моделирование сценариев развития ситуации; визуализация на электронной карте данных о степени риска, предоставление сведений уполномоченным лицам и организациям; оперативное получение с мест информации лицами, принимающими управленческие решения; распределенный ввод текущих данных специалистами с удаленных рабочих мест в учреждениях Роспотребнадзора; централизованное хранение, администрирование и обработка данных; интеграция с внешними информационными системами.

Задачи мониторинга чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения характеризуются необходимостью работы с большими объемами разнородной оперативно обновляющейся информации из территориально распределенных учреждений в структуре Роспотребнадзора и наличием массивов ретроспективных данных.

Учитывая необходимость обеспечения конфиденциальности информации и санкционированного удаленного доступа, возникает потребность в объединении ведомственных информационных ресурсов различных уровней посредством единой базы географических данных.

В настоящее время в структурах Роспотребнадзора имеется более 50 лицензий ArcGIS, исполь-

зование которых не всегда носит системный характер и не поддерживает единый информационный ресурс. Работа с пространственными данными и ГИС не синхронизирована, возможности используются не в полном объеме. Отсутствие единого ведомственного ГИС-пространства затрудняет решение оперативных задач управления ситуациями, выходящими за пределы прямой ответственности конкретного подразделения. Кроме того, отсутствие мощного ведомственного информационного ГИС-ресурса приводит к дублированию информации и возрастанию затрат на сбор данных. Недостаточный уровень информатизации в части системного использования ГИС приводит к проблемам межведомственного взаимодействия, в то время как на современном этапе наиболее актуальные проблемы могут затрагивать сферы интересов нескольких министерств и ведомств.

Несмотря на наличие целого ряда региональных инициатив по созданию геоинформационных ресурсов, в настоящее время не существует географической информационной системы, которая бы в полной мере соответствовала задачам обеспечения биологической безопасности на уровне Российской Федерации.

Ориентация на ГИС при разработке СППР на современном уровне информатизации определяется не только изложенными предпосылками, но и тем, насколько иерархические системы на основе серверных продуктов ESRI вписываются в существующую организационную систему службы.

Архитектура СППР. В соответствии с территориально распределенной организационной структурой и характером деятельности подразделений Роспотребнадзора и подведомственных организаций, разработана многоуровневая архитектура СППР (рис. 1).

Архитектура СППР во многом повторяет организационную структуру Роспотребнадзора на уровне управлений, центров гигиены и эпидемиологии и научно-исследовательских институтов в субъектах Российской Федерации.

При разработке архитектуры СППР был сделан акцент на WEB-технологии, которые в отличие от локальных автоматизированных рабочих мест не

требуют установки дополнительного программного обеспечения и дают максимальную степень оперативности сбора и передачи информации. К преимуществам серверных решений можно отнести нулевую стоимость дополнительных рабочих мест (требуется только доступ в Интернет), что обеспечивает широкие возможности масштабирования системы.

Центральный ГИС-сервер обеспечивает совместную работу баз географических данных, специализированных приложений, автоматизированных рабочих мест (АРМ) аналитиков и WEB-форм. Пользователи СППР естественным образом интегрируются в общую структуру учреждений Роспотребнадзора на уровне управлений и отделений, центров гигиены и эпидемиологии и научно-исследовательских институтов.

Система обеспечивает автоматизацию следующих рабочих мест.

АРМ руководителя предназначено для работы руководителя подразделения Роспотребнадзора. Оно представляет собой WEB-приложение, через которое пользователь получает удаленный доступ к информации различного уровня по защищенному каналу связи, к тематическим электронным картам, генерируемым на основе запросов/выборки, к базам данных, в том числе и географическим. Посредством веб-приложения пользователь может обращаться к OLAP-серверу, отображать результаты запросов в виде таблиц и интерактивных карт.

АРМ специалиста предназначено для удаленного сбора оперативных данных СППР. Данное WEB-приложение основано на существующих утвержденных формах отчетности. Такой подход к сбору оперативной информации, с одной стороны, снижает нагрузку на конечного пользователя системы, а с другой – снижает требования к навыкам работы с ПК. Не менее важным является и снижение ошибок заполнения форм за счет контроля корректности ввода и предоставления возможности выбора из списка текстовых значений (названия населенных пунктов, улиц и др.) вместо ручного ввода. Пользователю предлагается ответить на серию вопросов, после чего генерируется электронный рапорт, который по защищенному каналу передачи данных в зашифрованном виде передается на сервер приложений, где добавляется в соответствующую базу данных.

АРМ аналитика (автоматизированное рабочее место ГИС-аналитика) представляет собой полнофункциональную ГИС и включает в себя инструменты для создания, управления, анализа и визуализации пространственных данных, редактирования топологии и геометрических сетей, геообработки и других функций.

Таким образом, основная идея СППР – это простота для конечных пользователей за счет разделения функций сбора, анализа и представления информации.

В повседневном режиме функционирования СППР по заранее определенному алгоритму обраба-



Рис. 1. Архитектура СППР в субъекте РФ

тывает полученные данные и поддерживает в актуальном состоянии тематические электронные карты, доступные посредством АРМ руководителя. В случае необходимости проведения анализа, не заложенного в систему (например, моделирование развития эпидемии особо опасной инфекционной болезни), подключается аналитик, который публикует результат своей работы на WEB-сервере в виде карты. Кроме того, он с определенной периодичностью задействует инструментарий ГИС для оценки эффективности эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории на уровне субъекта Российской Федерации.

Итоги первого этапа работ по созданию СППР.

На первом этапе разработки СППР (2009 г.) впервые создан и систематизирован перечень внутренних и внешних угроз биологической безопасности в субъектах Российской Федерации. На основании этого перечня сформировано техническое задание на СППР в части генерирования тематических карт по показателям (критериям). Качественный анализ их сущностей и периодичности проявления в различных субъектах РФ показал, что данный перечень отражает существующие эпидемиологические риски в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения и ориентирован на оценку угроз при развитии эпидемического процесса естественного характера.

На основе разработанных критериев биологической безопасности начато формирование базы данных по внутренним и внешним угрозам биологической безопасности в 7 субъектах Российской Федерации, выбранных в качестве модельных территорий (Астраханская, Московская, Новосибирская, Саратовская области, Приморский и Ставропольский край, Санкт-Петербург). Она является неотъемлемой частью функционирования различных уровней системы (региональная система биологической безопасности субъекта Российской Федерации, подсистема биологической безопасности Роспотребнадзора, система биологической безопасности Российской Федерации).

Модель базы данных по внутренним и внешним угрозам биологической безопасности в Российской Федерации разработана впервые. Она основана на критериальном подходе к оценке риска возникновения чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения, клиент-серверной архитектуре системы оценки и принципе персонификации данных в составе базы данных. В дальнейшем планируется оптимизировать структуру БД с учетом результатов анализа первичных материалов, собранных в субъектах Российской Федерации, и дополнить ее параметрами, характеризующими угрозы совершения биотеррористических актов. [2]

Основным итогом первого этапа явилась разработка проекта компьютерной программы «Система поддержки принятия управленческих решений в области биологической безопасности», которая является частью прогнозно-моделирующей системы

оценки биологической опасности развития эпидемий особо опасных инфекций в результате террористических актов и государственной системы биологической безопасности.

Результаты второго этапа работ по созданию СППР. Следующим этапом развития СППР (2010 г.) явилось проведение ее опытной эксплуатации на территории одного из модельных субъектов Российской Федерации – Астраханской области. В ходе проведения эксплуатации задействовано более 20 специалистов из 5 учреждений Роспотребнадзора в 3 субъектах Российской Федерации. План проведения опытной эксплуатации включал: проведение обучающего семинара для специалистов Роспотребнадзора, работающих с учетными формами по регистрации случаев заболеваемости инфекционными болезнями; анализ существующей инфраструктуры информационного обеспечения работы специалистов учреждений Роспотребнадзора; определение базового уровня оснащения рабочих мест компьютерной техникой и средствами доступа к сети интернет; анализ использования специалистами информационно-аналитических систем в повседневной работе; контрольное подключение к СППР на удаленном ГИС-сервере (рис. 2); заключительный семинар с обсуждением итогов и рассмотрение акта сдачи-приемки в опытную эксплуатацию программных средств СППР; выработка рекомендаций по внесению изменений и дополнений в структуру базы географических данных и компьютерной программе СППР.

Таким образом, 15 сотрудников учреждений Роспотребнадзора прошли обучение по использованию СППР на основе материалов, предоставленных фирмой – разработчиком ООО «Дата+», Москва. Анализ существующей инфраструктуры информационного обеспечения работы специалистов учреждений Роспотребнадзора подтвердил потребность в единой системе сбора, хранения и обработки данных с целью обеспечения выработки оптимальных управленческих решений и автоматизации рутинных процессов в повседневной деятельности. Выявлен достаточный уровень технического оснащения

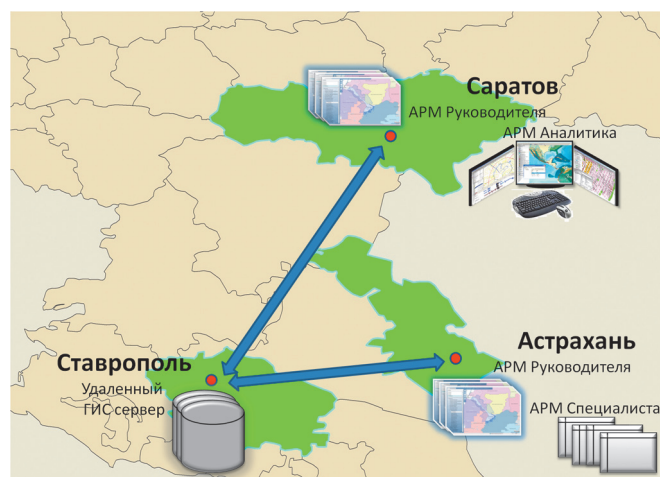


Рис 2. Схема взаимодействия рабочих мест СППР в ходе проведения опытной эксплуатации

информационно-коммуникационным оборудованием во всех учреждениях, участвовавших в проведении опытной эксплуатации, для работы с современными информационными системами, построенными на основе клиент-серверной архитектуры. Критически важным элементом внедрения распределенных систем является скорость доступа к сети интернет. При этом, в учреждениях, участвовавших в проведении опытной эксплуатации, отмечено наличие широкополосного доступа к сети интернет со скоростью от 512 до 4096 kb/s. Анализ использования специалистами информационно-аналитических систем в повседневной работе показал, что в отдельных учреждениях Роспотребнадзора Астраханской области для сбора статистической информации при проведении социально-гигиенического мониторинга используется программное обеспечение, разработанное НПО «Криста», что свидетельствует о высокой степени готовности учреждений к использованию современных информационно-аналитических систем основанных на ГИС-технологиях. При подключении АРМ специалистов в учреждениях Роспотребнадзора к удаленному серверу СППР выявлено соответствие программных продуктов заявленным характеристикам. Зафиксирована корректность обработки запросов к базе географических данных СППР и устойчивость соединения между рабочими местами и удаленным сервером. Это свидетельствует о работоспособности и надежности клиент-серверной архитектуры разрабатываемого сервиса СППР. На заключительном семинаре проведено обсуждение полученных результатов, подведены итоги работы комиссии, с участием руководителей заинтересованных учреждений, и подписан акт сдачи-приемки в опытную эксплуатацию программных средств СППР.

Специалистами ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» совместно с инженерами-программистами ООО «Дата+» на основе проведенного анализа разработан пакет изменений и дополнений к структуре базы географических данных и приложениям СППР, направленный на исправление выявленных недочетов и повышение функциональности сервиса СППР в части разработки дополнительных WEB-форм и тематических электронных карт.

Последующие этапы развития СППР в 2011–2013 гг. будут направлены на: разработку дополнительных WEB форм; наполнение единой базы географических данных; разработку дополнительных тематических карт; разработку модулей моделирования и логистики ликвидации чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации; развитие серверной архитектуры на уровне федеральных округов; получение свидетельств регистрации на программные компоненты СППР и базы данных по внешним и внутренним угрозам биологической безопасности; подготовку к внедрению в промышленную эксплуатацию с проработкой вопросов обеспечения информационной безопасности системы; внедрение СППР

в промышленную эксплуатацию в ряде субъектов Российской Федерации.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Большаков А.Л., Бутенко Д.В.* Применение метода анализа иерархии для поддержки принятия решения при выборе лекарственных препаратов. Программные продукты и системы. 2010; 2:1–3.
2. *Куклев Е.В., Раздорский А.С., Сафронов В.А., Адамов А.К., Лопатин А.А., Топорков В.П.* Разработка структуры базы данных по рискам в области биологической безопасности на уровне субъекта Российской Федерации. Пробл. особо опасных инф. 2010; 1(103):34–3.
3. *Шахраманьян М.А., Нигметов Г.М., Сосунов И.В.* Математическое моделирование как способ поддержки принятия решений в случае возникновения чрезвычайных ситуаций. В кн.: Пожарная безопасность. 2003. С. 240–1.
4. *Bravata D., McDonald K., Owens D.* Bioterrorism Preparedness and Response: Use of Information Technologies and Decision Support Systems. Agency for Healthcare Research and Quality. Evidence Report/Technology Assessment. 2002; 59:10–3.
5. *Bravata D.M., Sundaram V., McDonald K.M., Smith W.M. et al.* Evaluating Detection and Diagnostic Decision Support Systems for Bioterrorism Response. Emerg. Infect. Dis. 2004; 10:100–8.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. *Bol'shakov A.L., Butenko D.V.* [Application of hierarchy analysis-method for backup in the decision making on the choice of medicinal preparations]. Progr. Prod. Sist. 2010; 2:1–3.
 2. *Kuklev E.V., Razdorsky A.S., Safronov V.A., Adamov A.K., Lopatin A.A., Toporkov V.P.* [Development of the structure of the database on the risks in the sphere of biological safety at the level of constituent unit of the Russian Federation]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; 1(103):34–3.
 3. *Shakhrman'yan M.A., Nigmatov G.M., Sosunov I.V.* [Mathematic modeling as a means of support for the decision making in case of emergency]. In: [Fire Safety Engineering]. M.: Izd. Grotek; 2003. P. 240–1.
- Authors:**
Safronov V.A., Lopatin A.A., Razdorsky A.S., Kuklev E.V., Toporkov V.P. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru
Kovtunov A.I., Piskunova N.V. Rosпотребнадзор Administration in the Astrakhan Region. Astrakhan, Russia.
Kabin V.V. Astrakhan Plague-Control Station. Astrakhan, Russia.
Shendo G.L. Centre of Hygiene and Epidemiology in the Astrakhan Region. Astrakhan, Russia.
Maletskaya O.V. Stavropol Research Anti-Plague Institute. Stavropol, Russia.
Bachinsky A.G. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia.
Polovinkina A.V. "Data +" Ltd Liability Company. Moscow.

Об авторах:

- Сафронов В.А., Лопатин А.А., Раздорский А.С., Куклев Е.В., Топорков В.П.* Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru
Ковтунов А.И., Пискунова Н.В. Управление Роспотребнадзора по Астраханской области. Астрахань.
Кабин В.В. Астраханская противочумная станция. Астрахань.
Шендо Г.Л. Центр гигиены и эпидемиологии в Астраханской области. Астрахань.
Малецкая О.В. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru
Бачинский А.Г. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово.
Половинкина А.В. ООО «Дата+». Москва.

Поступила 28.10.10.

Т.М.Головинская, Н.П.Буравцева, О.И.Цыганкова, Е.И.Еременко

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ СЕРИЙ СИБИРЕЯЗВЕННЫХ БАКТЕРИОФАГОВ ГАММА А-26, К ВИЭВ, ВА-9 И FАH-ВНИИВВИМ

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, Ставрополь

Изучены диагностические свойства 4 сибиреязвенных бактериофагов. Выявлены различные спектры специфической литической активности и специфичности бактериофагов К ВИЭВ, ВА-9, Гамма А-26 и Fаh-ВНИИВВИМ. Обладающие широким спектром специфической активности бактериофаги К ВИЭВ и ВА-9 имели относительно низкую специфичность. Напротив, бактериофаг Fаh-ВНИИВВИМ, проявивший абсолютную специфичность, обладал недостаточно широким спектром специфической литической активности.

Ключевые слова: сибиреязвенные бактериофаги, литическая активность, специфичность, *Bacillus anthracis*, сапрофиты.

T.M.Golovinskaya, N.P.Buravtseva, O.I.Tsygankova, E.I.Eremenko

Comparative Study of Lytic Activity and Specificity of Anthrax Bacteriophages Gamma A-26, K VIEV, VA-9 and Fаh-VNIIVV&M Batches

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol

Studied are diagnostic properties of four anthrax bacteriophages. Indicated are various spectra of specific lytic activity and specificity of bacteriophages Gamma A-26, K VIEV, VA-9 and Fаh-VNIIVV&M. K VIEV, VA-9 bacteriophages with wide spectrum of specific activity possess relatively low specificity. On the contrary, Fаh-VNIIVV&M bacteriophage with high specificity exhibited narrow spectrum of specific lytic activity. Gamma A-26 bacteriophage is proposed for application as a diagnostic one, as it lyses *B. anthracis* strains of all types, its specificity being equal to 90 %.

Key words: anthrax bacteriophages, lytic activity, specificity, *Bacillus anthracis*, saprophytes.

Несмотря на очевидный прогресс в развитии новых методов лабораторной диагностики, использование традиционных методов для идентификации возбудителей особо опасных инфекций, в частности, сибирской язвы, не утратило своего значения и в настоящее время. Сведения о применении сибиреязвенного бактериофага для диагностики можно найти не только в отечественной, но и в зарубежной литературе [4, 5, 6, 7]. Определение лизабельности выделенных культур специфическим бактериофагом некоторые исследователи считают одним из наиболее надежных, быстрых и простых методов идентификации *Bacillus anthracis*. В связи с этим тест с бактериофагом является одним из трех опорных тестов, по которым сибиреязвенный микроб можно отличить от близкородственных бацилл.

Сибиреязвенные бактериофаги известны достаточно давно. В 1951 г. McCloy получила высокоактивный специфический фаг, применив оригинальную методику выделения его из лизогенных культур *Bacillus cereus* и используя в качестве индикаторного штамма аспорогенную культуру сибиреязвенного микроба. С тех пор в разных странах мира авторы, используя методику McCloy и ее штаммы, а также собственные штаммы культур, получали сибиреязвенные фаги как из лизогенных культур, так и из почвы [1]. Для лабораторной диагностики сибирской

язвы предложено несколько бактериофагов. Они отличаются спектром литической активности и специфичностью, характеристиками, которые определяют их диагностическую ценность.

Целью настоящей работы была сравнительная оценка спектра литической активности и специфичности сибиреязвенных бактериофагов, имевшихся в нашей коллекции.

Материалы и методы

Были изучены диагностические свойства 4 сибиреязвенных бактериофагов: Fаh-ВНИИВВИМ (коммерческий препарат, получен в 2008 г. из ГНУ ВНИИ ветеринарной вирусологии и микробиологии, г. Покров, в 2008 г.), ВА-9 (получен из Молдавского института эпидемиологии и гигиены в 1969 г.), К ВИЭВ (коммерческий препарат производства биофабрики г. Сумы Украинской ССР, получен в 1989 г.), бактериофаг Гамма А-26 (получен из ГИСК им. Л.А.Тарасевича в 1973 г.). Бактериофаги ВА-9 и К ВИЭВ в течение нескольких лет хранились в запаянных ампулах при температуре от 4 до 6 °С. В 2009 г. после нескольких пассажей на бульонной культуре вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 фильтраты были использованы для определения их литического действия. В работе использовали бактериофаг Гамма

А-26, произведенный в экспериментальных сериях, в 2002 г. (серия 1-02, лиофильно высушенный) [3] и в 2009 г. (серия 1-09, жидкий) в лаборатории сибирской язвы Ставропольского научно-исследовательского противочумного института.

Для определения спектра литической активности бактериофагов использовали 39 типичных вирулентных и 10 атипичных штаммов *B. anthracis*, выделенных в разные сроки из патологического материала от больных людей, животных и трупов, а также из разных источников внешней среды, и 7 вакцинных штаммов. Спектр литической активности выражали процентным отношением количества лизировавшихся бактериофагом штаммов *B. anthracis* к общему количеству штаммов сибиреязвенного микроба. Оценку специфичности проводили с 74 штаммами представителей рода *Bacillus*, не относящихся к виду *B. anthracis*. Использовали 18 штаммов *B. cereus*, 14 штаммов *Bacillus thuringiensis*, 14 штаммов *Bacillus subtilis*, 7 штаммов *Bacillus megaterium*, 1 штамм *Bacillus mesentericus*, 20 штаммов *Bacillus species* (*spp.*). Специфичность выражали процентным отношением количества не лизировавшихся штаммов бацилл, не относящихся к виду *B. anthracis*, к общему количеству несибиреязвенных бацилл.

Все штаммы микроорганизмов были из коллекции лаборатории сибирской язвы СтавНИПЧИ (табл. 1).

Чувствительность испытуемой культуры к бактериофагу оценивали чашечным методом (спот-тест) [2]. В 3–5 мл бульона Хоттингера засеивали бактериологической петлей 18-часовую вегетативную культуру исследуемого штамма и культивировали в течение 5–6 ч, после чего в объеме одной капли наносили на подсушенную поверхность пластин агар

Хоттингера. После полного впитывания жидкости в центр участка, засеянного культурой, наносили каплю цельного препарата бактериофага. После впитывания жидкости чашки переворачивали и инкубировали при 37 °С в течение 20 ч. Результат оценивали визуально. Посевы просматривали невооруженным глазом. Лизис оценивали по четырехкрестовой системе. Полный лизис культуры на месте нанесения бактериофага оценивали на «++++»; наличие единичных колоний культуры на фоне зоны ее лизиса в месте нанесения бактериофага – на «+++»; резкое ослабление роста – на «++»; наличие единичных негативных колоний бактериофага на фоне сплошного роста культуры – на «+», отсутствие лизиса – «–». Положительной считали пробу при оценке не менее чем на «+++».

Результаты и обсуждение

Определение спектра литической активности. Бактериофаг Fah-ВНИИВВиМ вызывал лизис 41 штамма *B. anthracis*, что составляло 73,2 %. Бактериофагом Fah-ВНИИВВиМ не лизировались типичные вирулентные штаммы *B. anthracis* 1194; 1198; 1199; 300/31; 644/268; 531/17 603/39; 1056/1; 646/294; 213/10; 12/71 и атипичные штаммы 304/137-2; 592/10 и 595/40. Бактериофаги К ВИЭВ, ВА-9 и Гамма А-26 серии 1-09 лизировали все 56 штаммов сибиреязвенного микроба, что составляло 100 %. Бактериофаг Гамма А-26 серии 1-02 лизировал 55 штаммов или 98,2 % от всех взятых в опыт, им не лизировалась только одна культура вирулентного штамма *B. anthracis* 73/42. Эти данные позволяют сделать вывод о более узком спектре литической активности бактериофага Fah-ВНИИВВиМ по сравнению с другими бактериофагами. Бактериофаги К ВИЭВ, ВА-9 и Гамма А-26 обладали практически идентичным спектром литической активности.

Определение специфичности сибиреязвенных бактериофагов. Результаты исследования показали, что только бактериофаг Fah-ВНИИВВиМ не вызывал лизиса изученных штаммов и обладал 100 % специфичностью (табл. 2). Бактериофаг К ВИЭВ лизировал 14 штаммов, фаг ВА-9 – 13 штаммов, бактериофаг Гамма А-26 серии 1-09 – 7 штаммов, а фаг Гамма А-26 серии 1-02 – 6 штаммов из всех взятых в опыт штаммов несибиреязвенных бацилл. При этом бактериофаг К ВИЭВ лизировал 4 из 18 штаммов *B. cereus*, 2 из 14 штаммов *B. thuringiensis*, 4 из 14 штаммов *B. subtilis*, 2 из 7 штаммов *B. megaterium*, единственный штамм *B. mesentericus* и один из 20 неидентифицированных штаммов бацилл (*Bacillus spp.*). Его специфичность составляла 81 % и была наименьшей среди всех бактериофагов. Незначительно выше была специфичность фага ВА-9 (82,4 %). Более высокой специфичностью обладал бактериофаг Гамма, ее показатель укладывался в требования, предъявляемые к диагностическим препаратам (не менее 90 %).

Известно, что наиболее близкими сибиреязвен-

Таблица 1

Штаммы бацилл, использованные в работе

Вид микроорганизмов	№ или названия штаммов
<i>Bacillus anthracis</i>	603/39; 68/12; 566/762; 1190; 1194; 18/29; 1056/1; 73/42; 11/73; 658/543; 1191; 880/372; 1186; 914/213; 14/41; 860/25; 1198; 5/1; 1199; 592/10; 594/37; 645/29; 941/21; 14/41-1; 300/31; R 140 II; 940/16; 81/1; 646/294; 596/9; 304/137-2; 1; 12/64; 644/268; 12/16; 1 (CO) S; 513/1; 542/15; 228; 12/16 S; 303/137-1; 213/10; 643/267; 519/644; 15/47; 595/40; 1265; 12/71; 531/17; 228/8; 55; СТИ-1; СТИ-ПР; 71/12; Ichtman; Sterne 34 F ₂
<i>Bacillus cereus</i>	8; 183; 4/43; 2527; 45; 569RM-1; 569 RK-36; ATCC 6464 CP-53 (25); ATCC 6464 CP-53 (26); NRL 569; NRL 569 CP-51; 569 RM 20 S; 8035; 111; 16; 96; 104; GP-7 Tc BA
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Ser. 1; Ser. 2; Ser. 3; Ser. 4; Ser. 5; Ser. 6; Ser. 7; Ser. 8; Ser. 9; Ser. 10; Ser. 11; Ser. 12; Var. Pasteur; Var. Finitimus
<i>Bacillus spp.</i>	96; 583; 689; 374; 197; 27; 430; 242 R; 242 SM; 449; T1; T2; 360; 1312; 80; T3; 250; B ₁ -1024; 565; 146
<i>Bacillus subtilis</i>	11774; 6633; 168; 168 pBC16; 3; 35; 37; 36; 38; J2; PY 313; 83; 336; 6346
<i>Bacillus megaterium</i>	1; 2; 3; 5; 6; 89; 654
<i>Bacillus mesentericus</i>	B-1 1024

Специфичность сибиреязвенных бактериофагов

Бактериофаг	Кол-во штаммов бацилл отдельных видов, лизирующихся бактериофагом						Всего	Специфичность, %
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus mesentericus</i>	<i>Bacillus species</i>		
К ВИЭМ	4/18*	2/14	4/14	2/7	1/1	1/20	14/74	81
ВА-9	4/18	1/14	4/14	2/7	1/1	1/20	13/74	82,4
Fah-ВНИИВВиМ	0/18	0/14	0/14	0/7	0/1	0/20	0/74	100
Гамма А-26 (с 1-02)	0/18	0/14	4/14	2/7	0/1	0/20	6/74	91,9
Гамма А-26 (с 1-09)	0/18	0/14	4/14	2/7	0/1	1/20	7/74	90,5

*Количество лизирующихся штаммов/общее количество штаммов.

ному микробу по всем свойствам являются *B. cereus* и *B. thuringiensis*, об этом свидетельствует и тот факт, что предшественник сибиреязвенного бактериофага Гамма был выделен из штамма *B. cereus* W. Поэтому следовало ожидать, что именно эти виды достаточно часто будут неспецифически лизироваться сибиреязвенными бактериофагами. Действительно, из 14 штаммов несибиреязвенных бацилл, лизирующихся бактериофагом К, 6 были представлены *B. cereus* и *B. thuringiensis*. Почти такой же характер неспецифического лизиса имел и бактериофаг ВА-9. Однако эти бактериофаги лизировали столько же штаммов *B. subtilis* и *B. megaterium*, а бактериофаг Гамма лизировал только те же штаммы этих двух видов, не проявляя неспецифической активности в отношении *B. cereus* и *B. thuringiensis*.

Таким образом, проведенное сравнительное исследование выявило разные спектры специфической литической активности и специфичности сибиреязвенных бактериофагов К ВИЭВ, ВА-9, Гамма А-26 и Fah-ВНИИВВиМ. Обладающие широким спектром специфической активности бактериофаги К и ВА-9 имели относительно низкую специфичность. Напротив, бактериофаг Fah, проявивший абсолютную специфичность, обладал недостаточно широким спектром специфической литической активности. Наиболее приемлемыми эти два показателя были у бактериофага Гамма А-26.

Полученные результаты позволяют сделать некоторые выводы. Изученные бактериофаги различаются по своему литическому спектру и доля неспецифических результатов теста с бактериофагами составляет от 0 до 18,6 % для разных фагов. В диагностических целях представляется целесообразным использование бактериофага Гамма А-26. Специфичность действия этого бактериофага со-

ставляет более 90 %, он способен лизировать штаммы *B. anthracis* всех типов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Левина Е.Н., Архипова В.Р. Сравнительное изучение сибиреязвенных бактериофагов. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1967; 9:24–8.
2. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Мокриевич А.Н. и др. Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы. М.: ЗАО МП «ГИГИЕНА»; 2009. 304 с.
3. Цыганкова О.И., Солодовников Б.В. Способ выращивания сибиреязвенного бактериофага Гамма. Патент РФ 2133273, опубл. 20.07.1999. Бюл. № 20.
4. Ezzell J.W., Abshire T., Ibrahim S., Teska J. et al. Identification of *Bacillus anthracis*: an overview. 3rd International Conference on Anthrax. Plymouth, England, 7–10 September, 1998. P. 47.
5. Kiel J.L., Parker J.E., Holwitt E.A. et al. A selective growth medium for the rapid environmental recovery and identification of *Bacillus anthracis*. 3rd International Conference on Anthrax. Plymouth, England, 7–10 September, 1998. P. 54.
6. Redmon C., Henderson I., Turnbull P.C.B., Bowen J. Phage from different strains of *Bacillus anthracis*. Salisbury Med. Bull. Spec. Suppl. 1996; 87:60–3.
7. Turnbull P.C.B. Definitive identification of *Bacillus anthracis*. 3rd International Conference on Anthrax. Plymouth, England, 7–10 September, 1998. P. 12.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Levina E.N., Arkhipova V.R. [Comparative study of anthrax bacteriophages]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1967; 9:24–8.
2. Marinin L.I., Dyatlov I.A., Mokrievich A.N. et al. [Methods of study of *Bacillus anthracis* biological properties]. Moscow: ZAO MP "Gigiena", 2009. 304 p.
3. Tsygankova O.I., Solodovnikov B.V. [Method of Anthrax Gamma Bacteriophage Growing]. RF Patent 2133273. 20 Jul 1999.

Authors:

Golovinskaya T.M., Buravtseva N.P., Tsygankova O.I., Eremanko E.I. Stavropol Research Anti-Plague Institute. Sovetskaya St., 13–15, Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Об авторах:

Головинская Т.М., Буравцева Н.П., Цыганкова О.И., Еременко Е.И. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 11.10.10.

Г.В.Кочнева¹, В.А.Мануйлов², И.Г.Нетесова³, Е.В.Чуб¹, Р.Б.Баяндин¹, Г.Ф.Сиволобова¹,
А.А.Гражданцева¹, С.В.Нетесов²

ГЕНОТИПЫ И СУБТИПЫ ИЗОЛЯТОВ ВИРУСА ГЕПАТИТА В НА ТЕРРИТОРИИ СИБИРИ

¹Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово;

²Новосибирский государственный университет; ³ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск

Определена встречаемость, серотипическое и генотипическое разнообразие изолятов вируса гепатита В (ВГВ) в Новосибирской области (n=2000), среди представителей коренного населения Аларского района Иркутской области (n=487) и Шурышкарского района (Ямало-Ненецкий АО) (n=657). Частота выявления HBsAg среди представителей разных групп населения Новосибирской области варьировала в пределах 3,6–35,0 %, в Аларском районе составила 8,2 %, в Шурышкарском – 3,2 %. У населения Сибири преобладают изоляты генотипа D ВГВ (92–97 %), в небольших количествах встречаются генотипы А (1,7 %) и С (1,2–8 %). Выявленная различная встречаемость субгенотипов ВГВ и субтипов HBsAg в двух группах аборигенов Сибири (в Аларском районе – субгенотип D3 и субтип *ayw2*, в Шурышкарском районе – D2 и *ayw3*) позволяет предположить существование, по крайней мере, двух обособленных вирусных популяций ВГВ, циркулирующих среди разных групп коренного населения Сибири.

Ключевые слова: генотип, субгенотип, субтип, HBsAg, вирус гепатита В, Сибирь.

G.V.Kochneva¹, V.A.Manuylov², I.G.Netesova³, E.V.Chub¹, R.B.Bayandin¹, G.F.Sivolobova¹,
A.A.Grazhdantseva¹, S.V.Netesov²

Genotypes and Subtypes of Hepatitis B Virus Isolates in the Territory of Siberia

¹State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo;

²Novosibirsk State University, ³Novosibirsk; ³ZAO "Vector-Best", Novosibirsk

Identified are the occurrence, serotypic and genotypic variations of Hepatitis B virus isolates (HBV) among the Novosibirsk region inhabitants (n=2000), native population of the Alarsk District of the Irkutsk Region (n=487) and Shuryshkarsk Township of the Yamalo-Nenets Autonomous District (n=657). Occurrence rate of hepatitis B surface antigen (HBsAg) among different groups of the Novosibirsk Region population varied within the limits of 3,6–35,0 %. It was 8,2 % in Alarsk District, and 3,2 % in Shuryshkarsk Township. HBV isolates of D genotype (92–97 %) prevail among the population of Siberia; few are the cases of A (1,7 %) and C (1,2–8 %) genotypes. The identified varying occurrence of HBV sub-genotypes and HBsAg subtypes in two aboriginal groups of Siberia (D3 sub-genotype and *ayw2* subtype – in the Alarsk District, D2 and *ayw3* – in Shuryshkarsk Township) suggests the existence of, at least, two isolated HBV virus populations, circulating among different groups of Siberia native population.

Key words: genotype, sub-genotype, subtype, HBsAg, hepatitis B virus, Siberia.

Генетическая классификация ВГВ позволяет отнести почти все известные к настоящему моменту изоляты к восьми основным филогенетическим группам, обозначаемым как генотипы А–Н [4]. Ряд генотипов подразделяют на субгенотипы [5]: генотип А – на три субгенотипа, генотипы В, С, F – на четыре субгенотипа каждый, генотип D – на пять субгенотипов. Антигенная (серологическая) классификация изолятов ВГВ основана на различиях в структуре поверхностного белка вируса – HBsAg и выделении 9 основных его субтипов: *ayw1*, *ayw2*, *ayw3*, *ayw4*, *ayr*, *adw2*, *adw4*, *adrq+*, *adrq-* [9]. При этом нескольким генотипам может соответствовать один и тот же субтип HBsAg.

Встречаемость различных генотипов ВГВ и соответствующих им субтипов варьирует в зависимости от географического региона циркуляции вируса. Генотип А (субтипы *ayw1* и *adw2*) наиболее распространен в странах Северо-Западной Европы, Северной Америки и Африки. Генотипы В (*ayw1* и *adw2*) и С (главным образом, *adr*, *adrq+/-*, *ayr* и *adw2*) преобладают в Юго-Восточной Азии и Океании. Генотип D (*ayw2*, *ayw3* и *adw2*) наиболее широко распространен

в мире и доминирует в странах Средиземноморского бассейна, на Ближнем Востоке, Индии и в России [2, 3]. Генотип Е (*ayw4*) преобладает в странах Западной Африки, F (*ayw4* и *adw4*) – Центральной и Южной Америки. Несколько изолятов генотипа G (*adw2*) обнаружено в Северной Америке и Западной Европе [12], спорадические случаи генотипа H (*adw4*) описаны для Центральной Америки и Калифорнии [4]. Распространенность субгенотипов ВГВ не имеет столь же четкой картины, однако существующие на сегодня данные свидетельствуют о том, что субгенотип A1 превалирует в Европе и Северной Америке, A2 – в Африке и Азии, B1 – в Японии, B2 и B4 – в Китае и Вьетнаме, B3 – в Индонезии и Полинезии, C1 и C2 – в Восточной Азии, C3 и C4 – в Океании, Австралии и Новой Зеландии [6].

Информация о молекулярном разнообразии штаммов ВГВ в России до сих пор остается весьма ограниченной. Работа посвящена оценке частоты встречаемости маркеров и изучению генотипического разнообразия изолятов ВГВ в нескольких группах жителей Новосибирской обл., у коренных жителей Юго-

Восточной Сибири – Аларского района Иркутской области (преимущественно бурят) и Шурышкарского района Ямало-Ненецкого автономного округа (ЯНАО), расположенного на Северо-Западе Сибири.

Материалы и методы

Образцы. Исследовали 487 образцов крови, полученных от жителей Аларского района Иркутской области в 2005 г., 657 – от представителей Шурышкарского района ЯНАО, 2000 образцов крови от 4 групп (по 500 респондентов в каждой) жителей Новосибирской области в 2000–2002 гг. В группу медработников вошли сотрудники и врачи Областного наркологического диспансера № 1 (ОНД-1); Муниципальной клинической больницы скорой медицинской помощи № 2 (БСМП-2); Новосибирской районной больницы № 1 (НРБ-1); Новосибирского областного центра по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями (центр СПИД). Во вторую группу – пациенты центра СПИД, в третью – пациенты ОНД-1. Четвертую группу образовали пациенты, обратившиеся в поликлинику НРБ-1 по поводу любого расстройства здоровья. Исследование было одобрено этическим комитетом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и проводилось с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Собранные в Новосибирской области образцы сывороток были тестированы на наличие: HBsAg, анти-HBc (IgM+IgG) и анти-HBs (IgM+IgG) с помощью диагностических тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск). Для определения субтип-значимых детерминант в HBsAg использовали набор моноклональных антител, как описано в работе [8].

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) и секвенирование. HBsAg-положительные образцы сывороток исследовали с помощью ПЦР. Выделение суммарных ДНК из 50 мкл плазмы крови проводили, как описано ранее [2]. Для амплификации участков генома ВГВ, в совокупности перекрывающих область Pre-S1/Pre-S2/S генома ВГВ, с последующим секвенированием полученных фрагментов, использовали праймеры HBV29, HBV30, HBV32, HBV130, HBV1f, HBs1, HBV378 и HBV34, как описано в [3].

Анализ последовательностей. Полученные последовательности анализировали с использованием пакета DNA STAR, США (<http://www.dnastar.com>) и выравнивали с соответствующим районом прототипных последовательностей, депонированных в базе данных GenBank. Филогенетический анализ выполняли в среде пакета PHYLIP (v. 3.53). Вычисление матрицы генетических расстояний проводили в соответствии с двухпараметрической моделью Кимуры, восстановление топологии филогенетических деревьев осуществляли при помощи метода UPGMA. Индексы статистической поддержки узлов филогенетического дерева вычисляли в тесте bootstrap с 500 репликами.

Субтип HBsAg изолята определяли, восстановив

аминокислотную последовательность данного антигена по структуре S-гена [7].

Статистическая обработка данных. Для статистической обработки данных опроса и лабораторного исследования использовали программу EpiInfo 2005. Для оценки достоверности различий численных данных, полученных для двух обследуемых групп, использовали точный критерий Фишера.

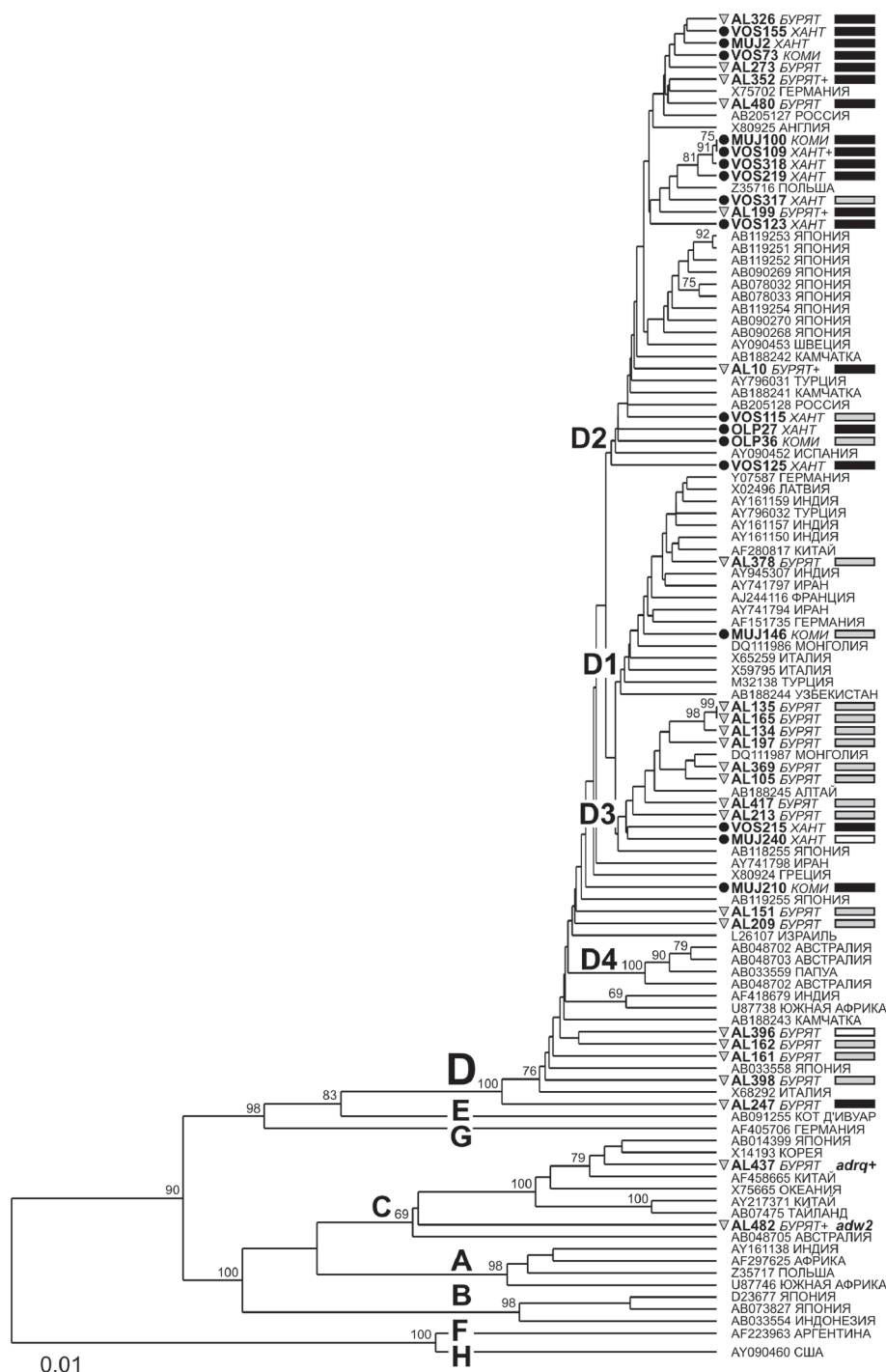
Результаты и обсуждение

Исследуемый район и популяция. Образцы, полученные от жителей Аларского района, помечены шифром «AL» с указанием порядкового номера. Национальный состав исследованной группы (487 коренных жителей): буряты – 71,1 %, метисы бурят с иными национальностями (главным образом, европеоидами) – 18,3 %, представители иных национальностей – 10,6 %. Возрастной состав группы: до 20 лет включительно – 10,2 %; 21–25 – 0,9 %; 26–30 – 10,1 %; 31–35 – 8,4 %; 36–40 – 7,8 %; 41–45 – 11,9 %; 46–50 – 12,1 %; 51–55 – 10,3 %; 56–60 – 3,7 %; старше 60 – 14,6 %. Женщины составляли 61,7 % группы. Большая часть информации о популяции Шурышкарского района ЯНАО и изолятах ВГВ, полученных от его жителей (маркированы «OLP», «MUJ» и «VOS»), приведена в предыдущей работе [3]. Следует отметить, что среди доноров этой группы представлены ханты, коми и их метисы; этническая принадлежность каждого указана на рисунке.

Встречаемость HBsAg. HBsAg был обнаружен в 40 (8,2 %) образцах, полученных от жителей Аларского района (табл. 1), что свидетельствует о принадлежности данного региона к высокоэндемичным зонам по распространенности ВГВ [7]. Встречаемость ВГВ в Аларском районе была достоверно выше встречаемости этого патогена в Шурышкарском районе и у пациентов поликлиники Новосибирской области (табл. 1).

Полученные нами данные согласуются с результатами предыдущих исследований [3, 8] – встречаемость HBsAg среди коренного населения Сибири уменьшается с юга на север. В частности, для жителей южных областей (алтайцы и казахи Республики Алтай) частота носительства HBsAg составила 13,4 и 5,2 % соответственно, в то время как среди коренного населения ЯНАО (ханты, коми, ненцы) – 1,9–3,2 %.

Выявление ДНК ВГВ и филогенетический анализ последовательностей. Присутствие ДНК ВГВ показано, в среднем, в 60 % HBsAg-положительных образцов. Для всех полученных ДНК ВГВ-положительных образцов были определены нуклеотидные последовательности длиной 1146 н., включающие S-ген ВГВ и прилегающие Pre-S1 и Pre-S2 области. На рисунке представлено филогенетическое дерево, построенное с использованием 24 последовательностей, полученных для изолятов из Аларского района, 17 последовательностей, полученных для изолятов из Шурышкарского района, а также 70 прототипных



последовательностей различных генотипов ВГВ.

Встречаемость генотипов, субгенотипов ВГВ, а также субтипов HBsAg в группах Аларского и Шурышкарского района приведена в табл. 1. В обеих исследуемых группах превалировал генотип D ВГВ, при этом внутри этого генотипа обнаружены изоляты трех субгенотипов: D1, D2 и D3. При сравнении групп между собой достоверные различия показаны во встречаемости субгенотипа D2: он был доминирующим в Шурышкарском районе (76,5 % изолятов), в Аларском же районе встречаемость этого субгенотипа составила только 25,0 %. Наиболее часто встречающимся субгенотипом в Аларском районе оказался D3 (33,3 %), изоляты субгенотипа D1 были единич-

ными в обеих группах.

Следует отметить тенденцию к филогенетической кластеризации изученных изолятов в соответствии с территориальной принадлежностью доноров. На дереве (рисунок) можно выделить два таких кластера. Первый, относящийся к субгенотипу D2, включает 14 сибирских изолятов (9 из Шурышкарского района и 5 – из Аларского) и 4 прототипных, которые были выявлены ранее в России (AB205127), Польше (Z35716), Англии (X80925) и Германии (X72702). Второй из кластеров, относящийся к субгенотипу D3, образован 8 изолятами из Аларского района, двумя – из Шурышкарского, а также изолятами AB188245 (Алтай) и DQ111987 (Монголия). Несмотря на то, что

Филогенетическое дерево сибирских изолятов ВГВ:

Шифры полученных нами изолятов выделены жирным шрифтом. Курсивом указана национальность лица-донора, знаком «+» отмечены метисы. Знак слева от шифра изолята обозначает территориальную принадлежность (● – Шурышкарский район, ▽ – Аларский район). Справа от шифра обозначен субтип HBsAg соответствующего изолята: ■■■ – ауw3, ■■■ – ауw2, □ – субтип не определен (см. в тексте). Для изолятов AL437 и AL482 приведено текстовое обозначение субтипов HBsAg. Для прототипных последовательностей указан шифр базы данных GenBank и название территории, на которой данный изолят был получен. Ветви генотипов и субгенотипов отмечены соответствующими буквами. Приведены индексы поддержки узлов, превышающие 60, а также масштаб шкалы генетических расстояний

Сравнение исследуемых групп коренного населения Сибири

Параметры	Аларский район	Шурышкарский район	Комментарий
Встречаемость HBsAg	N=487	N=657	
Число HBsAg-позитивных образцов	40 (8,2)*	21 (3,2)	Различия достоверны, $p > 0,999^{**}$
Встречаемость субгенотипов ВГВ	N=24	N=17	
D1	1 (4,2)	1 (5,9)	Различия не достоверны
D2	6 (25,0)	13 (76,5)	Различия достоверны, $p > 0,99$
D3	8 (33,3)	2 (11,8)	Различия не достоверны
Генотип D, субгенотип не определен	7 (29,2)	1 (5,9)	Различия не достоверны
Генотип C, субгенотип не определен	2 (8,3)	0	Различия не достоверны
Встречаемость субтипов HBsAg	N=24	N=17	
ayw2	14 (58,4)	4 (14,7)	Различия не достоверны
ayw3	7 (29,2)	12 (70,6)	Различия достоверны, $p > 0,95$
adw2	1 (4,2)	0	Различия не достоверны
adrq+	1 (4,2)	0	Различия не достоверны
Субтип не определен	1 (4,2)	1 (5,9)	Различия не достоверны

* Цифрой указано число позитивных образцов, в скобках – процентная доля.

** В качестве порога достоверности отличий выбрано значение вероятности $p > 0,95$.

выделение указанных кластеров не поддержано достоверными индексами теста bootstrap (более 60), что связано, вероятно, с недостаточной длиной исследуемых фрагментов, можно предполагать существование отдельных филогенетических ветвей субгенотипов D2 и D3, эндемичных для территории Евразии.

В Аларском районе также обнаружены два изолята ВГВ генотипа C, принадлежность которых к тому или иному субгенотипу определить не удалось. Значительный вклад изолятов с неопределяемым субгенотипом в Аларском районе по сравнению с Шурышкарским районом (табл. 1) может быть объяснен более длительной эволюцией возбудителя в южных регионах. Это позволяет предположить, что исторически заражение населения территории Аларского района произошло раньше, чем населения Шурышкарского района.

Субтипы HBsAg. Выявленная частота встречаемости субтипов HBsAg в обследованных группах коренного населения Сибири также различалась (табл. 1). Субтип ayw3 достоверно чаще встречался в Шурышкарском районе (70,6 %), а доля субтипа ayw2 была больше в Аларском районе. Полученные нами данные на материале из северных и юго-восточных областей Сибири хорошо согласуются с ранее выявленной встречаемостью этих же субтипов HBsAg среди тундровых ненцев, северных хантов, южных алтайцев и казахов Республики Алтай [8].

Для двух изолятов генотипа C (Аларский район) определены редкие для России субтипы HBsAg adw2 и adrq+. Кроме того, исследование выведенной аминокислотной последовательности HBsAg оказалось недостаточным для определения субтипа двух изолятов – MUJ240 и AL396 (рисунок). Ряд аминокислотных остатков HBsAg изолята MUJ240 (Ile¹¹⁰, Ser¹¹³, Ser¹¹⁴, Lys¹²², Thr¹²⁵, Thr¹²⁶, Pro¹²⁷ и Thr¹²¹) позволяет отнести его к субтипу adw2 [10], в то время как другие остатки в субтип-значимых положениях той же последовательности (Tyr¹³⁴, Thr¹⁴⁰, Ser¹⁴³, Phe¹⁵⁸,

Gly¹⁵⁹, Lys¹⁶⁰, Phe¹⁶¹, Ala¹⁶⁸, Val¹⁷⁷ и Pro¹⁷⁸) свидетельствуют о принадлежности данного изолята к субтипам ayw2 или ayw3. Последовательность HBsAg изолята AL396, за исключением позиции 127, свидетельствовала о его принадлежности к субтипу ayw2 [10]. В 127-м положении этой последовательности обнаружен остаток изолейцина, наличие которого описано для изолятов субтипа ayw4 [12].

Для изолята AL151 (рисунок) на основании данных секвенирования определен субтип ayw2, однако в положении 145 выявлен остаток глутаминовой кислоты, который является маркером «иммунологического бегства» («immune escape») ВГВ [1]. Данный феномен выражается в отсутствии заметного уменьшения концентрации HBsAg в крови инфицированного в присутствии значительного количества анти-HBs. В ИФА образец AL151 действительно показал наличие антител к HBsAg в высокой концентрации (200 мМЕ/мл).

В связи с нетипичными результатами анализа последовательностей, для изолятов MUJ240, AL396 и AL151 проведено определение субтипа с использованием моноклональных антител [8]. В результате в образце MUJ240 обнаружен HBsAg только субтипа ayw2. Образец AL396 продемонстрировал реакцию, характерную для субтипа ayw3, а в образце AL151 определен субтип ayw1. Изоляты ВГВ, подобные трем вышеописанным (составляющим 7 % от 41 исследованного), требуют повышенного внимания при изучении, так как могут давать ложноотрицательные результаты в реакции с моноклональными антителами против HBsAg, часто используемыми в диагностических тест-системах [1].

Встречаемость маркеров ВГВ в группах населения Новосибирской области. Наименьшая частота встречаемости HBsAg (табл. 2) была выявлена среди пациентов поликлиники НРБ-1 – 3,6 %, при этом HBsAg-положительными являлись 4,9 % мужчин и 3,0 % женщин (соотношение – 1,63). В группе медицинских работников частота встречаемости

Таблица 2

Встречаемость серологических маркеров
и распределение генотипов ВГВ

Параметры	Пациенты НРБ-1	Медики	Пациенты цСПИД	Пациенты ОНД-1
Серологический маркер	N=500	N=500	N=500	N=500
HBsAg	18 (3,6)*	27 (5,4)	175 (35,0)	42 (8,4)
анти-HBc	122 (24,4)	112 (22,4)	255 (51,0)	252 (50,4)
анти-HBs	119 (23,8)	162 (32,4)	104 (20,8)	163 (32,6)
Генотип	N=13	N=18	N=114	N=26
D	13 (100)	16 (88,9)	112 (98,2)	26 (100)
A	0	1 (5,6)	1 (0,9)	0
C	0	1 (5,6)	1 (0,9)	0

* Обозначения те же, что и в табл. 1.

HBsAg была выше – 5,4 %, а соотношение мужчин и женщин составило 1,78. Среди медработников – у женщин HBsAg выявлен, в основном, у медсестер и сотрудников диагностических лабораторий, а у мужчин – у хирургов, анестезиологов и медбратьев.

Частота встречаемости HBsAg в группе пациентов центра СПИД составила 35,0 % (табл. 2) с соотношением мужчины/женщины 1,13. Отметим, что более 66 % респондентов этой группы являлись молодыми людьми до 30 лет, среди которых 51,8 % признались во внутривенном употреблении наркотиков. При сравнении групп лиц, употреблявших и не употреблявших наркотики внутривенно, были выявлены статистически достоверные различия по частоте встречаемости HBsAg – 42,7 и 30,3 % соответственно ($p < 0,05$).

Среди пациентов наркологического диспансера частота встречаемости HBsAg составила 8,4 % (табл. 2). В этой группе доля потребителей инъекционных наркотиков (ПИН), составила 45,2 %, а среди лиц 30 лет и моложе – 86,4 %. Как оказалось, в данной выборке доля женщин-ПИН (61,9 %) была значительно выше доли мужчин-ПИН (41,2 %). Встречаемость HBsAg оказалась более чем в два с половиной раза выше среди ПИН (независимо от пола), чем среди потребителей алкоголя (12,4 % против 4,8 %, $p < 0,05$).

Анализ показал, что в Новосибирской области циркулируют изоляты трех генотипов ВГВ: А, С и D (табл. 2), при этом доминирующим является генотип D. Сходные распределения генотипов со значительным преобладанием генотипа D были выявлены и в других регионах России, за исключением Якутии, где генотип D хотя и был самым распространенным, но составлял менее 40 % от общего числа выявленных случаев.

Настоящая работа выполнена за счет финансирования по грантам НШ-65387.2010.4, МФТИ № 00012/00049 «Создание региональной референс-лаборатории для ПЦР-диагностики вирусных гепатитов» и по Госконтракту № 02.740.11.0767 «Выявление вирусных возбудителей заболеваний, актуальных для здравоохранения Западной Сибири (гепатиты, гастроэнтериты, серозный менингит), изучение их генетического разнообразия в целях разработки и совершенствования диагностикомов».

Авторы выражают благодарность Ю.Н.Тулугоеву и Ю.К.Булсунаеву (Иркутская область), К. Tilberg (Swedish Institute for Infectious Disease Control, Швеция), А.В.Шустову, С.А.Походне, Л.А.Акинфеевой и В. Robertson.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баженов А.И., Коноплева М. В., Фельдшерова А.А. и др. Оценка чувствительности коммерческих тест-систем для иммунодетекции HBsAg по их способности выявлять HBsAg-мутанты вируса гепатита В. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2008; 3:48–53.
2. Баяндин Р.Б., Шустов А.В., Кочнева Г.В. и др. Генотипическое разнообразие изолятов и факторы риска инфекции вирусом гепатита В у отдельных групп населения Новосибирской области. Инф. бол. 2004; 2:39–44.
3. Мануйлов В.А., Нетесова И.Г., Осипова Л.П. и др. Генетическая вариабельность изолятов вируса гепатита В у населения Шурышкарского района Ямало-Ненецкого Автономного Округа. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2005; 4:30–4.
4. Arauz-Ruiz P., Norder H., Robertson B.H., Magnius L.O. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. J. Gen. Virol. 2002; 83:2059–73.
5. Banerjee A., Datta S., Chandra P. K. et al. Distribution of hepatitis B virus genotypes: phylogenetic analysis and virological characteristics of genotype C circulating among HBV carriers in Kolkata, Eastern India. World J. Gastroenterol. 2006; 12(37):5964–71.
6. Kimbi G.C., Kramvis A., Kew M.C. Distinctive sequence characteristics of subgenotype A1 isolates of hepatitis B virus from South Africa. J. Gen. Virol. 2004; 85:1211–20.
7. Margolis H.S., Alter M.J., Hadler S.C. Hepatitis B: evolving epidemiology and implications for control. Semin. Liver. Dis. 1991; 11:84–92.
8. Netesova I.G., Swenson P.D., Osipova L.P. et al. Determination of HBsAg subtypes in Western Siberian part of Russia. J. Med. Virol. 2003; 71:183–7.
9. Norder H., Courouce A.M., Magnius L.O. Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. J. Gen. Virol. 1992; 73:3141–5.
10. Norder H., Hammas B., Losfdahl S. et al. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. J. Gen. Virol. 1992; 73:1201–8.
11. Stuyver L., De Gendt S., Van Geyt C. et al. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. J. Gen. Virol. 2000; 81:67–74.
12. Tallo T., Norder H., Tefanova V. et al. Hepatitis B virus genotype D strains from Estonia share sequence similarity with strains from Siberia and may specify ayw4. J. Med. Virol. 2004; 74:221–7.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Bazhenov A.I., Konopleva M.V., Fel'dsheroва A.A., El'gort D.A., Kats Iu.S., Lapina N.E., Godkov M.A., Suslov A.P. [Assessment of sensitivity of commercial test-systems for HBsAg immunodetection according to their ability to detect HBsAg-mutants of hepatitis B virus]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2008; 3:48–53.
 2. Bayandina R.B., Shustov A.V., Kochneva G.V. et al. [Genotypic variety of isolates and risk factors of HBV infecting among several groups of the Novosibirsk Region population]. Inf. Bol. 2004; 2:39–44.
 3. Manuylov V.A., Netesova I.G., Osipova L.P., Shustov A.V., Kochneva G.V., Netesov S.V. [Genetic variability of hepatitis B virus isolates among population of Shuryshkarsk area of Yamal-Nenets autonomous region]. Molek. Genet. Mikrobiol. Virusol. 2005; 4:30–4.
- Authors:**
Kochneva G.V., Chub E.V., Bayandina R.B., Sivolobova G.F., Grazhdantseva A.A. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia. E-mail: kochneva@vector.nsc.ru
Manuylov V.A., Netesov S.V. Novosibirsk State University. Novosibirsk, Russia
Netesova I.G. ZAO "Vector-Best". Novosibirsk, Russia.

- Об авторах:**
Кочнева Г.В., Чуб Е.В., Баяндин Р.Б., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл., п. Колцово. E-mail: kochneva@vector.nsc.ru
Мануйлов В.А., Нетесов С.В. Новосибирский государственный университет. Новосибирск.
Нетесова И.Г. ЗАО «Вектор-Бест». Новосибирск.

Поступила 11.02.11.

А.А.Лапин, Т.Б.Кравченко, А.Н.Мокриевич, Г.М.Вахрамеева, Т.И.Комбарова, И.А.Дятлов,
В.М.Павлов

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УФ-ОБЛУЧЕНИЯ И ВОЗДЕЙСТВИЯ НАЛИДИКСОВОЙ КИСЛОТЫ НА ИНДУКЦИЮ RECА-БЕЛКА В КЛЕТКАХ *FRANCISELLA TULARENSIS* 15/10

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk

Изучено влияние УФ-облучения и налидиксовой кислоты на синтез RecA-белка *F. tularensis* 15/10. Получена специфическая мышиная сыворотка к рекомбинантному RecA-белку. По данным иммуноблоттинга со специфической сывороткой, в клетках *F. tularensis* 15/10 после воздействия повреждающих агентов количество RecA-белка не увеличивается.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, ген *recA*, RecA-белок, индукция, гомологичная рекомбинация.

A.A.Lapin, T.B.Kravchenko, A.N.Mokrievich, G.M.Vakhrameeva, T.I.Kombarova, I.A.Dyatlov, V.M.Pavlov

Study of the UV Irradiation and Nalidixic Acid Effect on the RecA-protein Induction in *Francisella tularensis* 15/10 Cells

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

Studied is the UV irradiation and nalidixic acid effect on the RecA-protein synthesis in *Francisella tularensis* 15/10 cells. Obtained is the specific murine serum to the recombinant RecA-protein. The results of immunoblotting with this specific serum demonstrate that the amount of RecA-protein in *Francisella tularensis* 15/10 cells is not increased after the exposure to these damaging factors.

Key words: *Francisella tularensis*, *recA*-gene, RecA-protein, induction, homologous recombination.

Ключевым ферментом, участвующим в процессе гомологичной рекомбинации и репарации ДНК, является белок RecA – продукт гена *recA* – мультифункциональный фермент, обладающий целым рядом свойств, среди которых ДНК- и АТФ-связывание, АТФ-азная и копротеазная активности [4]. Анализ генома *F. tularensis* LVS из базы данных NCBI (AM233362) позволил обнаружить ген, сходный с геном *recA E. coli*. Молекула RecA-подобного белка *F. tularensis* LVS – продукта *recA*-подобного гена – содержит 359 аминокислот в отличие от молекулы RecA *E. coli* (353 аминокислоты). Воздействие УФ-облучения способствует возникновению разрывов в молекуле ДНК и образованию тиминовых димеров, а воздействие налидиксовой кислоты подавляет репликацию ДНК путем прекращения ее полимеризации [4].

Целью настоящей работы является изучение влияния ультрафиолетового облучения и антибиотика налидиксовой кислоты на индукцию белка RecA в вакцинном штамме *F. tularensis* 15/10.

Материалы и методы

Использованные в работе штаммы и плазмиды представлены в таблице.

Штаммы *E. coli* культивировали при температуре 37 °С на жидкой и плотной питательной среде Лурье-Бертани LB и LA [7] с добавлением ампициллина (Ap) до концентрации 100 мкг/мл или без него. Штаммы *F. tularensis* культивировали при температуре 37 °С на плотной среде FT-агар (ФГУН ГНЦ ПМБ) и жидкой питательной среде (FTB) [1]

с добавлением полимиксина (Pm) до концентрации 100 мкг/мл. Штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ культивировали при температуре 28 °С на плотной питательной среде Хоттингера, pH 7,2 (ФГУН ГНЦ ПМБ). Приготовление компетентных клеток и трансформацию клеток *E. coli* BL21(DE3) проводили по руководству [2].

Культуры клеток *F. tularensis* 15/10 и *E. coli* для индукции RecA белка под действием налидиксовой кислоты растили в жидкой питательной среде до ОП₅₉₅ 1 ед. затем вносили налидиксовую кислоту (Nal) до конечной концентрации 40 мкг/мл и культивировали в течение 90 мин при температуре 37 °С [11].

Для индукции RecA белка под действием ультрафиолетового облучения ночную агаровую культуру *F. tularensis* 15/10 суспендировали в забуференном физиологическом растворе (ЗФР) до ОП₅₉₅ 0,2 ед. Полученную суспензию обрабатывали в чашке Петри на УФ-излучателе («Cole Parmer», США) при длине волны 254 нм и постоянном перемешивании. Облучение проводили в течение 10 и 80 с. После обработки отобранную на каждой временной точке суспензию клеток центрифугировали при 12000 об./мин и отмывали в ЗФР. Осадки бактериальных клеток переносили в свежую жидкую питательную среду и культивировали при 37 °С в течении 4 ч без перемешивания.

Стандартные генно-инженерные манипуляции проводили, как описано [2] и согласно инструкции производителей. Ферменты для рестрикции и лигирования были приобретены в фирме «Fermentas» (Литва). Праймеры были синтезированы компанией ЗАО «Синтол». Расчет праймеров проводили с ис-

Штаммы и плазмиды

Название	Характеристика	Источник
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B - m _B -) <i>gal</i> λ (DE3)	Stratagen, США
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ	Вакцинный штамм	Государственная коллекция микроорганизмов «ГКПМ»
<i>F. tularensis</i> 15/10	Pm ^r , вакцинный штамм	Государственная коллекция микроорганизмов «ГКПМ»
<i>F. tularensis</i> 15/10Δ <i>recA</i>	Pm ^r , вакцинный штамм с инактивированным геном <i>recA</i>	Государственная коллекция микроорганизмов «ГКПМ»
pET23(b)+	Ap ^r , T7•Tag, His•Tag	Novagen, США
pET23(b)+/RecA-(His) ₆	Ap ^r , T7•Tag, His•Tag ген <i>recA</i> <i>F. tularensis</i> 15/10	Данная работа
<i>E. coli</i> BL21 pET23(b)+/RecA-(His) ₆	F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B - m _B -) <i>gal</i> λ (DE3) Ap ^r , T7•Tag, His•Tag ген <i>recA</i> <i>F. tularensis</i> 15/10	Данная работа

пользованием нуклеотидной последовательности генома *F. tularensis* LVS (AM233362) из банка генов NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) и пакета компьютерных программ Vector NTI, 10.0 (США). Сиквенс ДНК проводили на секвенаторе ALF express II (Amersham Pharmacia Biotech, США).

ПЦР проводили на термоциклере Gene Ap PCR System 2700 (Applied Biosystems, США) с помощью высокоточной полимеразы («Fermentas», Литва) с праймерами Nde-*recA*F1 (CCCCCATATGAGTAAAGAAAAGGCGCTAGAATCAG) и R1*RecA*orf(XhoI) (AACTCGAGGATAAGCTCATCTTGAGTAACTGCTGG). Продукты реакции разделяли электрофорезом в 0,7 % агарозном геле с использованием 0,04 М Трис-ацетатного буфера с добавлением ЭДТА до 0,002 М (pH 8,0).

Экспрессию рекомбинантного RecA белка проводили согласно инструкции производителя вектора pET23b(+). Синтез клонированного белка индуцировали добавлением в культуральную среду изопропил-β-D-галактопиранозид (ИПТГ) (Amersham Pharmacia Biotech Inc., США) до конечной концентрации 1 мМ с последующим культивированием в течение 2,5 ч. Уровень индукции контролировали с помощью электрофореза в 12,5 % полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях по методу Лэммли [5].

Очистку рекомбинантного белка из цитоплазматической фракции штамма-продуцента *E. coli* BL21 pET23(b)+/RecA-(His)₆ проводили металл-хелатирующей хроматографией в неденатурирующих условиях на носителе Ni²⁺NTAHisBind® Superflow™ (Pharmacia Biotech, Швеция). Полученные фракции анализировали электрофорезом в 12,5 % ПААГ, объединяли, диализовали против 20 мМ Трис-HCl-буфера (pH 8,0) в присутствии 5 мМ ДТТ при комнатной температуре и хранили при температуре 14 °С.

Молекулярную массу белков определяли по сканированному изображению электрофореграммы с помощью программы PhotoCaptMW с использованием набора стандартных маркеров молекулярной массы для электрофореза («Fermentas», Латвия). Количество белка оценивали по методу Лоури с использованием бычьего сывороточного альбумина в качестве стандарта [6]. Вестерн-блоттинг проводили по методу [10]. Иммуноферментный анализ (ИФА) проводили согласно руководству [8].

Мышинные антисыворотки к рекомбинантному белку RecA были получены трехкратной подкожной иммунизацией белых нелинейных мышей 20 мкг белка RecA-(His)₆ с интервалом в 21 день.

Результаты и обсуждение

Ампликон с геном *recA* получали с использованием праймеров Nde-*recA*F1 и R1*RecA*orf(XhoI) и ДНК *F. tularensis* 15/10 в качестве матрицы. Ампликон размером 1077 п.о. обрабатывали рестриктазами NdeI и XhoI и встраивали в линейаризованную векторную плазмиду pET23(b+). Полученную рекомбинантную плазмиду pET23(b)+/RecA-(His)₆ переносили в клетки штамма *E. coli* BL21 методом кальциевой трансформации. Отбор трансформированных клеток *E. coli* BL21, несущих плазмиду (pET23(b)+/RecA-(His)₆), проводили по признаку устойчивости к ампициллину и наличию фрагмента хромосомной ДНК *F. tularensis* 15/10 с копией гена *recA* с помощью ПЦР, используя праймеры Nde-*recA*F1 и R1*RecA*orf(XhoI).

Клонированный ген *recA* секвенировали для проверки ошибок в открытой рамке считывания, возникающих в процессе ПЦР-амплификации и клонирования в вектор, биоинформационный анализ транслированной рамки считывания секвенированного гена *recA* *F. tularensis* 15/10 не выявил изменений по отношению к гену *recA* *F. tularensis* LVS (AM233362). Молекулярная масса рекомбинантного RecA белка, рассчитанная с использованием пакета программ Vector NTI 10.0, составляла 39801,94 Да.

Анализ уровня синтеза рекомбинантного белка RecA-(His)₆ в полученных клонах *E. coli* BL21(pET23(b)+/RecA-(His)₆ после индукции ИПТГ показал наличие основной белковой полосы с кажущейся молекулярной массой около 42 кДа (рис. 1 А, показано стрелками).

Клон *E. coli* BL21(pET23(b)+/RecA-(His)₆ после секвенирования гена *recA* использовали для получения белка RecA-(His)₆. Выделенный и очищенный металл-хелатирующей хроматографией в неденатурирующих условиях гомогенный препарат белка с кажущейся молекулярной массой (42,9±1,9) кДа и чистотой около 80 % (рис. 1, Б) использовали для получения специфической антисыворотки. Средний

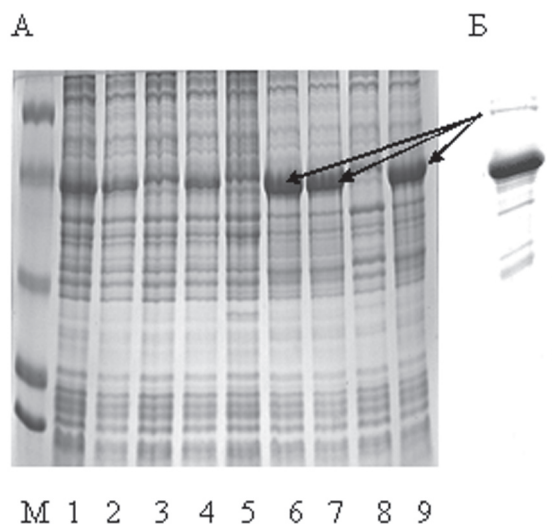


Рис. 1. Электрофореграмма клеточных лизатов *E. coli* BL21(pET23(b)+RecA-(His)₆) до и после внесения ИПТГ для индукции синтеза рекомбинантного белка RecA-(His)₆:

А. М – набор стандартных белков «Fermentas» (66, 45, 24, 18,4 и 14,4 кДа); 1–4 – *E. coli* BL21(pET23(b)+RecA-(His)₆) до индукции; 5 – *E. coli* BL21; 6–9 – *E. coli* BL21(pET23(b)+RecA-(His)₆) после индукции. Б. Очищенный рекомбинантный белок RecA-(His)₆.

титр антител к рекомбинантному белку RecA-(His)₆ составлял 1:3016.

Способность антисыворотки к рекомбинантному белку RecA-(His)₆ специфически связываться с нативным белком RecA оценивали иммуноблоттингом с использованием клеточных лизатов родительского и мутантного штаммов *F. tularensis* 15/10 и *F. tularensis* 15/10Δ*recA*, а также *E. coli* и *Y. pestis*. Иммуноблоттинг показал (рис. 2), что полученная нами антисыворотка к рекомбинантному белку RecA-(His)₆ выявляет по одной основной полосе в препаратах рекомбинантного белка RecA-(His)₆ (молекулярная масса ~ 44 кДа) и в лизате клеток исходного штамма *F. tularensis* 15/10 (молекулярная масса), свидетельствуя о специфичном распознавании соответствующих эпитопов в молекуле нативного туляреминого белка RecA. Следует отметить некоторое расхождение между рассчитанной (38831,12 Да) и кажущейся (~ 43 кДа) молекулярными массами нативного белка RecA.

Кроме того, отсутствие видимых полос в треке штамма *F. tularensis* 15/10Δ*recA* с удаленным геном *recA* подтверждает неспособность бактериальных клеток к синтезу белка RecA, обусловленное делецией гена *recA*. Обращает на себя внимание наличие полос молекулярной массы ~ 38 кДа в лизатах клеток *E. coli* и *Y. pestis* (рис. 2, линии 1 и 4), что может свидетельствовать о том, что в молекулах RecA белков *E. coli* и *Y. pestis* присутствуют общие с белком RecA туляреминого микроба эпитопы, поскольку рассчитанные молекулярные массы RecA белков *E. coli* и *Y. pestis* составляют 37971,18 и 37854,10 Да соответственно.

Влияние УФ-облучения на индукцию синте-

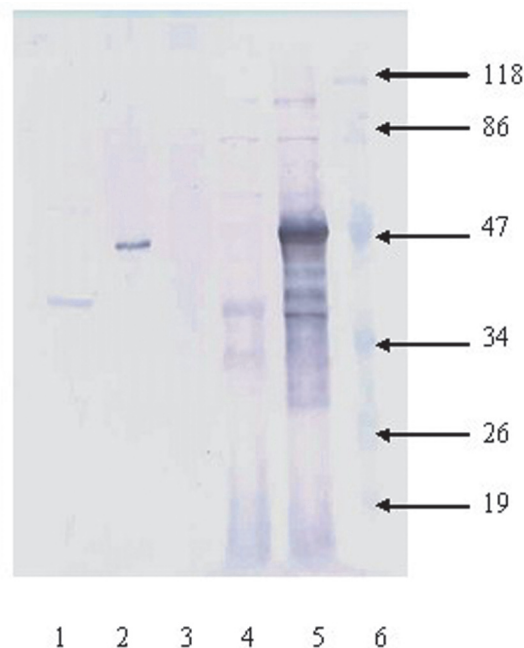


Рис. 2. Специфичность антисыворотки к рекомбинантному белку RecA-(His)₆ (10 % Ds-Na-ПААГ):

1 – *Y. pestis* EV; 2 – *F. tularensis* 15/10; 3 – *F. tularensis* 15/10Δ*recA*; 4 – *E. coli* BL21; 5 – рекомбинантный белок RecA-(His)₆; 6 – окрашенные маркеры «Fermentas» (118, 86, 47, 34, 26 и 19 кДа)

за RecA белка в клетках *F. tularensis* 15/10 изучали воздействием ультрафиолетового облучения при двух вариантах экспозиции – 10 и 80 с. По результатам высевок выживаемость клеток после облучения в течение 10 с составила 90 %, а при экспозиции 80 с – всего 10 %. Уровень индукции синтеза белка RecA в пробах, отобранных в различные временные интервалы в диапазоне 0–4 ч после облучения, был оценен с помощью иммуноблоттинга с полученной поликлональной мышинной антисывороткой к рекомбинантному RecA белку. На рис. 3 (А) приведен иммуноблоттинг проб, полученных при экспозиции 80 с. Визуальная оценка интенсивности окраски соответствующих треков для проб, отобранных в разные временные интервалы после воздействия УФ-облучения, не позволяет выявить в них явных отличий, что может свидетельствовать об отсутствии детектируемого уровня индукции белка RecA.

Уровень синтеза белка RecA при воздействии Nal в течение 90 мин оценивали с помощью иммуноблоттинга с той же мышинной антисывороткой (рис. 3, Б). Анализ данных позволяет считать, что в клетках *F. tularensis* синтез белка RecA не индуцируется. Интенсивность окраски соответствующей белковой полосы до обработки (рис. 3, Б, линия 3) не отличается от таковой после воздействия Nal (рис. 3, Б, линия 4).

Результаты, полученные с помощью иммуноблоттинга, свидетельствуют о том, что синтез белка RecA в клетках *F. tularensis*, по-видимому, является конститутивным и не индуцируется под воздействи-

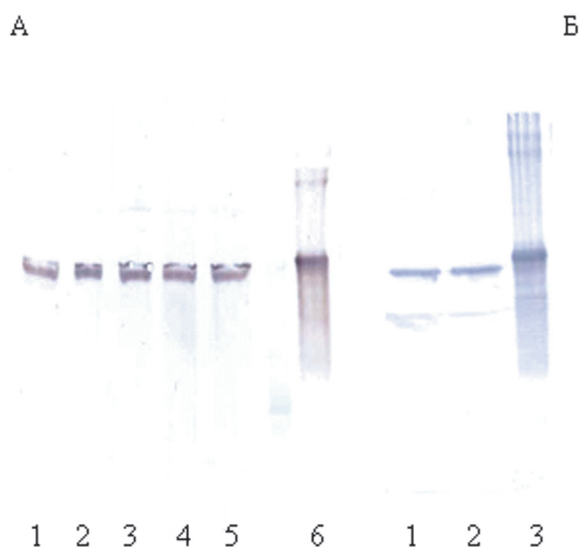


Рис. 3. Индукция белка RecA под действием УФ-облучения (А) и налидиксовой кислоты (Б) (10 % Ds-Na-ПААГ):

А. Клетки *F. tularensis* 15/10: линия 1 – 0 с, 2 – 30 мин, 3 – 1 ч, 4 – 2 ч, 5 – 4 ч; 6 – белок RecA-(His)₆. Б. 1 и 2 – клетки *F. tularensis* 15/10 до и после воздействия налидиксовой кислоты; 3 – белок RecA-(His)₆

ем УФ-облучения и налидиксовой кислоты,

Как известно, белок RecA является центральным компонентом системы SOS индукции, способствующей восстановлению поврежденной ДНК бактериальной клетки, не только из-за непосредственного участия в процессе репарации ДНК, но и в экспрессии других генов, функции которых направлены на сохранение жизнеспособности бактерий после любого повреждающего воздействия. Показано, что при повреждении ДНК микобактерий индукция экспрессии гена белка RecA проходила с разной скоростью и была значительно замедлена у *Mycobacterium tuberculosis* по сравнению с *M. smegmatis*. Авторы считают, что замедление индукции может быть обусловлено вовлечением других факторов, и такой механизм обуславливает адаптационное преимущество патогенному микроорганизму в обеспечении более длительной защиты от агрессивного противодействия иммунной системы макроорганизма [9]. Возможно, что подобный механизм, являющийся объектом нашего дальнейшего исследования, лежит и в основе выявленного нами отсутствия индукции белка RecA

в клетках *F. tularensis*. Кроме того, представляет интерес и изучение причин расхождения рассчитанной и кажущейся молекулярных масс нативного белка RecA, которое может быть обусловлено его посттрансляционной модификацией [3].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лапин А.А., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Домотенко Л.В., Храмов М.В. Простая жидкая питательная среда для молекулярно-генетических исследований *Francisella tularensis*. Пробл. особо опасных инф. 2009; 4(102):66–7.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Изд-во Мир; 1984. 480 с.
3. Fischer W., Haas R. The RecA protein of *Helicobacter pylori* requires a posttranslational modification for full activity. J. Bacteriol. 2004; 186(3):777–84
4. Kowalczykowski S.C., Dixon D.A., Eggleston A.K., Lauder S.D., Rehrauer W.M. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 1994; 58(3):401–65
5. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature(London). 1970; 227:680–685
6. Lowry O.H., Rosenbrough N.R., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the folin phenol. J. Biol. Chem. 1951; 193:115–9.
7. Miller J.H. Experiments in Molecular Genetics. N.Y.: Gold Harbor Laboratory; 1972.
8. Ngo T.T., Lenhoff H.M., editor. Enzyme-mediated immunoassay. New York, London: Plenum Press; 1988. 444 p.
9. Papavinasasundaram K.G., Anderson C., Brooks P.C., Thomas N.A., Movahedzadeh F., Jenner P.J. et al. Slow induction of RecA by DNA damage in *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiology. 2001; 47:3271–9.
10. Towbin H., Staenelin T., Gordon J. Electroforetic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979; 76(9):4350–4.
11. Weinstock G.M., McEntee K.M., Lehman I.R. ATP-dependent renaturation of DNA catalyzed by the recA protein of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979; 76(1):126–30.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Lapin A.A., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Domotenko L.V., Khramov M.V. [Simple liquid nutrient medium for molecular-genetic investigations of *Francisella tularensis*]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2009; 4(102):66–7.
2. Maniatis T., Fritch E., Sambrook G., [Methods of Genetic Engineering. Molecular Cloning]. Moscow: Izd. "Mir"; 1984. 480 p.

Authors:

Lapin A.A., Kravchenko T.B., Mokrievich A.N., Vakhrameeva G.M., Kombarova T.I., Dyatlov I.A., Pavlov V.M. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

Об авторах:

Лапин А.А., Кравченко Т.Б., Мокриевич А.Н., Вахрамеева Г.М., Комбарова Т.И., Дятлов И.А., Павлов В.М. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Оболensk, Московская обл. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 13.05.11.

А.А.Сергеев, О.В.Пьянков, О.К.Демина, О.Г.Пьянкова, Е.И.Рябчикова, А.П.Агафонов, А.Н.Сергеев

ИНФЕКЦИОННЫЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ А/Н5N1 В ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА МЫШАХ*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово*

Исследованные штаммы вируса гриппа птиц А/Н5N1 (ВГП), выделенные на территории России и стран СНГ, по вирулентности для мышей при интраназальном и аэрозольном заражении могут быть разделены на 3 группы: высоковирулентные [50 % аэрогенная летальная доза (АЛД₅₀) – <3,0 lg 50 % эмбриональных инфицирующих доз (ЭИД₅₀)] – А/Chicken/Kurgan/05/2005, А/Chicken/Crimea/04/2005, А/Chicken/Omsk/06, А/Chicken/Krasnodar/02/06, А/Chicken/Dagestan/06; средней степени вирулентности [ЛД₅₀ (АЛД₅₀) – 3,0–4,5 lg ЭИД₅₀] – А/Duck/Kurgan/08/2005; авирулентные [ЛД₅₀ (АЛД₅₀) – >4,5 lg ЭИД₅₀] – А/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005 и А/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005. Отмечена высокая степень корреляции ($r = 0,89$) между показателями вирулентности штаммов, полученными при интраназальном и аэрозольном инфицировании мышей. Первичными клетками-мишенями у мышей, респираторно инфицированных ВГП, являются реснитчатые клетки воздухоносных путей и пневмоциты 1 и 2-го порядка.

Ключевые слова: вирус гриппа птиц А/Н5N1, мышь, интраназальное заражение, аэрозольное инфицирование, 50 % летальная доза, респираторный тракт, клетка-мишень вируса.

А.А.Sergeev, O.V.P'yankov, O.K.Demina, O.G.P'yankova, E.I.Ryabchikova, A.P.Agafonov, A.N.Sergeev

Infectious Properties of Avian Influenza A/H5N1 Virus Strains Studied by means of Experiments on Mice*State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo*

The studied strains of avian influenza virus A/H5N1 (AIV), isolated in the territory of the Russian Federation and CIS countries, can be classified into three groups according to their virulence for mice after intranasal and aerosol challenging: highly virulent strains [50 % aerosol lethal dose (ALD₅₀) – <3,0 lg 50 % embryonic infection doses (EID₅₀)] – A/Chicken/Kurgan/05/2005, A/Chicken/Crimea/04/2005, A/Chicken/Omsk/06, A/Chicken/Krasnodar/02/06, A/Chicken/Dagestan/06; strains with mid-level virulence [LD₅₀ (ALD₅₀) – 3,0–4,5 lg EID₅₀] – A/Duck/Kurgan/08/2005; and non-virulent strains [LD₅₀ (ALD₅₀) – >4,5 lg EID₅₀] – A/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005 and A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005. Registered is the high degree of correlation ($r = 0,89$) between the indexes of virulence of the strains, obtained by means of intranasal and aerosol challenging of mice. The primary target-cells in mice, respiratory-infected by AIV, are the respiratory tract ciliated cells and pneumonocytes of I, II types.

Key words: Avian Influenza Virus A/H5N1, mouse, intranasal challenging, aerosol challenging, 50 % lethal dose, respiratory tract, target-cell for virus.

К июню 2011 г. общее количество подтвержденных случаев заболевания человека, вызванного вирусом гриппа птиц (ВГП) А/Н5N1, составляло 556, при этом примерно 60 % заболевших погибли [13]. По данным Всемирной организации охраны здоровья животных, птичий грипп Н5N1 стал эндемическим в некоторых странах, например, Китай, Индонезия, Вьетнам и Египет [13].

Для разработки новых высокоэффективных противогриппозных лечебно-профилактических препаратов и диагностических тест-систем необходимо иметь информацию о степени чувствительности к различным штаммам ВГП А/Н5N1 мышей, которые широко используются в качестве модельных животных при разработке препаратов и тест-систем [4, 8, 9].

В связи с этим целью работы являлось изучение на мышах инфекционных свойств различных штаммов вируса гриппа птиц А/Н5N1, выделенных на территории России и стран СНГ.

Материалы и методы

Вирус. В работе использовали восемь высокопатогенных штаммов ВГП подтипа Н5N1, выделенных в России и странах СНГ, которые были получены из Государственной коллекции возбудителей

вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора: А/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005; А/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005; А/Chicken/Kurgan/05/2005(Н5N1); А/Duck/Kurgan/08/2005(Н5N1); А/Chicken/Crimea/04/2005(Н5N1); А/Chicken/Omsk/06(Н5N1); А/Chicken/Krasnodar/02/06(Н5N1); А/Chicken/Dagestan/06(Н5N1). Все штаммы на 2–3-м пассажах (от источника выделения) при культивировании на куриных эмбрионах (КЭ) были наработаны до концентрации 7,5–8,5 lg 50 % эмбриональных инфицирующих доз в 1 мл (ЭИД₅₀/мл) и хранились до использования в экспериментах в низкотемпературной морозильной камере при минус 70 °С.

Животные. В исследованиях использовали интактных беспородных разнополых белых мышей ICR массой 14–16 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях [3]. Наблюдение за инфицированными мышами осуществляли в течение 16 сут с момента заражения.

Методы инфицирования мышей. Интраназальное заражение мышей проводили традиционным методом с применением седативных средств с после-

дующим определением 50 % летальной дозы (LD_{50}) вируса для этих животных [1].

Эксперименты по аэрозольному инфицированию мышей проводили аналогично методике, описанной ранее [5]. Минутный объем дыхания мышей, зависящий от их веса, рассчитывали по формуле Гайтона [7]. Зная концентрацию вирусного аэрозоля в камере (по результатам титрования вируса в пробах из аэрозольных пробоотборников), минутный объем дыхания животных и время инфицирования (экспозиции), определяли для мышей дозы заражения ВГП. С учетом результатов наблюдения за гибелью животных получали зависимость доза-эффект (по гибели мышей) и определяли 50 % летальную дозу при аэрозольном способе заражения (ALD_{50}) мышей для различных штаммов ВГП.

Специфичность гибели животных. Факт гибели мышей вследствие гриппозной инфекции подтверждали при определении наличия вируса гриппа в гомогенатах их легких.

Вирусологический анализ проб. Определение концентрации и наличия жизнеспособного вируса в образцах тканей животных и аэрозольных пробах проводили традиционным методом путем введения вирусосодержащей жидкости в аллантоисную полость 9-суточных КЭ кросса Хайсекс Браун генетической линии Род-айленд с последующей регистрацией наличия вируса в реакции гемагглютинации [2].

Электронно-микроскопические исследования. Образцы легких отбирали через 5 сут после интраназального заражения одним из штаммов ВГП (A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005; A/Chicken/Kurgan/05/2005; A/Duck/Kurgan/08/2005) в дозе 10 LD_{50} . При этом по 3 животных умерщвляли методом цервикальной дислокации. После вскрытия животных иссекали трахею и легкие, фиксировали 4 % параформальдегидом при 4 °C в течение 48 ч. Обработку образцов проводили, как описано ранее [4]. Срезы готовили на микротоме Райхерт-Янг (Австрия) и исследовали в электронном микроскопе JEM 1400 (Jeol, Япония), фотосъемку проводили с помощью цифровых камер Jeol и Veleta (SIS, Германия).

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку и сравнение результатов осуществляли стандартными методами [1]. При этом

определение 50 % доз вируса проводили при использовании метода Спирмена – Кербера.

Результаты и обсуждение

Важными параметрами, используемыми при разработке новых лечебно-профилактических препаратов и тест-систем, являются параметры, характеризующие чувствительность хозяев к вирусу. В связи с этим были проведены сравнительные исследования чувствительности мышей к различным штаммам ВГП при интраназальном и аэрозольном заражении, результаты которых представлены в таблице. Через 5–10 сут после заражения у животных регистрировали ряд клинических признаков заболевания (взъерошенность, сниженная двигательная активность, конъюнктивит) и летальный эффект. Проведенный корреляционный анализ взаимосвязи между показателями LD_{50} и ALD_{50} , полученными при разных способах заражения животных, свидетельствует о высокой степени корреляции между этими данными (коэффициент корреляции $r = 0,89$). Кроме того, наблюдали существенные различия по вирулентности штаммов ВГП для респираторно зараженных мышей. По данному показателю исследуемые штаммы были разделены на 3 группы: высоковирулентные (LD_{50} и $ALD_{50} < 3,0 \lg \text{ЭИД}_{50}$) – A/Chicken/Kurgan/05/2005, A/Chicken/Crimea/04/2005, A/Chicken/Omsk/06, A/Chicken/Krasnodar/02/06, A/Chicken/Dagestan/06; средней степени вирулентности (LD_{50} и $ALD_{50} = 3,0\text{--}4,5 \lg \text{ЭИД}_{50}$) – A/Duck/Kurgan/08/2005; авирулентные (LD_{50} и $ALD_{50} > 4,5 \lg \text{ЭИД}_{50}$) – A/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005 и A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005.

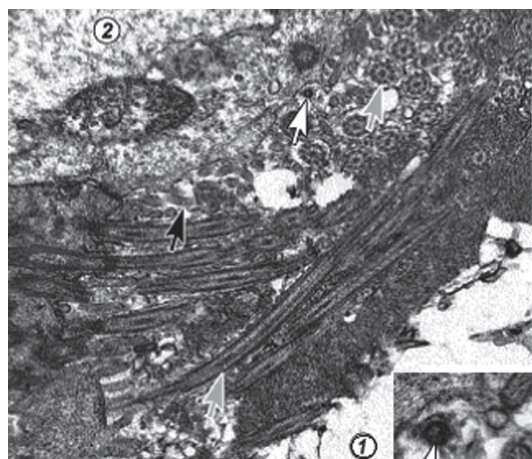
В наших предварительных исследованиях по изучению динамики накопления ВГП в организме респираторно зараженных мышей был зарегистрирован первичный очаг размножения патогена в дыхательном тракте (слизистая полости носа, легкие). При этом максимальное накопление вируса наблюдалось в легких через 5 сут после инфицирования этих животных – $(5,6 \pm 0,6) \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{г}$. Учитывая это обстоятельство, электронно-микроскопическому изучению в этот период подвергали легкие мышей, интраназально инфицированных одним из штаммов ВГП (A/Chicken/Kurgan/05/2005, A/Duck/Kurgan/08/2005 и A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005) в дозе 10 LD_{50} . При этом была выявлена репродукция ВГ в реснитчатых клетках бронхиального эпителия (рисунок). Ядра зараженных клеток имели характерную для репродукции вируса гриппа морфологию [4]. Почкование вируса происходило на апикальной мембране клеток, вирионы локализовались между ресничками и микроворсинками. Кроме этого, репродукция ВГ была зарегистрирована в альвеолоцитах 1 и 2-го порядка.

Известно, что различные штаммы ВГП A/H5N1, выделенные как от птиц, так и от людей, при экспериментальном инфицировании мышей без предварительной адаптации вызывают либо заболевание, либо инфекционный процесс, носящий бессимптомный характер [6, 8, 10]. Нами также было отмечено, что чувствительность мышей (показатели LD_{50} и ALD_{50}) к ис-

Вирулентность штаммов вируса гриппа птиц (ВГП) A/H5N1 для мышей при интраназальном и аэрозольном заражении с определением LD_{50} и ALD_{50} соответственно

Штамм ВГП (H5N1)	Показатели вирулентности ВГП для мышей:	
	$LD_{50} (\lg \text{ЭИД}_{50})$ $M \pm I_{95}^*$	$ALD_{50} (\lg \text{ЭИД}_{50})$ $M \pm I_{95}^*$
A/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005	>6,5	>5,0
A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005	>6,5	4,9±0,5
A/Duck/Kurgan/08/2005(H5N1)	4,2±0,4	3,8±0,6
A/Chicken/Kurgan/05/2005(H5N1)	1,2±0,3	2,2±0,0
A/Chicken/Crimea/04/2005(H5N1)	1,3±0,3	-0,7±0,0
A/Chicken/Omsk/06(H5N1)	2,2±0,3	3,2±0,2
A/Chicken/Krasnodar/02/06(H5N1)	1,7±0,3	1,3±0,9
A/Chicken/Dagestan/06(H5N1)	2,7±0,5	1,8±0,7

*Средняя величина (M) и доверительный интервал (I_{95}) с уровнем надежности 95 %.



Зараженная вирусом гриппа H5N1 (штамм A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005) реснитчатая клетка эпителия бронха мыши через 1 сут после инфицирования:
1 – просвет бронха; 2 – цитоплазма реснитчатой клетки;
3 – базальные тельца ресничек. Белыми стрелками показаны вирусные частицы, черными – микроворсинки, серыми – реснички

пользованным в работе штаммам ВГП А/Н5N1 при респираторном заражении также существенно различалась. В то же время все штаммы проявляли одинаково высокую вирулентность для кур при внутривенном введении (внутривенный индекс патогенности, IVPI – от 2,7 до 3,0) и интраназальном заражении (ЛД₅₀ – от 0,3 до 1,2 lg ЭИД₅₀). Полученные нами результаты могут быть использованы для анализа взаимосвязи генетической структуры ВГП и его патогенных свойств. Зарегистрированный коэффициент высокой степени корреляции между показателями вирулентности штаммов, полученными при интраназальном и аэрозольном инфицировании мышей, и близкие их значения свидетельствуют, вероятно, о существенном сходстве механизмов течения инфекционного процесса у этих животных при данных способах заражения, несмотря на то, что эти способы инфицирования отличаются по месту преимущественной первичной локализации в респираторном тракте мышей вводимого вирусного материала [при интраназальном заражении – в основном слизистая носовой полости, а при аэрозольном (для используемого нами полидисперсного аэрозоля с медианно-массовым аэродинамическим диаметром частиц 1 мкм) – в равной степени легкие и верхние отделы респираторного тракта]. Отчетливый тропизм вируса гриппа H5N1 к легким отмечается во многих опубликованных работах, посвященных этому патогену [9, 12, 13]. Проведенное нами электронно-микроскопическое изучение легких мышей, инфицированных штаммами ВГП, выделенными в России и странах СНГ, позволило выявить размножение вируса в реснитчатых клетках респираторного тракта мышей (так же, как и у человека) [11, 14]. Анализируя всю вышеприведенную информацию, высоковирулентные для мышей штаммы ВГП могут быть использованы в экспериментах на мышах для оценки эффективности разрабатываемых противогриппозных лечебно-профилактических препаратов и работоспособности создаваемых тест-систем.

Таким образом, все исследованные штаммы ВГП по вирулентности для мышей при интраназальном

и аэрозольном заражении могут быть разделены на 3 группы: высоковирулентные (ЛД₅₀ и АД₅₀ – <3,0 lg ЭИД₅₀) – A/Chicken/Kurgan/05/2005, A/Chicken/Crimea/04/2005, A/Chicken/Omsk/06, A/Chicken/Krasnodar/02/06, A/Chicken/Dagestan/06; средней степени вирулентности (ЛД₅₀ и АД₅₀ – 3,0–4,5 lg ЭИД₅₀) – A/Duck/Kurgan/08/2005; авирулентные (ЛД₅₀ и АД₅₀ – >4,5 lg ЭИД₅₀) – A/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005 и A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005. Выявленными первичными клетками-мишенями у мышей, респираторно инфицированных ВГП, являются реснитчатые клетки воздухоносных путей, пневмоциты 1 и 2-го порядка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Закс Л. Статистическое оценивание. М.: Статистика; 1976. 598 с.
2. Мейхи Б., редактор. Вирусология. Методы. М.: Мир; 1988. 344 с.
3. Национальный научно-исследовательский совет. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Вашингтон: Национальная Академия; 1996.
4. Онищенко Г.Г., Рябчикова Е.И., Сергеев А.Н., Дроздов И.Г. Вирус гриппа H5N1: атлас репродукции и патологических изменений внутренних органов мышей. Новосибирск: «Арта»; 2008. 208 с.
5. Сергеев А.Н., Жуков В.А., Порываев В.Д. и др. Разработка простого метода прямой оценки наличия инфекционного процесса у мышей и крыс, аэрогенно инфицированных вирусом гриппа. Вopr. вирусол. 2002; 4:44–6.
6. Gao P., Watanabe S., Ito T. et al. Biological Heterogeneity, Including Systemic Replication in Mice, of H5N1 Influenza A Virus Isolates from Humans in Hong Kong. J. Virol. 1999; 73:3184–9.
7. Guyton A. Measurements of the respiratory volumes of laboratory animals. Am. J. Physiol. 1947; 150:70–7.
8. Ibricevic A., Pekosz A., Walter M.J. et al. Influenza Virus Receptor Specificity and Cell Tropism in Mouse and Human Airway Epithelial Cells. J. Virol. 2006; 80:7469–80.
9. Katz J.M., Lu X., Tumpey T.M. et al. Molecular correlates of influenza A H5N1 virus pathogenesis in mice. J. Virol. 2000; 74(22):10807–10.
10. Khanna M., Kumar P., Choudhary K. et al. Emerging influenza virus: A global threat. J. Biosci. 2008; 33(4):475–82.
11. Matrosovich M., Matrosovich T., Uhlenhorff J., Garten W., Klenk H.-D. Avian-virus-like receptor specificity of the hemagglutinin impedes influenza virus replication in cultures of human airway epithelium. Hum. Pathol. 2009; 40:735–9.
12. Perrone L.A., Plowden J.K., Garc'a-Sastre A. et al. H5N1 and 1918 Pandemic Influenza Virus Infection Results in Early and Excessive Infiltration of Macrophages and Neutrophils in the Lungs of Mice. PLoS Pathog. 2008; 4(8):e1000115.
13. WHO. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO. 10 Jun 2011 [cited 11 Jun 2011]. Available from: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2011_06_10/en/index.html
14. Zhang Z., Zhang J., Huang K., Li K.-S., Yuen K.-Y., Guan Y., Chen H., Fu W. Systemic infection of avian influenza A virus H5N1 subtype. Hum. Pathol. 2009; 40(5):735–9.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Zaks L. [Statistic Evaluation]. M.: Statistics; 1976. 598 p.
2. Meykhi B., editor. [Virology. Methods]. M.: Mir; 1988. 344 p.
3. State Research Council. [Guidelines on maintenance and usage of laboratory animals]. Washington: National Academy; 1996.
4. Onishchenko G.G., Ryabchikova E.I., Sergeev A.N., Drozdov I.G. [Influenza Virus H5N1: atlas of reproduction and pathological changes of mice viscera]. Novosibirsk: "Arta"; 2008. 208 p.
5. Sergeev A.N., Zhukov V.A., Porvayev V.D. et al. [Development of a simple direct estimate method for the detection of the disease in mice and rats, which are aerosol-infected with influenza virus]. Vopr. Virusol. 2002; 4: 44–6.

Authors:

Sergeev A.A., Pyankov O.V., Demina O.K., Pyankova O.G., Ryabchikova E.I., Agafonov A.P., Sergeev A.N. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia. E-mail: aasergeev@vector.nsc.ru

Об авторах:

Сергеев А.А., Пьянков О.В., Демина О.К., Пьянкова О.Г., Рябчикова Е.И., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская область, п. Кольцово. E-mail: aasergeev@vector.nsc.ru

Поступила 16.07.11.

УДК 616.91/93:615.832.8(1-926.1)

С.И.Жукова, В.В.Алексеев, А.В.Липницкий, А.А.Занкович, И.В.Авророва, В.А.Антонов,
В.П.Смелянский, Г.А.Ткаченко, Е.В.Путинцева, О.В.Зинченко

НЕКОТОРЫЕ ПАРАМЕТРЫ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У БОЛЬНЫХ ЛИХОРАДКОЙ ЗАПАДНОГО НИЛА

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, Волгоград

Представлены результаты определения уровня цитокинов IL-1, IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-10 в сыворотках крови пациентов с лихорадкой Западного Нила, заболевших в Волгоградской области в период вспышки летом 2010 г. Отмечено существенное увеличение концентраций IL-1, IFN- γ , IL-10 и преобладание цитокинового ответа Th1-типа.

Ключевые слова: лихорадка Западного Нила, цитокины.

S.I.Zhukova, V.V.Alekseev, A.V.Lipnitsky, A.A.Zankovich, I.V.Avrorova, V.A.Antonov, V.P.Smelyansky,
G.A.Tkachenko, E.V.Putintseva, O.V.Zinchenko

Several Cytokine Profile Parameters in West Nile Fever Patients

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd

Presented are the results of cytokines' (IL-1, IL-2, IFN- γ , and TNF- α , IL-10) level detection in blood sera of West Nile fever patients in the territory of Volgograd Region during the summer outbreak in 2010. Marked is a significant increase in IL-1, IFN- γ , IL-10 concentration and cytokine response prevalence of Th1-type.

Key words: West Nile fever, cytokines.

Лихорадка Западного Нила (ЛЗН) – острое трансмиссивное вирусное заболевание, характеризующееся гипертермией, серозным воспалением мозговых оболочек, в редких случаях – менингоэнцефалитом, системным поражением слизистых оболочек, лимфаденопатией. Возбудитель ЛЗН достаточно широко распространен в странах с тропическим и субтропическим климатом, однако в последнее десятилетие ареал его обитания стал существенно расширяться, охватывая все новые и новые территории на американском и европейском континентах. В 1999 г. в России возникла крупная вспышка ЛЗН, охватившая Волгоградскую, Астраханскую области и Краснодарский край с общим числом заболевших около 600 человек, большим количеством тяжелых случаев инфекции и высокой летальностью (10 %). Чрезвычайно жаркое лето 2010 г. способствовало высокой степени репродукции вируса ЛЗН в орнитофильных комарах – основных переносчиках инфекции и, как следствие, возникновению новой вспышки заболевания в Волгоградской (413 случаев), Ростовской (59) и Воронежской (27) областях. Таким образом, в настоящее время ЛЗН рассматривается как серьезная медицинская проблема, поскольку дальнейшее распространение этой инфекции в нашей стране может привести к значительным социальным и экономическим потерям. Вместе с тем, многие аспекты патогенеза ЛЗН изучены крайне недостаточно, а этиотропная терапия и иммунопрофилактика не разработаны.

В последние годы формируется представление

о первостепенной роли системы цитокинов в защите организма от инфекций, а также диагностической и прогностической значимости определения уровня цитокинов в крови. В связи с этим целью данного исследования было определение в крови больных ЛЗН концентрации некоторых провоспалительных и противовоспалительных цитокинов и анализ возможной зависимости уровней цитокинов от возраста больных, степени выраженности температурной реакции, сроков забора крови от начала клинических проявлений инфекции.

Материалы и методы

Обследовано 13 больных с лабораторно подтвержденным диагнозом ЛЗН, заболевших летом 2010 г. в Волгоградской области. Диагностика заболевания базировалась на эпидемиологических критериях, клинических и лабораторных методах исследования, включавших определение специфических противовирусных IgM-антител с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и обнаружения РНК вируса ЛЗН методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ПЦР). Образцы крови больных исследовались в период с 3-х по 15-е сутки от начала заболевания. Для определения в сыворотках крови цитокинов IL-1, IL-2, TNF- α , IFN- γ , IL-10 были использованы диагностические наборы, выпускаемые ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург). Уровни цитокинов определяли на автоматическом

биохимическом и иммуноферментном анализаторе «BiochemAnalette» (США). В качестве контрольных использовали показатели 10 здоровых добровольцев молодого возраста. Полученные результаты обрабатывали статистически [1].

Результаты и обсуждение

Из 13 обследованных 6 человек было старше 50 лет (46 %), в возрастной группе 10–25 лет – 4 человека, в группе лиц среднего возраста 25–50 лет – 3 человека. По степени тяжести больные распределились следующим образом: 1 – с легкой формой, 1 – с тяжелой, 11 (81 %) – со среднетяжелым течением.

У всех больных обнаружены специфические антитела к вирусу ЛЗН, реакция амплификации была положительна при заборе крови на 3–9-е сутки от начала заболевания (10 человек), при взятии крови в период с 10-х по 15-е сутки (3 человека) ПЦР была отрицательной.

Исследование цитокинов в сыворотках крови, взятой на 3–5-е сутки от начала заболевания, не выявило существенных изменений в концентрациях провоспалительных цитокинов. Отмечен умеренный подъем уровня противовоспалительного цитокина IL-10 (в 2 раза по отношению к показателю у здоровых людей) – $(54,2 \pm 13,7)$ и $(18,4 \pm 1,5)$ пкг/мл соответственно, $p < 0,05$, рисунок.

В период с 6-х по 9-е сутки от начала заболевания выявлен максимально высокий уровень IL-1 ($1185,5 \pm 201,5$), в контроле – $(14,2 \pm 2,8)$ пкг/мл, $p < 0,05$ и IFN- γ ($407,5 \pm 117,4$), в контроле – $(9,1 \pm 1,5)$ пкг/мл, $p < 0,05$). Одновременно отмечалось повышение содержания в сыворотке крови IL-10 – $(100,0 \pm 19,9)$ пкг/мл. К 10–15-м суткам уровень IL-1 существенно снижался, и его значения превышали контрольные показатели всего в 2 раза, однако концентрация IFN- γ продолжала оставаться на прежнем высоком уровне, как и концентрация IL-10.

При оценке возрастных особенностей цитокинового ответа больных ЛЗН показано, что у наиболее молодых пациентов (10–25 лет) регистрировались самые высокие уровни цитокинов IL-1 и IFN- γ . Концентрации в сыворотке других цитокинов (IL-2, TNF- α) заметно

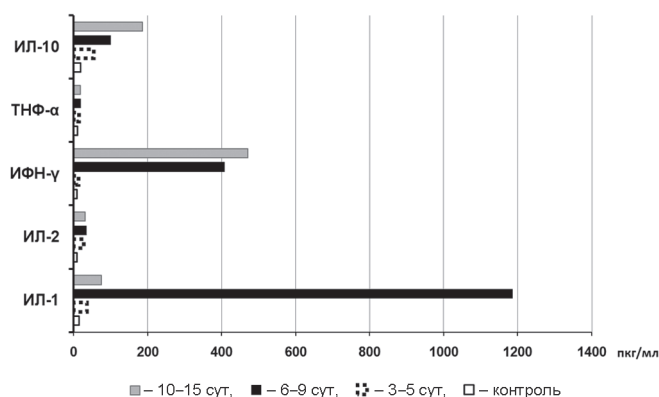
не различались в зависимости от возраста. Показатели уровня провоспалительного IL-10 были наименьшими в средней возрастной группе (25–50 лет).

Анализируя взаимосвязь между высотой гипертермии у больных ЛЗН и содержанием цитокинов в крови, следует отметить, что у пациентов с температурой до 39 °С (10 больных) уровень IL-1 был заметно выше, чем у больных с температурой 39–40 °С (3 больных) ($326,95 \pm 93,8$) и $(78,55 \pm 21,7)$ пкг/мл соответственно, $p < 0,05$). В данном случае можно предположить некую парадоксальную реакцию, так как принято считать, что из всех цитокинов преимущественно IL-1 активирует термоцентр головного мозга и вызывает повышение температуры [4]. Возможно, однако, что нет строгой зависимости между концентрацией IL-1 и степенью повышения температуры, тем более, что речь идет о разнице в 1 °С. У больных с выраженной лихорадкой (больше 39 °С) обращает на себя внимание более высокий уровень IFN- γ , чем в группе умеренно лихорадящих больных соответственно $(488,3 \pm 129,8)$ и $(182,55 \pm 34,4)$ пкг/мл, $p = 0,05$. Концентрации цитокинов IL-2, TNF- α , IL-10 существенно не различались в зависимости от температуры тела пациентов.

Таким образом, по нашим данным, у больных ЛЗН наиболее выраженный рост концентраций выявлен у провоспалительных цитокинов IL-1 и IFN- γ , в то время как уровни IL-2 и TNF- α не претерпевали существенных изменений по сравнению с показателями у здоровых людей. Как известно, IL-1 принадлежит ключевая роль в инициации воспалительного каскада, обуславливающего системный ответ на микробную или вирусную агрессию [4]. Что касается IFN- γ , то он является главным медиатором клеточного типа иммунного ответа [2] и, по мнению зарубежных исследователей, играет доминирующую роль в противовирусной защите при ЛЗН [5, 6]. Согласно литературным данным, при различных инфекциях соотношение IFN- γ /IL-10, отражающее баланс Th1/Th2, имеет прогностическое значение [3]. При возрастании этого соотношения обеспечивается приоритет клеточных реакций иммунитета, играющих первостепенную роль в выздоровлении при вирусных инфекциях. В нашем исследовании уровни IFN- γ у больных ЛЗН в разгаре инфекции превышали уровни IL-10 в 3,5–4 раза, что, вероятно, и способствовало благоприятному исходу заболевания у этих пациентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.; 1962. 180 с.
2. Железникова Г.Ф. Цитокины как предикторы течения и исхода инфекций. Цитокины и воспаление. 2009; 8(1):10–7.
3. Кузнецов В.П., Маркелова Е.В., Беляев Д.Л., Силич В.В., Бабаянц А.А., Лазанович В.А. и др. Динамика цитокинов при инфекциях: можно ли дать прогноз? Цитокины и воспаление. 2002; 1(2):118–20.
4. Симбирцев А.С. Цитокины – новая система регуляции защитных реакций организма. Цитокины и воспаление. 2002; 1(1):9–15.
5. Shrestha B., Samuel M.A., Diamond M.S. Gamma interferon plays a crucial early antiviral role in protection against West Nile virus infection. J. Virol. 2006; 80:5338–48.
6. Wang T., Town T., Alexopoulou L. IFN-gamma – producing



Уровни цитокинов больных ЛЗН в различные сроки от начала заболевания

gamma delta T cells help control murine West Nile virus infection. *J. Immunol.* 2003; 171:2524–31.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. *Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A.* [Statistic Methods in Microbiological Investigations]. Leningrad; 1962. 180 p.
2. *Zheleznikova G.F.* [Cytokines as predictors of the disease course and outcome]. *Tsytokiny i Vospalenie*: 2009; 8(1):10–7.
3. *Kuznetsov V.P., Markelova E.V., Belyaev D.L., Silich V.V., Babayants A.A., Lazanovich V.A. et al.* [Cytokine dynamics in the course of diseases: is it possible to do the forecast?]. *Tsytokiny i Vospalenie*: 2002; 1(2):118–20.
4. *Simbirtsev A.S.* [Cytokines are the new system of the klendusity regulation]. *Tsytokiny i Vospalenie*. 2002; 1(1):9–15.

Authors:

Zhukova S.I., Alekseev V.V., Lipnitsky A.V., Zankovich A.A., Avrорова I.V., Antonov V.A., Smelyansky V.P., Tkachenko G.A., Putintseva E.V., Zinchenko O.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute. Golubinskaya St., 7, Volgograd, 400131, Russia. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Об авторах:

Жукова С.И., Алексеев В.В., Липницкий А.В., Занкович А.А., Авророва И.В., Антонов В.А., Смелянский В.П., Ткаченко Г.А., Путинцева Е.В., Зинченко О.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 18.01.11.

Е.М.Кузнецова, О.А.Волох, Е.А.Смолькова, Т.Н.Щуковская, И.А.Шепелёв, Н.Г.Авдеева,
А.Л.Кравцов, А.К.Никифоров

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АНТИГЕННЫХ КОМПЛЕКСОВ ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

В результате проведенных исследований препаратов антигенных комплексов туляремиального микроба, полученных из штаммов-продуцентов разных подвидов (*holarctica*, *nearctica*, *mediasiatica*, *novicida*), установлено, что протективный антигенный комплекс является общим антигеном для возбудителя туляремии независимо от его подвидовой принадлежности. Полученные антигенные комплексы из штаммов голарктического, неарктического и среднеазиатского подвидов обладают сходным химическим и субъединичным составом и иммунобиологическими свойствами. Особенности строения протективного антигенного комплекса из *Francisella tularensis* subsp. *novicida*, приводят к снижению его иммуногенности и протективности по сравнению с аналогичными антигенами из других подвидов.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, подвиды возбудителя туляремии, антигены, иммуногенность, протективность.

E.M.Kuznetsova, O.A.Volokh, E.A.Smol'kova, T.N.Shchukovskaya, I.A.Shepelev, N.G.Avdeeva, A.L.Kravtsov,
A.K.Nikiforov

Immunobiological Properties of *Francisella tularensis* Antigen Complexes

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Carried out are the studies of preparations of *Francisella tularensis* antigen complexes, obtained from the producer strains of different subspecies (*holarctica*, *nearctica*, *mediasiatica*, *novicida*). It is discovered that the outer-membrane (OM) antigen complex is a common antigen of *Francisella tularensis* regardless of its sub-specific origin. Antigen complexes isolated from strains of *holarctica*, *nearctica*, and *mediasiatica* subspecies have similar chemical and subunit composition, and immunobiological properties. Peculiarities of composition of *F. tularensis* subsp. *novicida* OM-antigen complex lead to the decrease of its immunogenicity and protective capability in comparison with analogous antigens of other subspecies.

Key words: *Francisella tularensis*, subspecies of tularemia agent, antigens, immunogenicity, protective capability.

Ареал возбудителя туляремии охватывает все страны умеренного климатического пояса Северного полушария, включая территорию России и соседних стран [4, 12]. И хотя в Российской Федерации заболеваемость туляремией находится на низком уровне, специалисты прогнозируют возможность обострения эпидемиологической обстановки по данной инфекции [3]. В связи с этим очевидна перспективность разработки новых и усовершенствование имеющихся иммунопрофилактических и диагностических препаратов. Особое внимание при этом уделяется изучению комплексных антигенов туляремиального микроба [10, 11, 12]. Одним из таких «природных коктейлей» является протективный антигенный комплекс (ПАК) туляремиального микроба, отличающийся повышенным содержанием белковых компонентов (до 65 % белка) и большей протективной активностью, по сравнению с ранее описанными комплексными антигенами [2, 6, 9]. Ранее были подробно изучены особенности его биосинтеза штаммом-продуцентом живой туляремиальной вакцины *F. tularensis* 15 НИИЭГ [7] и иммунобиологические свойства этого антигена [1].

В настоящей работе представлены данные сравнительного анализа иммунобиологических свойств препаратов ПАК, полученных из штаммов-продуцентов разных подвидов туляремиального микроба.

Материалы и методы

В работе использовали препараты ПАК, полученные из биомассы 48-часовых агаровых культур штаммов-продуцентов разных подвидов туляремиального микроба: ПАК-15 (из штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ), ПАК-503 (из штамма *F. tularensis* 503/840), ПАК-A`Cole (из штамма *F. tularensis* B399 A`Cole), ПАК-A 179 (из штамма *F. tularensis* A-179) и ПАК-Utah 112 (из штамма *F. tularensis* Utah 112). Препараты поверхностных антигенных комплексов *F. tularensis* получали по методике [7].

Уровень антител в сыворотке крови иммунизированных лабораторных животных оценивали в иммуноферментном анализе (ИФА, ДИА) с использованием коммерческой туляремиальной сыворотки и экспериментальных поликлональных антител к протективному антигенному комплексу (Ig «ПАК»). Анализ иммуногенности препаратов проводили на беспородных белых мышах (18–20 г) и морских свинках (250 г). В качестве положительного контроля использовали лабораторных животных, вакцинированных живой туляремиальной вакциной (ЖТВ), Омск. Постановку и учет реакции лейкоцитолитической осуществляли по стандартной методике [5]. Статистические профили распределения лейкоцитов белых мышей по

клеточному циклу – ДНК-гистограммы получали с использованием цитохимического метода V.Barlogie *et al.* [8] на импульсном проточном цитофлуориметре ICP-22 PHUWE. С помощью нитросинего тетразолиевого теста (НСТ) оценивали фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов белых мышей [1], выраженную в процентах фагоцитирующих клеток и фагоцитарным числом (количество захваченных частиц на один фагоцит).

Статистическую обработку данных проводили по критерию Стьюдента, доверительный интервал устанавливали при вероятности 95 %.

Результаты и обсуждение

По своим физико-химическим свойствам, биохимическому и иммунохимическому составу препараты ПАК из вирулентных штаммов туляремии микроба разных подвидов были аналогичны референс-препарату из вакцинного штамма. В частности, все препараты ПАК, кроме ПАК-Utah 112, по данным гель-хроматографии имели молекулярную массу около 280 кДа, обладали сходным химическим составом и содержали следующие иммунохимически активные субъединицы: 81–85, 57–60, 43, 23–27 и 14–17 кДа. Хроматографический профиль препарата ПАК-Utah 112 отличался наличием двух пиков с молекулярными массами около 280 и 160 кДа. Кроме того, в составе данного антигена были обнаружены дополнительные высокомолекулярные субъединицы более 110 кДа и отсутствовали полипептиды в области 57–85 кДа. Химический состав препарат ПАК-Utah 112 отличался от аналогичных препаратов других подвидов большим содержанием углеводного компонента.

При введении однократно подкожно препаратов ПАК белым мышам в дозе 10 мкг было отмечено, что во всех случаях к 3–7-м суткам регистрируются специфические антитела в ДИА в титре 1/40–1/120, с достижением максимума (до 1/260–1/320) к 14-м суткам (для ПАК-15, ПАК-503, ПАК-A`Cole и ПАК-A 179) и к 21-м суткам до 1/160 (для ПАК-Utah 112). Установлено, что оптимальными способами иммунизации ПАК являются парентеральные (подкожный, внутрибрюшинный) – титр в ДИА 1/320, тогда как при пероральном введении антителый ответ был зарегистрирован в более поздние сроки и в более низком титре (в 4–8 раз меньше). Увеличение кратности введения не оказывало влияния на уровень антител. У морских свинок (иммунизирующая доза 100 мкг препарата, однократно) антителый ответ к ПАК-15 был зарегистрирован только к 14-м суткам (титр в сэндвич-ИФА 1/320–1/640) после иммунизации, с максимумом к 42-м суткам (титр 1/640–1/960) и снижением уровня антител к 6 месяцам (титр 1/40–1/80) с начала эксперимента.

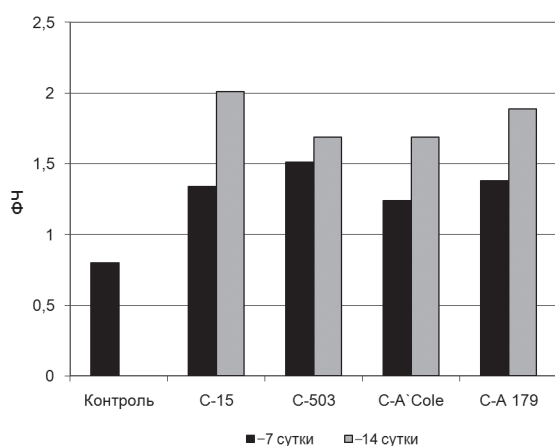
Проведен сравнительный анализ влияния иммунизации препаратами ПАК разных подвидов и ЖТВ на показатели клеточного звена иммунитета. При

оценке реакции лейкоцитоллиза у белых мышей, иммунизированных препаратами ПАК, полученными из вирулентных штаммов, отмечена волнообразная динамика показателей с максимумом на 14-е сутки иммуногенеза (33–36 %) и их снижение к окончанию срока наблюдения до отрицательного или слабоположительного уровня (15–20 %), соответствующего контрольной группе. После иммунизации белых мышей препаратами ПАК-15 реакция лейкоцитоллиза была резко положительна к 21-м суткам и составила в среднем 53,5 %. У мышей, вакцинированных ЖТВ, в эти же сроки коэффициент лейкоцитоллиза был равен 56 %. Положительный аллергический ответ у животных, иммунизированных препаратом ПАК-15, свидетельствует о его высокой иммуногенности.

В результате проведенных исследований влияния однократной иммунизации ПАК *F. tularensis* разных подвидов в дозе 10 мкг на показатели клеточного звена иммунитета белых мышей показано, что доля апоптотических тимоцитов и спленоцитов соответствовала контрольным значениям, что свидетельствует об отсутствии выраженного повреждающего действия всех 4 препаратов на клетки макроорганизма. Несмотря на некоторые отличия в действии ПАК разных подвидов на пролиферативную активность иммунокомпетентных клеток тимуса и селезенки белых мышей, к 14–21-м суткам они нивелировались. Причем уровень ответа спленоцитов на введение всех препаратов ПАК был выше, чем у тимоцитов (33,5±0,9 и 29,8±1,8 соответственно), а на 1-е сутки достоверно превышал этот показатель для ЖТВ (27,9±0,6). Кроме того, максимальной иммуногенностью обладал препарат ПАК-15, к 21-м суткам доля пролиферирующих клеток селезенки мышей была сопоставима с таковой при вакцинации животных (25,0±1,8 и 27,4±0,9 соответственно). Уровень пролиферативной активности тимоцитов во все сроки иммуногенеза при введении как препаратов ПАК, так и ЖТВ, был на уровне контрольных значений, что, вероятно, связано с более поздней активацией Т-лимфоцитов по сравнению с В-клетками и, учитывая положительный аллергический тест, с интенсивными процессами миграции иммунокомпетентных клеток.

Изменение фагоцитарных показателей указывает на степень вовлечения иммунокомпетентных клеток в процессы иммунобиологической перестройки вакцинированных против туляремии животных. Показано, что НСТ-редуцирующая активность макрофагов, степень которой выражена фагоцитарным числом (ФЧ), повышается после иммунизации каждым из 4 препаратов ПАК (рисунок). К 14-м суткам иммуногенеза наиболее высокая фагоцитарная активность макрофагов отмечалась у мышей, иммунизированных препаратом ПАК-15.

Изучение протективных свойств препаратов ПАК проводили на модели белых мышей, которых иммунизировали однократно подкожно возрастающими дозами от 5 до 625 мкг, с последующим зара-



Фагоцитарная активность макрофагов белых мышей в НСТ-тесте

жением вирулентными штаммами разных подвидов на 21-е сутки в дозе 100 м.к. Протективные свойства препарата ПАК-Utah 112 оценивали только против штамма голарктического подвида. Во всех экспериментах патолого-анатомическая картина и высевы из органов павших животных на селективные питательные среды указывали на гибель от туляремийной инфекции.

Установлено, что все полученные препараты ПАК, независимо от подвидовой принадлежности штамма-продуцента, защищают лабораторных животных от гибели при экспериментальной инфекции, вызванной вирулентными штаммами голарктического и неарктического подвида (таблица). Для препарата ПАК-A' Cole характерна более низкая иммуногенность против инфекции, вызванной гомологичным штаммом, чем гетерологичным, что согласуется с литературными данными [1]. При экспериментальной туляремии, вызванной штаммом среднеазиатского подвида (заражающая доза 100 LD₅₀), отмечена 100 % выживаемость всех иммунизированных животных (ED₅₀ препаратов 2,24 (1,8÷8,3) мкг) до 21-х суток (срок наблюдения) при 100 % гибели контрольной группы с продолжитель-

ностью жизни (5,6±0,4) сут. Это может быть связано с более низкой вирулентностью штамма (LD₅₀ 5 м.к.). Иммуногенность препарата ПАК-Utah 112 была ниже по сравнению с другими исследованными препаратами ПАК: выживаемость животных составила в среднем 37,5 %, средняя иммунизирующая доза препарата – 125,9 (66,7÷269,4) мкг. Возможно, отмеченные отличия в протективных свойствах связаны с биохимическими и иммунохимическими особенностями ПАК из подвида *novicida*.

Напряженность иммунитета определяли для препарата ПАК-15 на модели белых мышей (иммунизирующая доза 100 мкг) против вирулентных штаммов *F. tularensis* 503/840 и B399 A' Cole (заражали возрастающими дозами вирулентных штаммов от 1 до 1000 м.к.). Отмечена значительно более низкая напряженность иммунитета при заражении вирулентным штаммом неарктического подвида (индекс иммунитета равен 10) по сравнению с инфекцией, вызванной вирулентным штаммом голарктического подвида (индекс иммунитета составил 1468). Эти данные согласуются с результатами эксперимента по определению иммуногенности препарата ПАК-15 (таблица).

Таким образом, в процессе исследования иммунобиологических свойств препаратов ПАК туляремийного микроба разных подвида впервые было установлено, что, независимо от подвидовой принадлежности и вирулентности штамма-продуцента, ПАК имеет сходство по иммунобиологическим свойствам: обладает иммуногенностью, выраженной протективной активностью для лабораторных животных и не оказывает повреждающего действия на иммунокомпетентные клетки. Препарат ПАК из *F. tularensis* subsp. *novicida* обладает сниженной иммуногенностью и протективностью по сравнению с препаратами ПАК, полученными из штаммов-продуцентов других подвида. По результатам проведенных иммунологических тестов максимальной иммуномодулирующей активностью обладает ПАК из вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Иммуногенность препаратов ПАК для белых мышей при экспериментальной туляремийной инфекции

Заражающий штамм	Препарат	n/N	Δt, сут	ED ₅₀ , мкг (ED _{50 min} ÷ ED _{50 max})
<i>F. tularensis</i> 503/840 (LD ₅₀ =1 м.к.)	ПАК-15	22/23	20,4±0,9	3,1 (2,4÷11,3)
	ПАК-503	12/24	14,1±3,3	112,2 (48,9÷257)
	ПАК-A' Cole	11/24	13,4±2,7	131,8 (50,1÷407,4)
	ПАК-A 179	14/24	15,3±2,5	33,11 (27,2÷108)
	ПАК-Utah 112	9/24	13,2±3,9	125,9 (66,7÷269,4)
	Контроль	0/6	5,3±0,8	–
<i>F. tularensis</i> B399 A' Cole (LD ₅₀ =1 м.к.)	ПАК-15	10/24	13,2±2,4	95,5 (55,9÷169)
	ПАК-503	13/23	15,5±2,8	66,1 (25,1÷204)
	ПАК-A' Cole	5/23	10,9±1,8	562,3 (251,2÷818)
	ПАК-A 179	16/23	16,45±2,3	16,21 (9,2÷25,1)
	Контроль	0/6	5,8±0,6	–

Примечание. Δt – средняя продолжительность жизни с интервалом вероятности (M±mt), n/N – отношение выживших к общему числу мышей в группе, ED₅₀ – средняя иммунизирующая доза, диапазон min÷max.

Работа выполнена по государственному контракту № 52-Д/1 от 29.06.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 гг.)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волох О.А., Шепелёв И.А., Фирстова В.В., Храмова Е.М., Авдеева Н.Г., Самохвалова Ю.И. и др. Оценка иммунобиологической активности препаратов С-комплекса туляремиального микроба, как перспективного компонента химических вакцин. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 3:16–21.
2. Жемчугов В.Е., Дятлов И.А., Кутырев В.В., Волох О.А. Способ получения препарата для активной иммунизации против туляремии. Патент РФ № 2221591, опубл. 20.01.2004. Бюл. № 2.
3. Кологоров А.И., Дмитриева Л.Н., Шиянова А.Е., Тарасов М.А., Поршаков А.М., Попов Н.В. и др. Эпидемиологическая ситуация по природно-очаговым и зоонозным инфекциям в Приволжском федеральном округе в 2000–2009 гг. и прогноз на 2010 г. Пробл. особо опасных инф. 2010; 2(104):5–10.
4. Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.: Медицина; 1975. 190 с.
5. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: Медицина; 2009. С. 27–61.
6. Хлебников В.С., Головлев И.Р., Кулеватский Д.П. и др. Изучение биохимических, антигенных и протективных свойств внешней мембраны возбудителя туляремии. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 1991; 7:15–20.
7. Шепелёв И.А., Волох О.А., Еремин С. А., Дятлов И.А. Оптимизация способа получения С-комплекса туляремиального микроба. Пробл. особо опасных инф. 2006; 2(92):61–4.
8. Barlogie B., Spitzer G., Hart G.S., Johnston D.A., Buchner T. et al. DNA histogram analysis of human hemopoietic cells. Blood. 1976; 2(48):245–58.
9. Golovliov I., Ericsson M., Sandström G. et al. Identification of proteins of *F. tularensis* induced during growth in macrophages and cloning of the gene encoding a prominently induced 23-kDa protein. Infect. Immun. 1997; 6(65):2183–89.
10. Huntley J.F., Conley P.G., Hagman K.E., Norgard M.V. Characterization of *Francisella tularensis* outer membrane proteins.

J. Bacteriol. 2007; 2(189):561–74.

11. Spletstoeser W.D., Tomaso H., Dahouk S.A., Neubauer H., Schuff-Werner P.S. Diagnostic procedures in tularemia with special focus on molecular and immunological techniques. J. Vet. Med. 2005; 52:249–61.
12. Tärnvik A., Berglund L. Tularemia. Eur. Respir. J. 2003; 21(2):361–73.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Volokh O.A., Shepelev I.A., Firstova V.V., Khramkova E.M., Avdeeva N.G., Samokhvalova Yu.I. et al. [Evaluation of immunobiological activity of *Francisella tularensis* “C”-complex preparations as promising component of subunit vaccines]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2007; 3:16–21.
2. Zhemchugov V.E., Dyatlov I.A., Kutyrev V.V., Volokh O.A. [Method of preparation obtainment for active immunization against tularemia]. RF Patent 2221591. 20 Jan 2004.
3. Kologorov A.I., Dmitrieva L.N., Shiyanova A.E., Tarasov M.A., Porshakov A.M., Popov N.V. et al. [Epidemiological situation on natural-focal and zoonotic infections in Privolzhsky Federal District in 2000–2009 and the prognosis for 2010]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; 2(104):5–10.
4. Olsuf'ev N.G. [Taxonomy, Microbiology and Laboratory Diagnostics of Tularemia Agent]. Moscow: Meditsina; 1975. 190 p.
5. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Guidelines]. Moscow: Meditsina; 2009. P. 27–61.
6. Khlebnikov V.S., Golovlev I.R., Kulevatsky D.P. et al. [Studies of biochemical, antigen and protective properties of tularemia agent outer-membrane]. Mol. Gen. Microbiol. Virusol. 1991; 7:15–20.
7. Shepelev I.A., Volokh O.A., Eremine S.A., Dyatlov I.A. [Optimization of the techniques for deriving the protective “C”-complex of the tularemia pathogen]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2006; 2(92):61–4.

Authors:

Kuznetsova E.M., Volokh O.A., Smol'kova E.A., Shchukovskaya T.N., Shepelev I.A., Avdeeva N.G., Kravtsov A.L., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Кузнецова Е.М., Волох О.А., Смолькова Е.А., Щуковская Т.Н., Шепелёв И.А., Авдеева Н.Г., Кравцов А.Л., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 15.10.10.

С.С.Ветчинин, П.Х.Копылов, Н.В.Киселева, О.Г.Николаева, А.В.Гаврюшкин

ПОЛУЧЕНИЕ ИММУНОМАГНИТНЫХ ЧАСТИЦ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК *FRANCISELLA TULARENSIS*

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk

Получены иммуномагнитные частицы с иммобилизованными высокоспецифичными моноклональными антителами FB11-х к *Francisella tularensis*. Их использование в иммуноферментном анализе позволило определить $10^5 - 10^6$ КОЕ / мл *F. tularensis*. Связывание бактериальных клеток с ИМЧ подтверждено флуоресцентной микроскопией.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, иммуномагнитные частицы, моноклональные антитела, иммуноферментный анализ, флуоресцентная микроскопия.

S.S.Vetchinin, P.Kh.Kopylov, N.V.Kiseleva, O.G.Nikolaeva, A.V.Gavryushkin

Obtainment of the Immunomagnetic Particles for *Francisella tularensis* Cells Detection

State Scientific Centre of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

Obtained are the immunomagnetic particles with the immobilized highly-specific monoclonal antibodies FB 11-x to *Francisella tularensis*. Their usage in enzyme-linked immunoassays made it possible to detect $10^5 - 10^6$ CFU/ml of *F. tularensis*. The binding of the bacterial cells with IMP was confirmed by the results of fluorescent microscopy.

Key words: *Francisella tularensis*, immunomagnetic particles, monoclonal antibodies, enzyme-linked immunoassay, fluorescent microscopy.

Особо опасные инфекции, относящиеся преимущественно к карантинным и природно-очаговым, в эпидемиологическом плане не теряют актуальности. В течение 2005 г. в России наблюдался резкий рост заболеваемости туляремией, который привел к госпитализации 831 человека (из них 109 детей в возрасте до 14 лет), и повышению показателя заболеваемости до 0,58 на 100 тыс. населения. Эпидемиологическая ситуация характеризовалась преимущественным инфицированием городских жителей (более 80 % случаев), в частности, в Москве впервые было зарегистрировано 230 случаев. Заражение происходило на территории Московской, Рязанской и Владимирской областей. Предположительно, причиной болезни людей стала активизация природного очага среди мышевидных грызунов. Ситуация существенно осложняется ошибками в индикации *F. tularensis* и продолжает оставаться нестабильной. Поэтому разработка новых методов идентификации возбудителей опасных инфекционных болезней в различных объектах внешней среды остается актуальной ввиду ее социальной значимости. Использование традиционных методов культивирования патогенных бактерий и определение их биохимических маркеров в объектах окружающей среды может приводить к недооценке воздействия ряда сублетальных факторов, изменяющих метаболизм и репродуктивную способность бактерий при выращивании на искусственных питательных средах. Это приводит к задержке их роста и увеличению продолжительности анализов, как минимум, на одни сутки, особенно при низких

концентрациях микробов. Одним из подходов для решения этой проблемы может быть использование предварительной иммуномагнитной сепарации патогенов [6, 12]. Повышенный интерес к использованию магнитных носителей представляется правомерным, так как лежит в русле передовых тенденций создания полностью автоматизированных систем экспресс-диагностики патогенных микроорганизмов.

Целью работы было получение магнитных частиц (МЧ) и создание на их основе иммуномагнитных частиц (ИМЧ), пригодных для определения возбудителя туляремии.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В работе использовали бактериальные штаммы из коллекции ФГУН ГНЦ ПМБ: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Providencia rettgeri*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Klebsiella pneumonia* ATCC 13883, *Pasteurella multocida* ATCC 43137, *Corynebacterium diphtheria* № 75, *Citrobacter diversus*, *Morganella morganii* 1253, *Salmonella typhimurium* 79, *Yersinia pseudotuberculosis* шт. 1 (Pfeiffer), *Yersinia enterocolitica* 348-01, *Legionella micdadei* 11731 (NCTC), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* F-392, *Burkholderia pseudomallei* 109 (Roos) и *Burkholderia mallei* Z-12, *Francisella tularensis* штамм 15, *Francisella novicida* штамм 112.

Реактивы. Полиаллиламингидрохлорид и полистиролсульфонат (Aldrich, США), сульфаты двух- и

трехвалентного железа, гидроокись калия, тетраэтоксисилан, однозамещенный и двузамещенный фосфаты натрия, хлористый натрий, глутаровый альдегид, Трис, HEPES, бикарбонат натрия, натрий йоднокислый мета, боргидрид натрия, сухое обезжиренное молоко, твин-20, *o*-фенилендиамин, лимонная кислота (FLUKA, США), сефароза – белок А, стрептавидин, *N*-гидроксисукцинимидный эфир биотина, *N,N'*-диметилформамид, флуоресцинзотиоцианат (ФИТЦ), пероксидаза хрена, конъюгат антимышиных антител с пероксидазой хрена и натрий уксуснокислый (SIGMA, США), остальные реактивы – отечественного производства с квалификацией «х.ч.» или «о.с.ч.».

Получение модифицированных магнитных частиц с иммобилизованным стрептавидином. Магнитные частицы получали конденсацией сульфатов двух- и трехвалентного железа [10], силиконировали [4] и покрывали полимерными слоями полиаллиламингидрохлорида (ПАА) и полистиролсульфоната (ПСС), несущими чередующиеся противоположные заряды [11]. Последовательно повторяя процедуру обработки, наносили восемь полимерных слоев: (ПАА-ПСС)₈. Контроль поверхностного заряда магнитных частиц на каждом этапе обработки полимерами подтверждали измерением их электрофоретической подвижности [9]. Размеры магнитных частиц и их концентрацию в суспензии определяли методом световой микроскопии [1]. Для иммобилизации стрептавида на поверхности магнитных частиц использовали 1 % раствор глутарового альдегида, 0,3 мл которого смешивали с 1,0 мл суспензии магнитных частиц в 0,1 М ФСБ, содержащей 0,005 % стрептавида. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 120 мин со скоростью 150 об./мин⁻¹. Несвязавшиеся реагенты удаляли центрифугированием, осадок МЧ суспензировали в 1 мл 0,5 М трис-НСl (рН 8,5) и инкубировали при температуре 10 °С в течение ночи, после чего модифицированные МЧ с конъюгированным стрептавидином промывали 0,1 М ФСБ, рН 7,5.

Получение модифицированных моноклональных антител FB11-х. Использовали моноклональные антитела FB11-х [3, 8], которые очищали аффинной хроматографией на сефарозе – белок А. По результатам твердофазного ИФА их титр составлял не менее 1:100000 для концентрации МКАТ равной 1 мг/мл. Перекрестное взаимодействие МКАТ FB11-х с клетками перечисленных выше видов патогенных микроорганизмов определяли в твердофазном ИФА [2]. Биотинилирование МКАТ FB11-х проводили *N*-гидроксисукцинимидным эфиром биотина [7]. Для флуоресцентного анализа МКАТ FB11-х обрабатывали флуоресцинзотиоцианатом по методу [5]. Пероксидазу хрена и МКАТ FB11-х конъюгировали периодатным методом [13].

Получение иммуномагнитных частиц. Для определения оптимального соотношения МКАТ и магнитных частиц в микропробирке емкостью 0,2 мл

вносили по 2 мкл 10 % суспензии магнитных частиц, покрытых стрептавидином, и по 20 мкл биотинилированных антител в ФСБ с концентрациями от 0,05 до 1,0 мг/мл. Смесь инкубировали при непрерывном перемешивании в течение 30 мин при комнатной температуре и пятикратно промывали 0,01 М фосфатно-солевым буферным раствором (рН 7,2), содержащим 0,05 % твина-20 (ФСБТ), удерживая частицы постоянным магнитом. Для уменьшения вероятности неспецифического связывания компонентов ИФА на последующих этапах комплекс МЧ – МКАТ FB11-х инкубировали со 100 мкл 5 % раствора обезжиренного молока в ФСБТ при тех же условиях. Избыток молока удаляли трехкратной промывкой ФСБТ и добавляли в каждую пробирку по 100 мкл раствора (1:2000) антимышиных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Суспензию инкубировали при перемешивании в течение 40 мин при температуре 37 °С. После пятикратной промывки ФСБТ в микропробирку вносили по 100 мкл субстрата, содержащего 0,003 % перекиси водорода и 0,04 % раствора *o*-фенилендиамина в 0,05 М цитрат-фосфатном буфере, рН 5,0. Через 10 мин реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М раствора серной кислоты и регистрировали оптическую плотность продукта реакции при 492 нм. За оптимальную концентрацию МКАТ FB11-х принимали ее значение, при котором величина оптической плотности достигала предельной величины.

Определение клеток *F. tularensis* с использованием иммуномагнитных частиц. К 2 мкл 10 % суспензии иммуномагнитных частиц (ИМЧ) добавляли 30 мкл клеток *F. tularensis*, инкубировали при температуре 37 °С и перемешивали в течение 30 мин. Несвязавшиеся микробные клетки удаляли пятикратной промывкой ФСБТ. Как и в предыдущем разделе, варьировали концентрацию биотинилированных МКАТ FB11-х при постоянной концентрации клеток возбудителя туляремии, составлявшей $3,3 \cdot 10^8$ КОЕ / мл буферного раствора. Затем ИМЧ обрабатывали моноклональными антителами FB11-х, конъюгированными с пероксидазой хрена (1 мг/мл), разведенными 1:3000. Обработку, промывку и регистрацию результатов ИФА проводили, как указано в предыдущем разделе.

В другой серии вариантов ИФА использовали корректированную в предыдущих экспериментах концентрацию биотинилированных МКАТ FB11-х и варьировали концентрацию клеток *F. tularensis*, инактивированных на кипящей водяной бане в течение 15 мин, в интервале от 10^3 до 10^7 КОЕ / мл.

Флуоресцентная микроскопия клеток *F. tularensis*. Иммуномагнитные частицы, связанные с клетками *F. tularensis* (10^9 в 1 мл), инкубировали с раствором ФИТЦ-меченных МКАТ FB11-х (разведение 1:1000) в ФСБТ в течение 1 ч при температуре 37 °С при непрерывном перемешивании. Затем проводили семикратную промывку частиц тем же буфером. Осадок суспензировали в 50 мкл 50 % раствора

глицерина в 100 мМ трис-буфере, pH 8,5. Суспензию переносили на предметное стекло, накрывали препарат покровным стеклом и анализировали на флуоресцентном микроскопе (Opton, Германия). Контрольные пробы содержали МЧ, не обработанные биотинилированными МКАТ FB11-х.

Результаты и обсуждение

В экспериментах получены частицы магнетита (окись-закись железа), представляющие собой гранулы овальной формы размером 0,5–1 мкм. Начальные этапы модифицирования МЧ включали силиконирование поверхности оксидных микрогранул ферромагнетика с последующим нанесением чередующихся слоев полимеров, противоположные заряды которых обеспечивали их удерживание на поверхности. Величины электрофоретической подвижности частиц, покрытых полимерными слоями, измеряли на каждом текущем этапе модификации, составляли в среднем $0,28 \text{ мкм} \times \text{см} \times \text{В}^{-1} \times \text{с}^{-1}$ и $-1,16 \text{ мкм} \times \text{см} \times \text{В}^{-1} \times \text{с}^{-1}$ для слоев ПАА и ПСС соответственно.

Стрептавидин ковалентно иммобилизовали на аминогруппах внешнего слоя ПАА, что давало возможность варьировать природу биотинилированных лигандов и, в итоге, изменять функциональную активность ИМЧ в отношении различных возбудителей. Концентрация МЧ, покрытых стрептавидином, составляла 10^{10} частиц в 1 мл суспензии.

Связывающую способность МЧ с иммобилизованным стрептавидином определяли титрованием биотинилированными МКАТ FB11-х с последующей детекцией образованного аффинного комплекса в ИФА. Максимальное связывание биотинилированных МКАТ с МЧ наблюдали при концентрации антител равной 0,5 мг/мл. Так как ИМЧ создавались с целью идентификации клеток, для подтверждения предыдущего результата была использована систе-

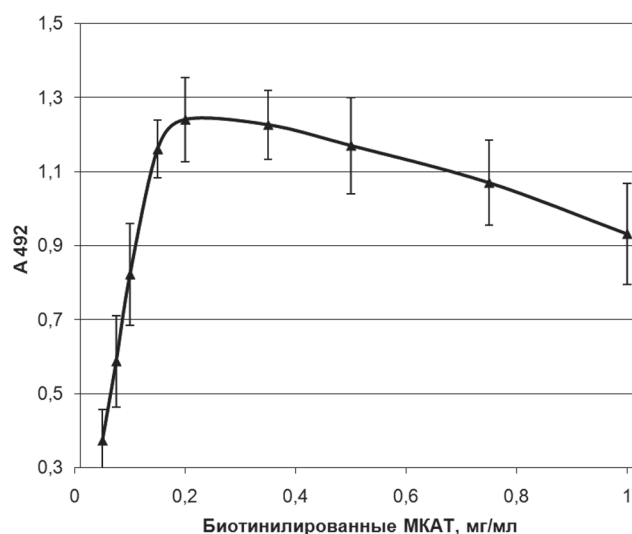


Рис. 1. Иммуноферментный анализ связывания клеток *F. tularensis* иммуномагнитными частицами, образованными различными инкубационными концентрациями биотинилированных МКАТ FB11-х

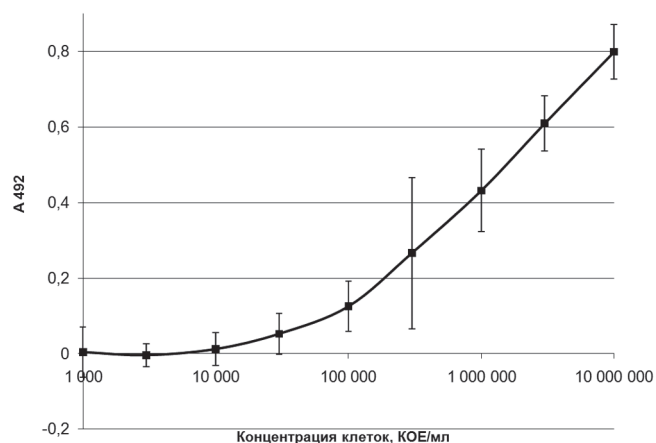


Рис. 2. Определение клеток *F. tularensis* с помощью иммуномагнитных частиц иммуноферментным анализом

ма ИФА, включающая ИМЧ, бактериальные клетки и конъюгат МКАТ FB11-х с пероксидазой хрена. Введение клеток *F. tularensis* в эту систему показало, что для их определения в ИФА оптимальной является концентрация биотинилированных антител равная 0,2 мг/мл, а не 0,5 мг/мл (рис. 1). Этот эффект, вероятно, был обусловлен особенностями пространственного взаимодействия ИМЧ с бактериальными клетками. В связи с этим в последующих экспериментах с микробными клетками, образующими комплекс с ИМЧ, использовали концентрацию биотинилированных МКАТ FB11-х равную 0,2 мг/мл. Такая система регистрировала в ИФА 10^5 – 10^6 КОЕ / мл *F. tularensis* в 1 мл (рис. 2).

Результаты взаимодействия МКАТ FB11-х, меченных ФИТЦ, с комплексом ИМЧ – бактериальные клетки представлены на рис. 3. Интенсивное зеленое свечение иммуномагнитных частиц, наблюдаемое в поле зрения флуоресцентного микроскопа, свидетельствовало об эффективном связывании ФИТЦ-меченных МКАТ FB11-х с клетками возбудителя *F. tularensis* (рис. 3, В). Флуоресценция ИМЧ без добавления туляремийных клеток имела желтый цвет, что от-

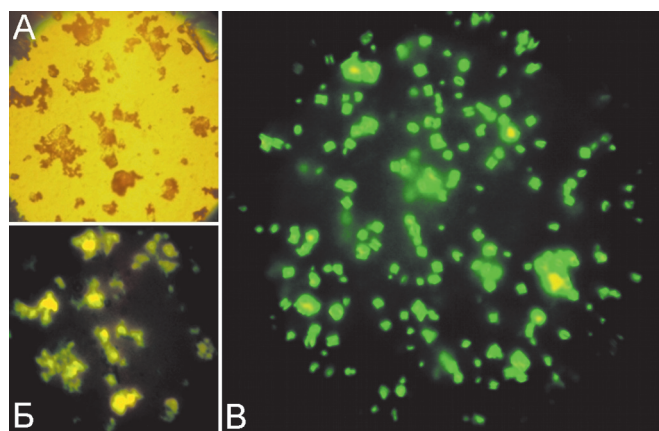


Рис. 3. Микроскопия комплекса иммуномагнитных частиц и бактериальных клеток:

А – ИМЧ в видимом свете в отсутствии клеток *F. tularensis*;
Б – аутофлуоресценция ИМЧ в отсутствии клеток *F. tularensis*;
В – флуоресценция ИМЧ с клетками *F. tularensis*

ражало отсутствие взаимодействия ФИТЦ-меченных МКАТ FB11-х и магнитных частиц (рис. 3, Б).

Представленные результаты свидетельствуют о возможности использования ИМЧ для определения клеток *F. tularensis* в ИФА, так как чувствительность метода не уступает его твердофазному варианту на микропланшетах. Полученные высокоспецифичные ИМЧ могут успешно применяться для концентрирования клеток возбудителя из объектов окружающей среды. Простота, специфичность и наглядность определения патогена не требуют дополнительного культивирования клеток после их концентрирования и подтверждаются иммуноферментным и иммунофлуоресцентным анализом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бельи В.А., Пинчук Л.С. Введение в материаловедение герметизирующих систем. Минск: Наука и техника; 1980. 169 с.
2. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа; 1991. 288 с.
3. Хлебников В.С., Головлев И.Р., Тохтамышева Н.В., Аверин С.Ф., Кулеватский Д.П., Аверина А.А. и др. Определение антигенной детерминанты превентивных моноклональных антител, специфичных к липополисахариду *Francisella tularensis*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1993; 1:83–8.
4. Шляпникова Е.А., Шляпников Ю.М., Афанасьев В.Н., Афанасьева Г.В., Гаврюшкин А.В., Белецкий И.П. Исследование качества аминокислот-модифицированных подложек, используемых для гибридизационного анализа. Биоорганическая химия. 2007; 33(2):261–8.
5. Goding J.W. Conjugation of antibodies with fluorochrome: modifications to the standard methods. J. Immunol. Meth. 1976; 13:215–26.
6. Grant I.R., Ball H.J., Rowe M.T. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from milk by immunomagnetic separation. Appl. Environ. Microbiol. 1998; 64(9):3153–8.
7. Hofmann K., Finn F.M., Kiso Y. Avidin-biotin affinity columns. General methods for attaching biotin to peptides and proteins. J. Amer. Chem. Soc. 1978; 100(11):3585–90.
8. Khlebnikov V.S., Vetchinin S.S., Tochtamycheva N.V., Golovljov I.R., Grechko G.K., Kulevatsky D.P. et al. Preventive of monoclonal antibodies specific to LPS *Francisella tularensis* and lo-

calisation of antigenic determinant. 11th Meeting Europ. Federat. Immunol. Soc. Abstracts. Finland; 1991. P. 23–4.

9. Lvov Y., Mohwald H., Dekker M., editors. Protein architecture: interfacing molecular assemblies and immobilization biotechnology. New York; 2000. P. 125–67.
10. Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. IEEE Trans. Magn. 1981; 2:1247–8.
11. Petrov A.I., Gavryushkin A.V., Sukhorukov G.B. Effect of temperature, pH and shell thickness on the rate of Mg^{2+} and Ox^{2-} release from multilayered polyelectrolyte shells deposited onto microcrystals of magnesium oxalate. J. Phys. Chem. B. 2003; 107:868–75.
12. Pyle B.H., Broadaway S.C., McFeters G.A. Sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food and water by immunomagnetic separation and solid-phase laser cytometry. Appl. Environ. Microbiol. 1999; 65(5):1966–72.
13. Wilson M.B., Nakane P.P. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies, in immunofluorescence and related staining techniques. In: Knapp W., Holubar K., Wick G., editors. Immunofluorescence and Related Staining Techniques. Elsevier/North Holland Biomedical, Amsterdam; 1978. P. 215–24.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Belyi V.A., Pinchuk L.S. [Introduction to the Material Engineering of Sealing Systems]. Minsk: Nauka i Tekhnika; 1980. 169 p.
2. Egorov A.M., Osipov A.P., Dzantiev B.B., Gavrilova E.M. [Theory and practice of enzyme-linked immunoassay]. M.: Vys. Shkola; 1991. 288 p.
3. Khlebnikov V.S., Golovlev I.R., Tochtamycheva N.V., Averb S.F., Kulevatsky D.P., Averina A.A. et al. [Epitope detection of the preventive monoclonal antibodies, specific for *Francisella tularensis* lipopolysaccharide]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1993; 1:83–8.
4. Shlyapnikova E.A., Shlyapnikov Yu.M., Afanas'ev V.N., Afanas'eva G.V., Gavryushkin A.V., Beletsky I.P. [Examination of the quality of amino-modified bases, used for the hybridization analysis]. Bioorganic Chemistry. 2007; 33(2):261–8.

Authors:

Vetchinin S.S., Kopylov P.Kh., Kiseleva N.V., Nikolaeva O.G., Gavryushkin A.V. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

Об авторах:

Ветчинин С.С., Копылов П.Х., Киселева Н.В., Николаева О.Г., Гаврюшкин А.В. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Оболенск, Московская обл. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 27.07.10.

**А.Б.Мазрухо, Д.И.Каминский, Ю.М.Ломов, Н.Р.Телесманич, К.К.Рожков, В.Д.Кругликов,
Е.В.Гончаренко, А.В.Тришина, Ю.М.Пухов, В.И.Прометной, Н.Л.Пичурина**

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НОВОГО КОМПЛЕКСА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ХОЛЕРЫ В ХОДЕ ТАКТИКО-СПЕЦИАЛЬНОГО УЧЕНИЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКОЙ БРИГАДЫ

Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт, Ростов-на-Дону

Проведена апробация нового комплекса питательных сред для диагностики холеры на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей в ходе опытно-исследовательского тактико-специального учения (ТСУ) специализированной противэпидемической бригады (СПЭБ). Показано, что разработанный комплекс превосходит по эффективности используемые в практике аналоги, а входящие в его состав среды являются перспективными для включения в мобилизационный резерв СПЭБ.

Ключевые слова: питательные среды, холера, холерный вибрион, лабораторная диагностика, специализированная противэпидемическая бригада, чрезвычайные ситуации.

**A.B.Mazrukho, D.I.Kaminsky, Yu.M.Lomov, N.R.Telesmanich, K.K.Rozhkov, V.D.Kruglikov,
E.V.Goncharenko, A.V.Trishina, Yu.M.Pukhov, V.I.Prometnoy, N.L.Pichurina**

Results of Application of the New Nutrient Media Set for Cholera Diagnostics within the Frames of the Special Tactical Training Exercises for Specialized Anti-Epidemic Team

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

Carried out is approbation of the new nutrient media set for cholera diagnostics on the basis of bakers' yeast pancreatic digest within the frames of the special tactical training exercises for specialized anti-epidemic team (SAET). It is demonstrated that the developed nutrient media set compare favourably with its analogues, commonly used for practical procedures; and its constituent media have a potential to be included into the SAET mobilization reserve.

Key words: nutrient media, cholera, cholera vibrio, laboratory diagnostics, specialized anti-epidemic team (SAET), emergency situations.

Одной из приоритетных задач специализированной противэпидемической бригады (СПЭБ) в зоне чрезвычайной ситуации (ЧС), обусловленной или осложненной возникновением очага холеры, является проведение большого объема исследований материала от людей (больных, контактных, декретированных контингентов населения) и из объектов окружающей среды (прежде всего, воды и продуктов питания). Возможности лабораторной базы модернизированной СПЭБ, развертываемой в модулях на основе автошасси [1] и пневмокаркасных систем [8], позволяют исследовать до 500 проб (3000 анализов) в сутки. Бактериологический метод исследований, направленный на выделение и идентификацию штаммов холерного вибриона, в настоящее время остается одним из ведущих методов лабораторной диагностики холеры. Для обеспечения работы лабораторий СПЭБ с использованием бактериологического метода в очаге холеры ежедневно требуются питательные среды 16 наименований в общем количестве до 158 л [3]. Изготовление такого объема сред высокого качества в автономных условиях требует, с одной стороны, современных мобильных и производительных технических систем варки и розлива, с другой – наличия недорогой питательной основы (белкового гидролизата), которая была бы единой для всего ассортимента сред культивирования, выделения и идентификации холерного вибриона, используемых бригадой.

С 1999 г. в Ростовском-на-Дону научно-исследовательском противочумном институте ведется разработка питательных сред для диагностики опасных инфекционных болезней на основе белкового гидролизата, представляющего собой панкреатический перевар пекарских дрожжей. К настоящему времени способ получения указанного белкового гидролизата, а также две питательные среды на его основе защищены патентами на изобретения [5, 6, 10].

В рамках данного направления был создан комплекс питательных сред для культивирования, выделения и идентификации холерного вибриона, который успешно прошел лабораторные испытания с использованием коллекционных и свежевыделенных штаммов *Vibrio cholerae*, а также апробацию на базе бактериологических лабораторий ФГУЗ «Северо-Кавказская противочумная станция» Роспотребнадзора, МЛПУЗ Горбольница № 1 им. Н.А.Семашко (Ростов-на-Дону), лаборатории особо опасных инфекций ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области». Ранее нами показаны преимущества сред разработанного комплекса перед используемыми в практике коммерческими аналогами в ходе многолетнего мониторинга воды поверхностных водоемов и стоков на наличие холерного вибриона [2, 4]. Результаты мониторинга свидетельствуют, что использование сконструированных питательных сред уже на этапе их лаборатор-

ных испытаний способствовало реальному обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия на территории Ростовской области.

Целью работы явилась апробация созданного комплекса питательных сред для диагностики холеры в ходе тактико-специального учения (ТСУ) на тему: «Выдвижение, развертывание и организация работы СПЭБ на базе мобильного комплекса (МК СПЭБ) в автономных условиях по индикации и идентификации холерных вибрионов».

Материалы и методы

В настоящем исследовании были использованы разработанные в Ростовском-на-Дону научно-исследовательском противочумном институте питательные среды для диагностики холеры на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей, входящие в состав нового комплекса:

1. *ХДС (холерная дрожжевая среда) – агар* – агаризованная питательная среда для культивирования и выделения холерного вибриона следующего состава: панкреатический перевар пекарских дрожжей – 0,05 % (по аминному азоту); натрий хлористый – 4,0 г; натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный – 6,0 г; агар-агар микробиологический – 12,0 г; вода дистиллированная – до 1,0 л; pH готовой среды – $7,8 \pm 0,2$.

2. *ХДС-Н (холерная дрожжевая среда накопительная)* – жидкая накопительная питательная среда для культивирования и выделения холерного вибриона следующего состава (из расчета на 1,0 л концентрированной среды): панкреатический перевар пекарских дрожжей – 0,2 % (по аминному азоту); натрий хлористый – 50,0 г; калий азотнокислый – 1,0 г; натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный – 5,0 г; pH готовой среды – $8,2 \pm 0,2$.

3. *ХДС-РГ (холерная дрожжевая среда для определения расщепления глюкозы)* – полужидкая питательная среда для идентификации холерного вибриона по признаку расщепления глюкозы в аэробных и анаэробных условиях следующего состава: панкреатический перевар пекарских дрожжей – 0,013 % (по аминному азоту); натрий хлористый – 5,0 г; калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный – 0,4 г; Д-глюкоза кристаллическая – 10,0 г; бромтимоловый синий водорастворимый – 0,03 г (или 1 % водный раствор – 3 мл); агар-агар бактериологический – 3,0 г; вода дистиллированная – до 1,0 л; pH готовой среды – $7,8 \pm 0,2$.

4. *ХДС-ОДДА (холерная дрожжевая среда для определения декарбоксилаз и дегидролаз аминокислот)* – жидкая питательная среда для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации аминокислот следующего состава: панкреатический перевар пекарских дрожжей – 0,013 % (по аминному азоту); натрий хлористый – 5,0 г; Д-глюкоза кристаллическая – 1,0 г; вода дистиллированная – 1,0 л; бромкрезоловый пурпурный (1,6 % спиртовый рас-

твор) – 0,6 мл; крезоловый красный (0,1 % спиртовый раствор) – 5,0 мл; L-аминокислота – 10,0 г (варианты с аргинином, лизином, орнитином и контрольный вариант – без аминокислоты); pH готовой среды – $6,45 \pm 0,05$.

5. *ХДС-ПУДА (холерная дрожжевая среда полиуглеводная дифференциальная агаризованная)* – глюкозо-лактозная агаризованная дифференциальная питательная среда для первичной идентификации холерного вибриона следующего состава: панкреатический перевар пекарских дрожжей – 0,06 % (по аминному азоту); натрий хлористый – 5,0 г; натрий сернистокислый безводный – 0,4 г; натрия тиосульфат – 0,16 г; железо (II) сернокислое 7-водное – 0,5 г; Д-глюкоза кристаллическая – 1,0 г; α-Д-лактоза 1-водная – 10,0 г; феноловый красный (0,2 % раствор в 50 % этиловом спирте) – 12,0 мл; агар-агар бактериологический – 11,0 г; вода дистиллированная – до 1,0 л; pH готовой среды – $7,8 \pm 0,2$.

Данные опытные среды были изготовлены в ходе ТСУ в мобильной лаборатории на базе тягача КАМАЗ 43118 «Блок поддержки бактериологических исследований» с использованием следующего технологического оборудования: автоматической мобильной средоварки Master Clave 528 (производительностью 28 л готовой среды за один цикл), модуля для стерильного розлива сред APS 320/90, штатного автоклава данной мобильной лаборатории HVE-50.

Контрольными средами служили агар щелочной сухой, пептон основной сухой, среда Клиглера сухая производства ФГУП НПО «Микроген», питательные среды для определения декарбоксилаз орнитина и лизина сухие производства ООО «БиоКомпас-С», приготовленные по инструкциям производителей. В качестве контрольных были также использованы среды лабораторного изготовления: Мёллера и Хью-Лейфсона. Все контрольные среды были предварительно протестированы по основным биологическим показателям на соответствие требованиям МУ 3.3.2.2124-06 и МУК 4.2.2316-08.

Результаты и обсуждение

При подготовке тактико-специального учения СПЭБ, проведенного в период с 26 по 30 июля 2010 года специалистами института была разработана оригинальная легенда, согласно которой имел место занос холеры в город N гражданкой X., прибывшей из Индии, где она находилась в командировке. Был введен в действие режим ЧС, реализованы схемы оповещения и сбора личного состава СПЭБ и осуществлена мобилизация бригады с целью проведения мероприятий по локализации и ликвидации возникшей вспышки холеры. В ТСУ приняли участие 46 членов СПЭБ и сотрудников института, задействованы восемь единиц автотранспорта, в том числе четыре мобильные лаборатории на базе шасси автомобиля КАМАЗ 43118 и прицепа СЗАП 8305: «Индикационная лаборатория», «Бактериологическая лаборатория», «Блок

поддержки бактериологических исследований» и «Универсальный штабной жилой модуль». После совершения марша и прибытия колонны в пункт дислокации полевого лагеря СПЭБ было проведено развертывание подразделений бригады на базе указанных мобильных лабораторий для работы в автономном режиме. Электроснабжение полевого лагеря СПЭБ осуществлялось с помощью четырех штатных дизельных электрогенераторов мощностью от 9,0 до 12,0 кВт/ч. Вода для обеспечения функционирования мобильных лабораторий и хозяйственно-бытовых нужд была резервирована во встроенных емкостях каждого модуля, заполненных через быстроразъемные соединения.

Личным составом СПЭБ согласно требованиям СП 3.1.1.2521-09 [9] проведено обследование эпидемического очага, разработан оперативный план противоэпидемических мероприятий. Сотрудниками бригады организовано выявление и контроль исполнения медицинского наблюдения за 30 лицами, контактировавшими с больными и вибрионосителями, отбор точечных проб из сети пунктов отбора проб воды на территории города N.

Исследование 20 поступивших учебных проб, в том числе 10 проб из реальных объектов окружающей среды (вода поверхностных водоемов и стоков) и 10 проб (семь из которых были искусственно загрязнены токсигенным штаммом *V. cholerae eltor* 5879 до конечной концентрации в пробе от 10^3 до 10^7 м.к./мл), имитирующих, согласно легенде, клинический материал от больных, вибрионосителей и лиц, контактировавших с ними, осуществляли в соответствии с требованиями МУК 4.2.2218-07 с использованием всех современных методов, рекомендованных практическим руководством по лабораторной диагностике опасных инфекционных болезней [7]. Посев материала с целью биологического обогащения и последующего выделения штаммов *V. cholerae* проводили параллельно на опытные (ХДС-Н и ХДС-агар) и контрольные (основной пептон, 1 % пептонная вода и щелочной агар) питательные среды. Идентификацию подозрительных колоний и выделенных культур проводили также параллельно с использованием опытных (ХДС-ПУДА, ХДС-РГ, ХДС-ОДДА) и контрольных (агар Клиглера, среда Хью-Лейфсона, среда Мёллера, коммерческие среды для определения декарбоксилаз аминокислот) дифференциально-диагностических сред.

Исследование поступивших в ходе ТСУ учебных проб проведено на базе мобильных лабораторий СПЭБ «Индикационная лаборатория» и «Бактериологическая лаборатория». Использование разработанного на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей комплекса питательных сред для диагностики холеры позволило выделить и идентифицировать семь токсигенных штаммов *V. cholerae eltor* из 10 проб, имитирующих клинический материал от больных, вибрионосителей и контактных, а также один атоксигенный штамм *V. cholerae eltor* из

10 проб реальных объектов окружающей среды. При параллельном применении контрольных сред из проб, имитирующих клинический материал, были изолированы и идентифицированы как *V. cholerae eltor* (токсигенные) только пять штаммов, а в пробах объектов окружающей среды холерный вибрион не обнаружен.

На средах разработанного комплекса холерный вибрион был выделен из всех семи искусственно загрязненных штаммом *V. cholerae eltor* 5879 проб (с конечной концентрацией данного микроорганизма 10^3 , 10^5 и 10^7 м.к./мл), в то время как с помощью контрольного комплекса сред возбудитель холеры был изолирован только из проб, содержащих указанный штамм *V. cholerae* в концентрациях 10^5 и 10^7 м.к./мл. Этот факт свидетельствует о более высокой чувствительности опытных сред ХДС-Н и ХДС-агара по сравнению с контрольными средами аналогичного назначения (основным пептоном, приготовленной из него 1 % пептонной водой и щелочным агаром).

Выделение в ходе ТСУ атоксигенного штамма *V. cholerae eltor* из реальной пробы воды открытого водоема только с помощью сред разработанного комплекса подтверждает полученные ранее в результате многолетнего мониторинга водных объектов данные [3] о преимуществе этих сред перед используемыми в микробиологической практике.

Применение входящих в состав разработанного комплекса цветных дифференциально-диагностических питательных сред на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей (ХДС-РГ, ХДС-ОДДА, ХДС-ПУДА) для идентификации изолированных в процессе настоящего ТСУ штаммов холерного вибриона показало, что по дифференцирующим свойствам и срокам ферментации углеводов и аминокислот данные питательные среды не отличались от аналогичных контрольных сред (Хью-Лейфсона, Клиглера, Мёллера, коммерческих сред для определения декарбоксилаз аминокислот), но при этом характеризовались более низкой себестоимостью и единой универсальной питательной основой.

Результаты диагностических исследований с использованием комплекса разработанных на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей питательных сред в развернутых мобильных лабораториях позволили своевременно дать адекватную оценку сложившейся ситуации по заносу холеры на территорию города N и откорректировать оперативный план противоэпидемических мероприятий, направленных на локализацию и ликвидацию эпидемического очага.

Таким образом, тематические тактико-специальные учения СПЭБ позволяют не только дать практические навыки работы в условиях различных ЧС личному составу бригад, но и провести апробацию новых диагностических препаратов, в том числе питательных сред. Разработанный на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей новый комплекс питательных сред для диагностики холеры

превосходит по эффективности применения используемый в микробиологической практике традиционный комплекс сред аналогичного назначения. Среды предлагаемого комплекса являются перспективными для включения в мобилизационный резерв СПЭБ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Казакова Е.С., Карнаухов И.Г., Шарова И.Н., Касьян И.А., Осина Н.А., Портенко С.А. и др. Организация мобильного комплекса специализированной противоэпидемической бригады противочумного института. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2010; 2:24–7.
2. Каминский Д.И., Мазрухо А.Б., Ломов Ю.М., Рожков К.К., Криваченко К.Б., Овсова Л.М. и др. Оценка жидкой накопительной среды ХДС-Н для культивирования и выделения холерного вибриона. Биотехнология. 2003; 4:70–4.
3. Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Ломов Ю.М., Телесманич Н.Р., Рожков К.К., Алутин И.М. и др. Алгоритм и тактика обеспечения питательными средами специализированных противоэпидемических бригад Роспотребнадзора при работе в очаге холеры. Здоровье населения и среда обитания. 2009; 11:8–16.
4. Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Телесманич Н.Р. Использование новых питательных сред на этапах подготовки сотрудников специализированных противоэпидемических бригад к работе в зонах чрезвычайных ситуаций. Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2010; 3:75–80.
5. Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Рожков К.К., Алутин И.М. Способ получения белкового гидролизата. Патент РФ 2375441, опубл. 10.12.2009. Бюл. № 34.
6. Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Рожков К.К., Алутин И.М. Среда обогащения для выделения холерного вибриона Патент РФ 2392310, опубл. 20.06.2010. Бюл. № 17.
7. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: Медицина, ЗАО «Шико»; 2009. С. 61–99.
8. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. СПЭБ. Саратов: ОАО «Приволжское издательство»; 2008. С. 10, 12–14, 79–82.
9. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации: СП 3.1.1.2521-09. М.; 2010.
10. Черепяхина И.Я., Фецайлова О.П., Балахнова В.В. и др. Способ определения зараженности продовольствия патогенными биологическими агентами в условиях чрезвычайных ситуаций. Патент РФ 230656, опубл. 27.03.2009. Бюл. № 9.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Kazakova E.S., Karnaykhov I.G., Sharova I.N., Kas'yan I.A., Osina N.A., Portenko S.A., et al. [Organization of laboratory mobile complex of specialized anti-epidemic team of institute for plague control]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2010; 2:24–7.
2. Kaminsky D.I., Mazrukho A.B., Lomov Yu.M., Rozhkov K.K., Krivachenko K.B., Ovsova L.M., et al. [Assessment of the liquid accumulative medium KHDS-N for cholera vibrio cultivation and isolation]. Biotechnology. 2003; 4:70–4.
3. Mazrukho A.B., Kaminsky D.I., Lomov Yu.M., Telesmanich N.R., Rozhkov K.K., Alutin I.M., et al. [Algorithm and tactics of provision with nutrient media, designed for the Rospotrebnadzor specialized anti-epidemic teams for their work in cholera foci]. Zd. Nas. Sreda Obit. 2009; 11:8–16.
4. Mazrukho A.B., Kaminsky D.I., Telesmanich N.R. [Application of the new nutrient media at the stage of SAET members training for operations in emergency zones]. Med.-Biol. Sots.-Psikhol. Probl. Bezop. v Chrezvych. Sit. 2010; 3:75–80.
5. Mazrukho A.B., Kaminsky D.I., Rozhkov K.K., Alutin I.M. [Method of protein hydrolyzate obtainment]. RF Patent 2375441. 10 Dec 2009.
6. Mazrukho A.B., Kaminsky D.I., Rozhkov K.K., Alutin I.M. [Enrichment Medium for Cholera Vibrio Isolation]. RF Patent 2392310. 29 Jun 2010.
7. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory diagnostics of particularly dangerous infectious diseases. Guidelines]. Moscow: Meditsina, ZAO "Shiko"; 2009. P. 61–99.
8. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [SAET]. Saratov: OAO "Privolzh. Izd."; 2008. PP. 10, 12–14, 79–82.
9. [Cholera Prophylaxis. General Requirements for Cholera Epidemiological Surveillance Procedures in the Territory of the Russian Federation: SR 3.1.1.2521-09]. Moscow; 2010.
10. Cherepakina I.Ya., Fetseylova O.P., Balakhnova V.V. et al. [Detection Method of the Infection Rate in Foods, Exposed to Pathogenic Biological Agents in Emergency Situations]. RF Patent 2350656. 27 Mar 2009.

Authors:

Mazrukho A.B., Kaminsky D.I., Lomov Yu.M., Telesmanich N.R., Rozhkov K.K., Alutin I.M., Goncharenko E.V., Trishina A.V., Pukhov Yu.M., Prometnoy V.I., Pichurina N.L. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. M.Gor'kogo St., 117/40, Rostov-on-Don, 344002, Russia. E-mail: plague@aaanet.ru

Об авторах:

Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Ломов Ю.М., Телесманич Н.Р., Рожков К.К., Алутин И.М., Гончаренко Е.В., Тришина А.В., Пухов Ю.М., Прометной В.И., Пичурина Н.Л. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru

Поступила 17.05.11.

А.Н.Малахаева¹, Л.В.Саяпина¹, И.С.Барулина¹, И.В.Касина¹, А.С.Абдрашитова¹, Н.А.Осина²,
И.Н.Шарова², С.Б.Яцышина³, Н.В.Майоров², Л.В.Зайцева², Н.П.Миронова²

ОЦЕНКА НОВОГО НАБОРА РЕАГЕНТОВ «АМПЛИСЕНС® *BRUCELLA SPP.-FL*» С ГИБРИДИЗАЦИОННО-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

¹Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля
медицинских биологических препаратов имени Л.А.Тарасевича, Москва;

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

³Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Москва

В ФГУН «ЦНИИЭ» и ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» разработан набор реагентов для выявления ДНК бактерий *Brucella spp.* в биологическом материале и культурах микроорганизмов методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов. В медицинских испытаниях в ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича изучена диагностическая ценность набора реагентов «АмплиСенс® *Brucella spp.-FL*», который выпускается в двух вариантах в зависимости от способа учета результатов (FRT – в режиме «реального времени» и FEP – по «конечной точке»). На основании полученных результатов установлена высокая диагностическая ценность набора реагентов «АмплиСенс® *Brucella spp.-FL*». Набор зарегистрирован в качестве изделия медицинского назначения.

Ключевые слова: бруцеллез, *Brucella spp.*, ПЦР, гибридационно-флуоресцентный учет результатов, специфическая активность, специфичность, воспроизводимость.

A.N.Malakhaeva¹, L.V.Sayapina¹, I.S.Barulina¹, I.V.Kasina¹, A.S.Abdrashitova¹, N.A.Osina², I.N.Sharova²,
S.B.Yatsyshina³, N.V.Mayorov², L.V.Zaytseva², N.P.Mironova²

Assessment of the New Set of Reagents “AmpliSens® *BRUCELLA SPP.-FL*” with Hybridization-Fluorescent Detection

¹L.A.Tarasevich State Research Institute for Standardization and Control of Medical Biological Preparations, Moscow;

²Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov; ³Central Research Institute of Epidemiology, Moscow

At CRIE, Moscow and RRAPI “Microbe” designed is the set of reagents for detection of *Brucella spp.* DNA in biological materials and cultures of microorganisms by means of PCR with hybridization-fluorescent registration of the results. This reagent set, “AmpliSens® *Brucella spp.-FL*”, is supplied in two modifications versus the mechanism of the results registration (FRT – real time and FEP – end-point). High diagnostic value of the reagent set is determined in medical trials at L.A. Tarasevich Institute. The set is registered as medical device.

Key words: brucellosis, *Brucella spp.*, PCR, hybridization-fluorescent registration of the results, specific activity, specificity, reproducibility.

До настоящего времени бруцеллез остается одним из зоонозов, причиняющих значительный экономический и социальный ущерб [3]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), заболевания бруцеллезом регистрируются среди населения 73 стран мира [4]. В Европе более всего бруцеллезом поражено население стран Средиземноморья, однако ряд стран полностью свободен от этой инфекции (Дания и др.). В России наиболее неблагополучны в отношении бруцеллеза среди людей являются регионы с развитым овцеводством (Тыва, Северный Кавказ и Южное Поволжье) [1]. В мире также отмечается неравномерность распространения бруцеллеза как среди животных, так и среди людей. Высока заболеваемость в странах Америки, Латинской Америки, в Казахстане, Средней Азии. В начале 90-х годов прошлого столетия произошло ухудшение эпизоотической ситуации по бруцеллезу, связанное с крупными закупками овцепоголовья без соблюдения карантинных мероприятий в хозяйствах, неблагополучных по бруцеллезу. В последние годы заболеваемость бру-

целлезом не снижается, что является следствием ослабления внимания к этой проблеме.

Человек заражается бруцеллезом в основном от мелкого и крупного рогатого скота, свиней, редко – от северных оленей. В 60 % случаев источником заболевания людей бруцеллезом служит мелкий рогатый скот, вследствие облигатной патогенности для человека *B. melitensis*. В системе эпидемиологического надзора за бруцеллезом основная роль отводится лабораторной диагностике. В соответствии с Методическими указаниями (МУ 3.1.7.1189-03) «Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей» при исследовании биологического материала, продуктов питания и объектов внешней среды на зараженность возбудителем бруцеллеза используют бактериологический анализ и комплекс серологических реакций, основанных на выявлении специфических антител (реакции агглютинации Хеддлсона и Райта, Кумбса, связывания комплекмента, непрямой гемагглютинации, иммуноферментный анализ). Бактериологический метод лабораторной диагностики бруцеллеза считается самым достовер-

ным, однако он требует длительного времени.

В настоящее время для индикации бруцеллеза используется «Тест-система для выявления ДНК *Brucella spp.* методом ПЦР (ГенБру)», производства РосНИПЧИ «Микроб», основанная на амплификации фрагмента гена, кодирующего белок внешней мембраны бруцелл 31 кДа. Для учета результатов предусмотрено использование метода электрофореза в агарозном геле. При практическом использовании тест-системы выявлен ряд таких недостатков, как трудоемкость и длительность проведения анализа из-за двустадийности постановки ПЦР, отсутствие системы внутреннего контроля, что способствует возможности появления ложноотрицательных результатов.

В связи с вышеизложенным, специалисты ФГУН ЦНИИ эпидемиологии и ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» разработали набор реагентов для выявления ДНК бактерий *Brucella spp.* в биологическом материале и культурах микроорганизмов методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов, в основе которого лежит амплификация фрагмента *wbo A* гена бруцелл с регистрацией реакции по накоплению в пробирке флуоресцентного сигнала. С целью предотвращения получения ложноотрицательных результатов в тест-систему введен внутренний контрольный образец (ВКО), амплификация которого осуществляется одновременно с исследуемыми пробами. Использование такого контроля обеспечивает возможность учета эффективности проведения всех этапов ПЦР-анализа: выделение ДНК, постановка ПЦР, учет результатов, что в значительной степени повышает точность генодиагностических исследований.

Набор «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL» выпускается в двух вариантах: первый – «ПЦР-комплект» вариант FRT, предназначенный для ПЦР-амплификации ДНК микроорганизмов рода *Brucella spp.* с детекцией в режиме «реального времени», второй – «ПЦР-комплект» вариант FER, используемый для ПЦР-амплификации ДНК микроорганизмов рода *Brucella spp.* с детекцией по «конечной точке». Для выделения ДНК используется набор реагентов «ДНК-сорб-В» вариант 50. ПЦР-анализ в режиме «реального времени» осуществляли в амплификаторе с системой детекции флуоресцентного сигнала «Rotor-Gene 3000». Для проведения ПЦР-анализа с детекцией результатов по «конечной точке» использовали амплификатор «Терцик» и флуоресцентный ПЦР-детектор «АЛА».

Материалом для исследования служили чистые культуры 42 штаммов *B. abortus*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae*, *B. rangiferi*, *Y. pestis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *F. tularensis*, а также биологический материал от человека (кровь, сыворотка крови) и животных (плазма, молоко, паренхиматозные органы и лимфоузлы), искусственно инфицированный *B. melitensis*, *B. abortus* и *B. suis* в концентрациях $1 \cdot 10^3$ и $1 \cdot 10^4$ м.к./мл. Обеззараживание проб проводили в соответствии с МУ 1.3.2569-09

«Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Препаратом сравнения служила коммерческая тест-система для выявления ДНК *Brucella spp.* методом ПЦР (ГенБру) (ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб») в период срока годности, прошедшая контроль в специализированной лаборатории ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича.

Испытания проводили с соблюдением принципов строго контролируемого эксперимента. Испытуемые пробы для ПЦР были зашифрованы сотрудниками, не принимающими участия в постановке ПЦР и учете результатов.

В ходе проведенных испытаний с помощью набора реагентов с детекцией результатов в режиме «реального времени» (вариант FRT) чистые культуры *Brucella spp.* выявлены в концентрациях $1 \cdot 10^2$ м.к./мл – 53,8 %, $1 \cdot 10^3$ м.к./мл – 96,2 %, $1 \cdot 10^4$ м.к./мл – 100 % случаев. Использование набора с детекцией результатов по «конечной точке» (вариант FER) позволило выявить *Brucella spp.* в концентрациях $1 \cdot 10^2$ м.к./мл – 61,5 %, $1 \cdot 10^3$ м.к./мл – 96,2 %, $1 \cdot 10^4$ м.к./мл – 100 %. С помощью тест-системы (ГенБру) процент проб, содержащих *Brucella spp.* в чистых культурах, к числу исследованных штаммов составил 31 – в концентрации $1 \cdot 10^2$ м.к./мл, 85 – в концентрации $1 \cdot 10^3$ м.к./мл и 100 – в концентрации $1 \cdot 10^4$ м.к./мл.

В биологическом материале, содержащем *B. melitensis*, *B. abortus* и *B. suis* в концентрации $1 \cdot 10^3$ м.к./мл, с помощью наборов реагентов «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL» вариантов FRT и FER выявлено 96,5 и 97,4 % проб соответственно, с помощью тест-системы (ГенБру) – 93,5 %.

Для обоих вариантов набора «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL» и тест-системы (ГенБру) установлена 100 % выявляемость проб биологического материала, содержащих бруцеллы в концентрации $1 \cdot 10^4$ м.к./мл.

Специфичность набора «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL» и тест-системы (ГенБру) составила 100 %. Гетерологичные микроорганизмы в концентрации $1 \cdot 10^7$ м.к./мл не выявлены ни в одной пробе.

Воспроизводимость (совпадение результатов исследования положительных и отрицательных проб при 10-кратном повторении) наборов реагентов «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL» и тест-системы (ГенБру) равнялась 100 %.

Преимущество набора реагентов «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL» перед коммерческой тест-системой заключается в снижении риска перекрестной контаминации ампликонами за счет наличия в системе внутреннего контроля, что позволяет сократить возможность регистрации ложноположительных реакций; сокращении времени проведения анализа за счет отсутствия двустадийности ПЦР и этапа постановки электрофореза в агарозном геле. По показателям специфической активности и специфичности оба

Сводные данные о результатах испытания наборов диагностических для выявления ДНК бактерий *Brucella spp.* методом ПЦР

Показатели	АмплиСенс® Brucella-FL		ПЦР «ГенБру», %	Бактериология (высев 100 м.к.)
	Вариант FRT, %	Вариант FER, %		
Чувствительность (% ± m) выявленных положительных проб к числу инфицированных <i>Brucella spp.</i> чистых культур, взятых на исследование				
10 ² м.к./мл	53,8	61,5	31	
10 ³ м.к./мл	96,2	96,2	85	66,5
10 ⁴ м.к./мл	100	100	100	
(% ± m) выявленных положительных проб к числу инфицированных <i>Brucella spp.</i> биологического материала, взятых на исследование				
10 ³ м.к./мл	97,4	96,5	93,5	76,5
10 ⁴ м.к./мл	100	100	100	
Специфичность (% ± m) выявленных гетерологичных микроорганизмов к числу исследованных чистых культур и биологического материала	0	0	0	62

препарата оказались равноценными. Общие данные о диагностической ценности набора «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL» представлены в таблице.

По результатам проведенных медицинских приемочных испытаний было рекомендовано для контроля активности и специфичности внести в технические условия тест-штаммы *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *Y. enterocolitica* и *F. tularensis*. В соответствии со схемой проведения исследования биологического материала и объектов окружающей среды в Инструкции по применению включены разделы «Меры предосторожности», «Взятие и хранение материала на исследование», «Дополнительные материалы и оборудование, требуемые для проведения ПЦР-анализа», «Предварительная обработка материала».

На основании полученных данных набор реагентов «АмплиСенс® *Brucella spp.*-FL» рекомендован к государственной регистрации в Российской Федерации в качестве изделия медицинского назначения. Получено Регистрационное удостоверение № ФСР 2009/04212 от 25.03.2009 г.

Таким образом, разработка принципиально новых и усовершенствование существующих методов лабораторной диагностики бруцеллеза дает возможность поднять диагностику данного заболевания на более высокий уровень. Использование молекулярно-генетических подходов и сочетание их с традиционными лабораторными методами позволит быстро и качественно проводить диагностику заболевания у людей и животных, в максимально короткие сроки выявлять патогенные агенты. Это значительно повысит эффективность лечения, обеспечит своевременное проведение необходимых противоэпидемических мероприятий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Онищенко Г.Г., Монисов А.А., Гульченко Л.П., Федоров Ю.М. Заболеваемость зооантропонозными и природноочаговыми инфекциями и меры по их профилактике. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1999; 4:14–7.
2. Профилактика и борьба с заразными болезнями, общими для человека и животных: Сб. санитарных и ветеринарных правил. М.: Информ. издат. центр Госкомсанэпиднадзора; 1996. 256 с.
3. Черкасский Б.Л., Иванова А.А. Эпидемиологическая ситуация по зоонозам в России. Эпидемиол. и инф. бол. 1996; 2:12–5.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Onishchenko G.G., Monisov A.A., Gul'chenko L.P., Fedorov Yu.M. [Morbidity from natural-focal and zoonanthropotic infections and measures for their prevention]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1999; 4:14–7.
2. [Prophylaxis and Control of Contagious Diseases, Common for Both Humans and Animals: The Digest of Sanitary and Veterinary Regulations]. Moscow: Inform. Izd. Tsentr Goskomsanepidnadzor; 1996. 256 p.
3. Cherkassky B.L., Ivanova A.A. [Epidemiological situation on zoonotic infections in the Russian Federation]. Epidemiol. Inf. Bol. 1996; 2:12–5.

Authors:

Malakhaeva A.N., Sayapina L.V., Barulina I.S., Kasina I.V., Abdrashitova A.S. L.A. Tarasevich State Research Institute for Standardization and Control. Svitsev Vrazhek Lane, 41 Moscow, 119002, Russia. E-mail: gisk@info.ru

Osina N.A., Sharova I.N., Mayorov N.V., Zaytseva L.V., Mironova N.P. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Yatsyshina S.B. Central Research Institute of Epidemiology. Novogireevskaya St., 3a, Moscow, 111123, Russia. E-mail: syatsyshina@pcr.ru

Об авторах:

Малахаева А.Н., Саяпина Л.В., Барулина И.С., Касина И.В., Абдрашитова А.С. Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича, 119002, Москва, пер. Сивцев Вражек, 41, E-mail: gisk@info.ru

Осина Н.А., Шарова И.Н., Майоров Н.В., Зайцева Л.В., Миронова Н.П. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Яцышина С.Б. Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии. 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а. E-mail: syatsyshina@pcr.ru

Поступила 14.09.10.

Т.Н.Орлова, Н.Ф.Василенко, Е.Н.Афанасьев, И.С.Тюменцева, Б.К.Котти, О.В.Малецкая,
Г.К.Исмаилова, Ю.М.Тохов, А.Д.Антоненко, А.Н.Куличенко

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДОВ ИНДИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЛАЙМ-БОРРЕЛИОЗА

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, Ставрополь

На основе кремнезема – алюмосиликата, модифицированного карбоксиметилированным лигнином и карбодиимидом, получены композиционные микрогранулированные магнитные иммуносорбенты (МИС), имеющие высокую адсорбционную активность, характеризующиеся стандартностью структурных характеристик и обладающие механической прочностью. Применение МИС позволяет на этапе подготовки проб иксодовых клещей путем многократных промываний сорбента с фиксированным на нем инфекционным агентом освобождаться от всевозможных примесей, тем самым исключать их отрицательное влияние на проводимый анализ, максимально концентрировать искомый возбудитель, что повышает специфичность и чувствительность ПЦР-анализа.

Ключевые слова: Лайм-боррелиоз, иксодовые клещи, *Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus*, *Borrelia burgdorferi* s.l., полимеразная цепная реакция, магнитный иммуносорбент, индикация.

T.N.Orlova, N.F.Vasilenko, E.N.Afanas'ev, I.S.Tyumentseva, B.K.Kotti, O.V.Maletskaia, G.K.Ismailova,
Yu.M.Tokhov, A.D.Antonenko, A.N.Kulichenko

Improvement of Lyme Borreliosis Agent Indication Methods

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol

On the basis of silica – aluminosilicate, modified by carboxymethylated lignin and carbodiimide, obtained are the composite microgranulated magnetic immunoadsorbents (MIA) with high adsorption activity, which are characterized by the standardized structural characteristics and mechanical strength. Application of MIAs makes it possible, at the stage of tick samples preparation, to eliminate various admixtures via reiterative irrigations of the sorbent with the infectious agent fixed on it. Therefore negative influence of admixtures on the performed analysis is excluded, and the target agent is concentrated to the maximum limit. Thus the specificity and sensitivity of PCR-analysis enhances.

Key words: Lyme Borreliosis, ticks, *Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus*, *Borrelia burgdorferi* s.l., polymerase chain reaction, magnetic immunoadsorbents, indication.

Лайм-боррелиоз или иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) является наиболее распространенной зоонозной природно-очаговой инфекцией, связанной с клещами рода *Ixodes*. Возбудителями Лайм-боррелиоза (ЛБ) являются спирохеты, входящие в комплекс *Borrelia burgdorferi sensu lato* (s.l.). Лайм-боррелиоз широко распространен в Скандинавии и странах центральной Европы [7, 9]. На территории Российской Федерации располагается большая часть мирового ареала ИКБ [1, 3, 6]. Исключением не являются Южный и Северо-Кавказский федеральные округа РФ.

Попытка изучения зараженности иксодовых клещей возбудителем Лайм-боррелиоза на территории Ставропольского края была предпринята в 1996 г. [6]. С тех пор исследования в данном направлении не проводились. Однако многообразие ландшафтно-географических зон, климатические условия, а также широкое распространение и высокая численность иксодовых клещей способствовали возникновению случаев заболеваний ЛБ в данном регионе. В связи с этим актуальной проблемой является разработка и совершенствование экспрессных методов индикации возбудителя ЛБ с целью повышения их чувствительности и специфичности.

Цель исследования – разработка магнитного иммунного сорбента для индикации возбудителя Лайм-

боррелиоза в полевом материале методом ПЦР.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили иксодовые клещи, сбор которых осуществляли с апреля по ноябрь в 2006–2008 гг., в период их активного паразитирования, на стандартный флаг по общепринятой методике. Исследовали как единичных клещей, так и пулы, состоящие не более чем из 15 особей. При формировании пулов учитывали фазу развития клеща, место сбора, вид хозяина (в случае, если клещи сняты с животного).

Исследование суспензий клещей осуществляли с помощью тест-системы «Ампли-Сенс ®*Borrelia burgdorferi sensu lato* для выявления 16S рНК *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*) в биологическом материале». Подготовку проб и анализ проводили согласно инструкции по применению. Параллельно исследовали эти пробы методом ПЦР после предварительного селективного концентрирования на магнитных иммунных сорбентах.

В качестве матриц при производстве магносорбентов (МС) использовали природный отечественный алюмосиликат, магнетит, карбоксиметилированный лигнин. МС с высокой сорбционной

активностью синтезировали методом формирования пористой структуры носителя в присутствии органических полимеров [2].

Биологическим сырьем при конструировании магнитного иммуносорбента служили иммунные сыворотки крови доноров с высокими титрами специфических антител к возбудителю ЛБ. Антитела к возбудителю ЛБ в сыворотках крови доноров выявляли методом ИФА с использованием тест-системы «ЛаймБест» ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск), представляющей собой набор, основой которого являются рекомбинантные антигены *Borrelia burgdorferi s.l.*, иммобилизованные на поверхности лунок полистиролового планшета. Иммуноглобулины класса G выделяли методом фракционирования белков полиэтиленгликолем (ПЭГ) – 6000 [10].

Математическую обработку результатов экспериментов проводили на компьютере в программе MS Office Excel XP.

Результаты и обсуждение

Видовой состав иксодидов, вызывающих ЛБ на территории Евразии, в наших сборах был представлен видом *I. ricinus*. Наряду с этим видом, исследовали иксодовых клещей, характерных для лесостепной и предгорной ландшафтных зон: *Dermacentor marginatus*, *D. reticulatus*, *Haemaphysalis punctata*, *Rhipicephalus rossicus*.

В течение 2006–2008 гг. на территории Ставропольского края методом ОТ-ПЦР выявлены 30 положительных проб иксодовых клещей из 252 исследованных на наличие возбудителя ЛБ, что составило $(11,9 \pm 1,6) \%$ от общего количества исследованных пулов. Наиболее высокая зараженность установлена в 2008 г. – 4,85 %, что в 15,2 раза выше, чем в 2006 г. и в 69 раз больше по сравнению с 2007 г. Установлена высокая зараженность лесного клеща *I. ricinus* возбудителем ЛБ – $(10,7 \pm 1,8) \%$, при этом имаго составили 88,9 %, нимфы – 11,1 %. Кроме того, специфическая рРНК впервые выявлена у клеща *D. marginatus* – $(1,2 \pm 0,4) \%$, который широко распространен на территории Ставропольского края, что указывает на вовлечение в эпизоотический процесс других видов иксодовых клещей.

ПЦР-диагностика иксодовых клещевых боррелиозов до настоящего времени находится в стадии разработки. Главной проблемой при этом является большое количество ложноотрицательных результатов, часто ничтожно малое количество боррелий в исследуемом материале, что недостаточно для надежной индикации методом ПЦР [5, 8]. Кроме того, трудной задачей представляется обработка проб внешней среды, так как в этом случае необходимо использовать особые методические приемы, позволяющие избавиться от посторонних примесей, способных значительно снизить чувствительность ПЦР, и максимально сконцентрировать искомую ДНК (рНК).

Для устранения этих недостатков мы объединили два метода: высокоэффективное избирательное концентрирование патогена на магнимоносорбенте с последующей постановкой ОТ-ПЦР.

В качестве основного структурного компонента, формирующего остов композиционной твердофазной матрицы, использован природный отечественный алюмосиликат. Химическое модифицирование сорбента осуществляли в присутствии карбоксиметилированного лигнина и карбодиимида. В качестве магнитного компонента при синтезе применяли магнетит (Fe_3O_4).

Структура композиционного магносорбента представлена корпускулярной системой, которая состоит из частиц кремнезема, покрытых полимером – карбонизированным лигнином, связанных друг с другом в пространственном каркасе. Размер корпускул определяет величину удельной поверхности МС, а плотность их упаковки – объем и радиус пор.

На основе проведенных исследований определены оптимальные условия получения лигнинсодержащего магносорбента: соотношение компонентов синтеза 1,5:1:1, соответственно SiO_2 : Fe_3O_4 : карбоксиметилированный лигнин; время гелеобразования – 2 ч; значение pH гелеобразования – 7,0.

Для придания магносорбенту биоспецифических свойств и получения магнимоносорбента (МИС) на поверхность МС иммобилизовали специфические IgG, выделенные фракционированием ПЭГ-6000 из сывороток крови людей с высокими титрами боррелиозных антител. Исследования показали, что концентрация белка 2 мг/мл является оптимальной для полного насыщения антителами сорбента в объеме

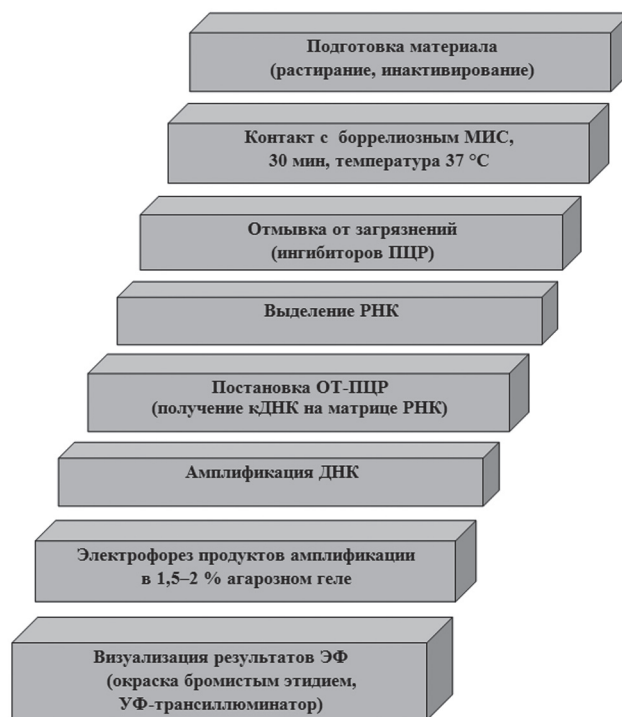


Рис. 1. Схема проведения сочетанного анализа МИС+ОТ-ПЦР для детекции возбудителя Лайм-боррелиоза

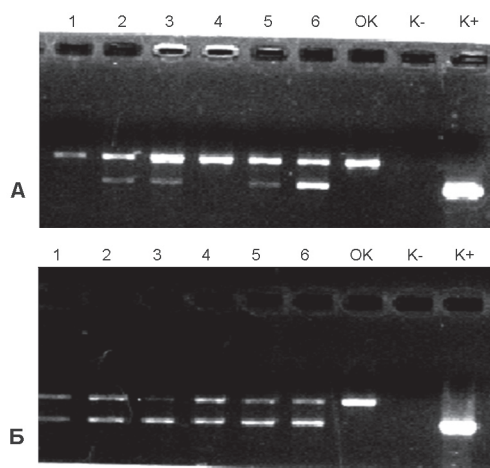


Рис. 2. Результаты выявления рРНК *B. burgdorferi* s.l. методом ОТ-ПЦР до (А) и после (Б) селективного концентрирования проб суспензий клещей на МИС:

А: 1–6 – исследуемые пробы без МИС, ОК – отрицательный контроль выделения, «К-» – контроль отрицательный, «К+» – контроль положительный. Б: 1–6 – те же пробы после концентрирования на МИС, ОК – отрицательный контроль выделения, «К-» – контроль отрицательный, «К+» – контроль положительный

0,2 мл 10 % взвеси.

Установлено, что для полного насыщения магносорбента белком достаточно 2 ч при значении pH раствора 6–7 и температуры от 22 до 37 °C.

Подготовку проб клещей для селективного концентрирования на МИС осуществляли так же, как и для проведения ОТ-ПЦР. Затем в пенициллиновые флаконы вносили 50 мкл 10 % взвеси МИС и весь объем приготовленной суспензии клещей. Инкубировали 30 мин при 37 °C. МИС трижды промывали ФСБ, придерживая постоянным магнитом флаконы с сорбентом, и ресуспендировали в 150 мкл 0,15 М раствора хлорида натрия. Полученную суспензию использовали для выявления рРНК. Далее все манипуляции проводили, строго следуя указаниям по применению тест-системы. Схема проведения сочетанного анализа МИС+ОТ-ПЦР представлена на рис. 1.

Сочетанным методом МИС+ОТ-ПЦР рРНК выявлена в 56 пробах – (22,2±2,9) %, из них *I. ricinus* – 51 пул, *D. marginatus* 5 пулов, что позволило подтвердить наличие рРНК возбудителя ЛБ в 30 пробах суспензий клещей и дополнительно выявить 26 положительных проб. Применение МИС позволило повысить число положительных находок в 1,9 раза. Результаты выявления рРНК *B. burgdorferi* s.l. методом МИС+ОТ-ПЦР представлены на рис. 2.

Таким образом, на основе кремнезема – алюмосиликата, модифицированного карбоксиметилированным лигнином и карбодиимидом, получены магнитные иммуносорбенты, применение которых позволяет на этапе подготовки проб путем многократных промываний сорбента с фиксированным на нем инфекционным агентом освободиться от всевозможных приме-

сей, тем самым исключать их отрицательное влияние на проводимый анализ, максимально концентрировать искомый возбудитель, что повышает специфичность и чувствительность ПЦР-анализа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аleshkovskaya E.C., Blagov N.A., Druzhinina T.A., Shalepo E.V. Клешевые микстинфекции (иксодовый клещевой боррелиоз и гранулоцитарный эрлихиоз человека) в Ярославской области. Эпидемиол. и инф. бол. 2008; 2:6–8.
2. Афанасьева Е.Е., Брыкалов А.В., Тюменцева И.С. и др. Способ получения иммуносорбента. Патент РФ 2363732, опубл. 10.08.2009. Бюл. № 22.
3. Коренберг Э.И., Горелова Н.Б., Ковалевский Ю.В. Основные черты природной очаговости иксодовых клещевых боррелиозов в России. Паразитол. 2002; 36(3):177–87.
4. Котти Б.К., Гудиев О.Ю. Иксодовые клещи Ставрополя и его окрестностей. Мед. паразитол. 1997; 4:36–7.
5. Неведова В.В., Коренберг Э.И., Нестеренко Л.Н. и др. Сравнительная оценка результативности индикаций боррелий в иксодовых клещах (Ixodidae) методами темнопольной микроскопии и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Паразитол. 2001; 35(1):3–8.
6. Скачков М.В., Яковлев А.Г., Плотникова О.А. и др. Роль различных видов иксодовых клещей как переносчиков возбудителей клещевого энцефалита и боррелиозов в Оренбургской области. Мед. паразитол. и паразитарн. бол. 2007; 3:27–30.
7. Golde W.T., Robinson-Dunn B., Stobierski M.G., Dykhuizen D., Wang I.N., Carlson V. et al. Culture-confirmed reinfection of a person with different strains of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. J. Clin. Microbiol. 1998; 36(4):1015–9.
8. Goodman J.L., Jurkovich P., Kramber J.M., Johnson R.C. Molecular detection of persistent *Borrelia burgdorferi* in the urine of patients with active Lyme disease. Infect. Immun. 1991; 59(1):269–78.
9. Huppertz H.I., Schmidt H., Karch H. Detection of *Borrelia burgdorferi* by nested polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid and urine of children with neuroborreliosis. Eur. J. Pediatr. 1993; 152(5):414–17.
10. Polson A., Potgieter G.M., Largier J.F., Mears G.E., Joubert F.J. The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight. Biochim. Biophys. Acta. 1964; 82:463–75.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Aleshkovskaya E.S., Blagov N.A., Druzhinina T.A., Shalepo E.V. [Ixodic mixed-infections (Lyme borreliosis, human granulocytic ehrlichiosis) in the Yaroslavl region]. Epid. Infek. Bolezni. 2008; 2:6–8.
2. Afanas'eva E.E., Brykalov A.V., Tyumentseva I.S. et al. [Method of immunoadsorbent preparation]. RF Patent 2363732. 10 Aug 2009.
3. Korenberg E. I., Gorelova N.B., Kovalevsky Yu. V. [Main features of natural focalities of ixodid tick-borne borreliosis in Russia]. Parazitologiya. 2002; 36(3):177–87.
4. Kotti B.K., Gudiev O.Yu. [Ixodid ticks of Stavropol city and its surroundings]. Med. Parazitol. 1997; 4:36–7.
5. Nefedova V.V., Korenberg E.I., Nesterenko L.N. et al. [Comparative evaluation of the efficacy of *Borrelia* indication in ticks (Ixodidae) using dark field microscopy and polymerase chain reaction (PCR)]. Parazitologiya. 2001; 35(1):3–8.
6. Skachkov M.V., Yakovlev A.G., Plotnikova O.A., Mamedova N.M., Nazarenko S.V., Petrishcheva G.V. [Role of various ticks as vectors of the causative agents of tick-borne encephalitis and borrelioses in the Orenburg Region]. Med. Parazitol. Parazit. Bol. 2007; 3:27–30.

Authors:

Orlova T.N., Vasilenko N.F., Afanas'ev E.N., Tyumentseva I.S., Kotti B.K., Maletskaya O.V., Ismailova G.K., Tokhov Yu.M., Antonenko A.D., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. Sovetskaya St., 13–15, Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Об авторах:

Орлова Т.Н., Василенко Н.Ф., Афанасьев Е.Н., Тюменцева И.С., Котти Б.К., Малецкая О.В., Исмаилова Г.К., Тохов Ю.М., Антоненко А.Д., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 19.02.10.

А.О.Семенцова, А.Н.Шиков, В.А.Терновой, А.В.Винокурова, Н.Е.Костина, Е.А.Ставский,
А.П.Агафонов

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСОВ МАРБУРГ, ЭБОЛА И ЛАССА

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово

В работе изложены материалы по разработке и апробации методики для идентификации вирусов Марбург, Эбола и Ласса, основанной на мультиплексной ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени, и для проведения дифференциальной диагностики геморрагических лихорадок, вызванных этими вирусами. Представлены результаты по определению аналитической чувствительности и специфической активности мультиплексной ПЦР.

Ключевые слова: вирусы Марбург, Эбола, Ласса, мультиплексная ПЦР в режиме реального времени.

A.O.Sementsova, A.N.Shikov, V.A.Ternovoy, A.V.Vinokurova, N.E.Kostina, E.A.Stavsky, A.P.Agaonov

Development of the Multiplex Real-Time PCR for Marburg, Ebola, and Lassa Viruses Identification

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo

Presented are the data on the development and approbation of the method of Marburg, Ebola, and Lassa viruses identification based on real-time multiplex PCR with hybridization-fluorescent detection. This method is meant for the differential diagnostics of hemorrhagic fevers caused by these viruses. Displayed are the results of determination of multiplex PCR analytical sensitivity and specific activity.

Key words: Marburg, Ebola, and Lassa viruses, multiplexed real-time PCR.

Вирусы Эбола и Марбург, относящиеся к семейству *Filoviridae*, и вирус Ласса, относящийся к семейству *Arenaviridae*, являются возбудителями тяжелых геморрагических лихорадок, вспышки и эпидемии которых ежегодно возникают в странах африканского континента. В течение последних 5 лет в Африке зарегистрировано как минимум четыре вспышки заболеваний, вызванных вирусами Эбола и Марбург. В эти эпидемии были вовлечены сразу несколько стран. Вспышка лихорадки Эбола в Уганде в 2007 г. унесла жизни 37 человек (25 % из общего числа заболевших – 149 человек). В числе пациентов оказались 12 местных медицинских работников, 5 из них умерли [1]. Одна из самых крупных вспышек геморрагической лихорадки Марбург была зарегистрирована в Анголе в 2005 г. и стала причиной гибели 329 человек [2]. В 2007 г. в Уганде вирус Марбург был идентифицирован у трех пациентов с клинической картиной геморрагической лихорадки [6].

Появление этих заболеваний в неэндемичных регионах мира связано, в первую очередь, с завозом инфекционных патогенов из эндемичных районов Африки [4]. Так, в 2009 г. в Великобритании регистрировались случаи завоза геморрагической лихорадки Ласса из Мали и Нигерии [5], а в июле 2008 г. в Европе зарегистрирован случай завоза вирусной геморрагической лихорадки Марбург. У женщины, приехавшей в Голландию из Уганды, на 4-е сутки после приезда развилась клиническая картина тяжелой геморрагической лихорадки. Кроме того, нужно иметь в виду постоянную угрозу умышленного использования инфекционных патогенов в качестве

оружия биотерроризма.

Таким образом, разработка методов диагностики инфекционных заболеваний, вызванных вирусами геморрагических лихорадок, важна даже в странах, где вспышки ранее не регистрировались. В связи с этим вирусные геморрагические лихорадки Марбург, Эбола и Ласса, наряду с другими особо опасными инфекциями, включены в перечень инфекционных заболеваний, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации (Приказ Минздрава РФ № 263 от 02.07.1999). Необходимость как можно более быстрого установления этиологического агента при вирусных геморрагических лихорадках напрямую связана с эффективностью последующих противоэпидемических, профилактических и лечебных мероприятий.

Целью нашей работы явилась разработка способа диагностики вирусных геморрагических лихорадок Марбург, Эбола и Ласса, основанного на методе мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации в режиме реального времени.

Материалы и методы

В работе использованы вирусы геморрагических лихорадок Марбург (штамм Popp), Эбола-Заир (штамм Mayinga), Эбола-Судан (штамм Boniface), полученные из коллекции микроорганизмов ГНЦ ВБ «Вектор».

Для изучения специфической активности в качестве контрольных образцов, не содержащих матричной ДНК, были использованы: кДНК вируса кори

(изолят MVs/Blagoveshensk.RUS/18.10/2), ДНК человека, ДНК обезьян. Изолят вируса кори был получен из носоглоточного смыва больного. ДНК обезьян (капуцины и саймири семейства *Cebidae* Swainson [3]) получена из образцов крови животных.

В работе использовали клетки Vero, полученные из коллекции культур клеток ГНЦ ВБ «Вектор», и питательная среда Игла MEM с двойным набором аминокислот и витаминов (Игла MEM x 2ABK) производства ГНЦ ВБ «Вектор».

Культивирование вируса проводили в стационарном режиме на монослой клеток Vero в культуральных флаконах объемом 1 л. Множественность заражения составляла 0,01–0,1 БОЕ на клетку. Адсорбцию вируса проводили в течение 30 мин при температуре 37 °С. После этого монослой клеток заливали 150 мл питательной среды Игла MEM x 2ABK, содержащей 0,06 % глутамин, 2 % эмбриональной сыворотки КРС и антибиотики (бензилпенициллин – 100 ед./мл, стрептомицин – 100 мкг/мл). Клетки инкубировали при температуре 37 °С до появления ЦПД, в среднем 5 сут. КВЖ использовали для выделения РНК вируса.

Предварительную инактивацию образцов и выделение РНК проводили в условиях, регламентированных МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Вирусную РНК выделяли из культуральной вирусосодержащей жидкости с использованием набора реагентов «Комплект реагентов для выделения ДНК/РНК из сыворотки или плазмы крови» (НПФ Литех, Россия) в соответствии с инструкцией по применению. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора реагентов «Реверта-Л» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) в соответствии с инструкцией по применению.

Специфические праймеры и зонды для вирусов Марбург, Эбола и Ласса подбирали в программе Vector NTI 9.0.0 (InforMax) и с использованием последовательностей геномов этих вирусов, депонированных в международной базе данных NCBI GeneBank.

Реакцию амплификации с детекцией продуктов в режиме реального времени проводили на приборах iCycler iQ 5 (Bio-Rad, США) и Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Австралия). Результаты ПЦР реги-

стрировали по оптическим каналам Green (470 нм / 510 нм), Yellow (530 нм / 555 нм) и Orange (585 нм / 610 нм). Для детекции продуктов амплификации использовали зонды в формате TaqMan beacons.

Для обеспечения «горячего старта» в реакции амплификации использовали Smart Taq ДНК-полимеразу (ООО «Лаборатория Медиген», Россия).

Положительные контрольные образцы (ПКО) для детекции вирусов Марбург и Эбола были получены методом молекулярной трансформации компетентных бактериальных клеток *Escherichia coli* плазмидами pCR 2.1, включающими вставки ДНК-фрагментов, соответствующих участку гена L вирусов Марбург и Эбола, с последующим выделением и очисткой плазмидной ДНК из бактериальных клеток.

Для детекции вируса Ласса положительные контрольные образцы были получены на основе рекомбинантной плазмиды pUC, несущей вирусспецифическую вставку.

Оптимизацию условий проведения ПЦР проводили по температуре отжига праймеров, концентрации в реакционной смеси праймеров, зондов и ионов магния.

Оценку аналитической чувствительности проводили с использованием десятикратных разведений положительных контрольных образцов для каждого из вирусов. Определение концентрации ДНК осуществляли при помощи коммерческого набора Quant-iT dsDNA, HS (Invitrogen, США) в флуориметре QUBIT (Invitrogen, США). Специфическую активность оценивали проведением ПЦР с комплементарной ДНК (кДНК) вирусов Марбург (штамм Popr), Эбола-Заир (штамм Meyanga), Эбола-Судан (штамм Bonifacie).

Результаты и обсуждение

Праймеры как для вируса Марбург, так и для вируса Эбола были рассчитаны на участок L-гена длиной 307 п.н. Для вируса Ласса участок-мишень генома длиной 189 п.н. соответствовал фрагменту вирусной РНК L-сегмента генома. Зонды содержали на 5'-конце флуорофор, а на 3'-конце гаситель флуоресценции. Структуры праймеров и зондов и используемые для мечения зондов флуорофоры и гасители флуоресценции приведены в табл. 1.

Таблица 1

Структура праймеров и зондов		
Вирус	Праймеры и зонды	Последовательность нуклеотидов
Марбург	F 13060	5'-TGGGACAGYGTTTYGATAG-3'
	R 13367	5'-ACAACCATCATRTRCTAGGGAATGCT-3'
	Z 13288	R6G-GTGTCAGAAATGTCCAAACACTYGCAGAAAGC-BHQ1
Эбола	F 13060	5'-TGGGATGCAGTHTTYGARCC-3'
	R 13367	5'-ACAACCATCATRTTGCTTGGAAAGGCTT-3'
	Z 13201	5'-ACTACCATCATATTGCTAGGAAATGCTT-3'
Ласса	F 1727	FAM-TACTRCCACAATATCGRAACTTTTCTTTCATTGAA-BHQ1
	R 1916	5'-GAGACAAGAGACAARGCTTCACAGTT-3'
	Z 1798	5'-TGGAGGATAGGGTTGGTTTGAAT-3'
		ROX-CACTTCATTTGGTTGACGCTAGATCGCTC-BHQ1

Аналитическая чувствительность мультиплексной ПЦР

Разведения ПКО	ПКО/Марбург		ПКО/Эбола		ПКО/Ласса	
	Кол-во копий*	Ct**	Кол-во копий*	Ct**	Кол-во копий*	Ct**
0	~10 ⁷	18,3	~10 ⁹	13,0	~10 ⁷	19,9
-1	~10 ⁶	22,0	~10 ⁸	16,6	~10 ⁶	22,7
-2	~10 ⁵	25,8	~10 ⁷	20,4	~10 ⁵	27,7
-3	~10 ⁴	28,8	~10 ⁶	24,1	~10 ⁴	31,8
-4	~10 ³	34,0	~10 ⁵	28,5	2×10³	35,0
-5	5×10²	36,9	~10 ⁴	33,2	~10 ²	-
-6	~10	-	1×10³	39,8	~10	-
-7	<10	-	~10 ²	-	<10	-

* Кол-во копий ДНК-матриц, выраженное в геномных эквивалентах (ГЭ).

** Ct – число циклов, после которых сигнал флуоресценции в положительном образце превышает уровень фона.

Оптимальную температуру отжига праймеров определяли постановкой ПЦР в реальном времени с десятикратными разведениями положительных контрольных образцов в приборе iCycler iQ 5 (Bio-Rad, США) с градиентом температур отжига: 50, 53, 55, 59, 62 и 65 °С. Как моноварианты постановки ПЦР, так и постановка ПЦР в мультиплексном формате, показали наибольшую чувствительность определения ДНК-мишени в реакционной смеси при температуре отжига праймеров 55 °С. В дальнейшей работе применяли оптимизированный температурно-временной протокол проведения реакции амплификации, состоящий из денатурации при 95 °С в течение 5 мин и 45 циклов, каждый из которых включает денатурацию ДНК при температуре 94 °С в течение 10 с, отжиг праймеров при температуре 55 °С в течение 25 с, синтез комплементарной цепи при температуре 72 °С в течение 25 с. Детекцию продуктов амплификации проводили на каналах Green (для вирусов Эбола), Yellow (для вируса Марбург) и Orange (для вируса Ласса) при температуре 55 °С.

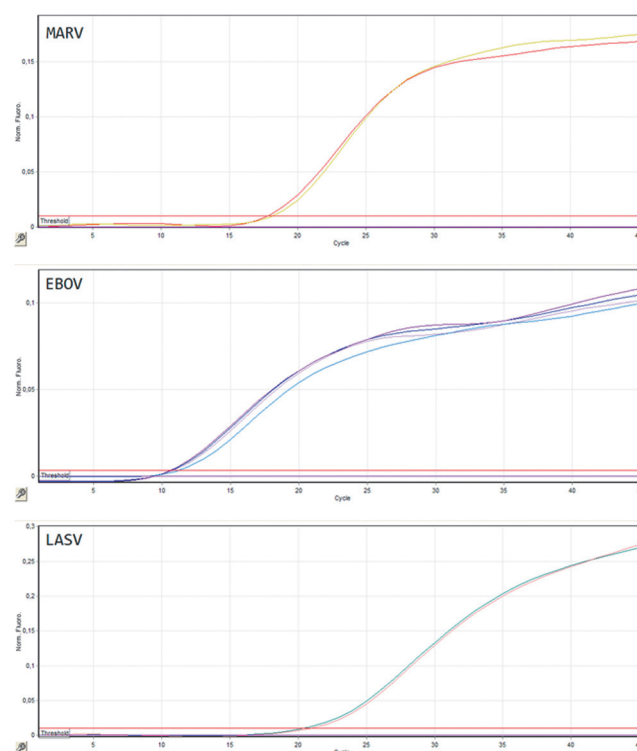
Оптимизированный состав реакционной смеси включал следующие компоненты: 10×Taq буфер без Mg²⁺ (ООО «Лаборатория Медиген», Россия) – конечная концентрация 1×; 100 mM раствор MgCl₂ – конечная концентрация 3,3 mM; 5 mM раствор dNTP – конечная концентрация каждого 0,2 mM; смесь праймеров – конечная концентрация каждого 0,1–0,15 μM; смесь зондов – конечная концентрация каждого 0,1 μM; SmartTaq ДНК-полимераза – конечная концентрация 1,5 е.а./мкл; вода для ПЦР.

Результаты оценки аналитической чувствительности ПЦР для идентификации вирусов Марбург, Эбола и Ласса, которую определяли с использованием десятикратных разведений положительных контрольных образцов, представлены в табл. 2.

Специфическую активность оценивали постановкой ПЦР в реальном времени с кДНК вирусов Марбург (штамм Popp), Эбола-Заир (штамм Mayinga), Эбола-Судан (штамм Boniface), вируса кори (изолят MVs/Blagoveshensk.RUS/18.10/2), ДНК человека, ДНК обезьян (капуцинов и саймири). При этом об-

разцы, содержащие кДНК вируса Марбург и вирусов Эбола, детектировались на каналах Yellow и Green соответственно (рисунок). Перекрестных неспецифических реакций между этими близкородственными вирусами не выявлено. В отношении ДНК человека, ДНК обезьян и кДНК вируса кори также не выявлено неспецифических реакций. Флуоресценция в этих образцах не превышала уровень фона на трех каналах детекции.

Таким образом, на основе разработанной методики идентификации вирусов Марбург, Эбола и



Кривые флуоресценции на трех оптических каналах амплификатора Rotor Gene 6000 (Corbett Research, Австралия):

Флуоресценция в образцах, содержащих генетический материал: вируса Марбург (MARV) – 2 образца на канале Yellow, вирусов Эбола (EBOV) – 4 образца на канале Green, ПКО вируса Ласса (LASV) – 2 образца на канале Orange

Ласса в дальнейшем возможно создание диагностической тест-системы, позволяющей провести дифференциально-диагностические мероприятия в первые часы поступления образцов клинического материала или объектов окружающей среды, что делает возможным установление этиологии заболевания до получения данных вирусологических исследований. Использование количественно охарактеризованных образцов при постановке ПЦР в реальном времени позволяет определять уровень вирусной нагрузки в различных типах клинического материала, что может быть полезным как в клинической практике для оценки динамики заболевания и эффективности проводимого лечения, так и в исследовательской работе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бундибугио, Уганда: эпидемия лихорадки Эбола закончилась. [Сайт] Врачи без границ; 16.01.2008 [дата обращения 27.04.2011] URL: <http://www.ru.msf.org/russia/article.cfm?article=8D1A6C4F-15C5-F00A-2535-B75C1B8943A1>
2. Лихорадка Марбург добралась до столицы Анголы. [Сайт] МедНовости; 28.03.05 [дата обращения 20.03.2008]. URL: <http://medportal.ru/mednovosti/news/2005/03/28/angola/>
3. Соколов В.Б. Систематика млекопитающих. М.: Высшая школа; 1973. Т. 1. 430 с.
4. Haas W.H., Breuer T., Pfaff G., Schmitz H., Köhler P., Asper M. et al. Imported Lassa fever in Germany: surveillance and

management of contact persons. Clinical Infectious Diseases 2003; 36:1254–8.

5. Kitching A., Addiman S., Cathcart S., Bishop L., Krahé D., Nicholas M. et al. A fatal case of Lassa fever in London, January 2009. Eurosurveillance. 2009; 14(6). pii: 19117

6. Ligon B.L. Outbreak of Marburg hemorrhagic fever in Angola: a review of the history of the disease and its biological aspects. Semin. Pediatr. Infect. Dis. 2005; 16(3):219–24.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. [Bundibugio, Uganda: Ebola fever epidemic is over]. Web-site of the International Medical Humanitarian Organization "Doctors without Borders"/"MSF"; 16 Jan 2008 [cited 27 Apr 2011]. Available from: <http://www.ru.msf.org/russia/article.cfm?article=8D1A6C4F-15C5-F00A-2535-B75C1B8943A1>

2. [Marburg Fever got to the capital of Angola]. Medical news web-site; 28 Mar 2005 [cited 20 Mar 2008]. Available from: <http://medportal.ru/mednovosti/news/2005/03/28/angola/>

3. Sokolov V.B. [Taxonomy of Mammals]. M.: Vys. Shkola; 1973. Vol. 1. 430 p.

Authors:

Sementsova A.O., Shikov A.N., Ternovoy V.A., Vinokurova A.V., Kostina N.E., Stavsky E.A., Agafonov A.P. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia.

Об авторах:

Семенцова А.О., Шиков А.Н., Терновой В.А., Винокурова А.В., Костина Н.Е., Ставский Е.А., Агафонов А.П. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово.

Поступила 28.04.11.

И.В.Шиленко, А.А.Титов, С.П.Ярков, В.Н.Злобин

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИАНАЛИТНОГО ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО ТЕСТА
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БОТУЛИНИЧЕСКИХ ТОКСИНОВ

Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения, Москва

Разработан мультианалитный тест на основе наночастиц коллоидного золота для одновременного выявления нейротоксинов (БТ) типов А и В, выделяемых *Clostridium botulinum*. Тест отличается наличием трех линий (двух тестовых и одной контрольной) в поле для регистрации результатов анализа. Тесты предполагается применять при анализе проб продуктов питания и проб, взятых из объектов окружающей среды. Чувствительность одновременного выявления БТ типов А (30 нг/мл) и В (10 нг/мл) не хуже, чем у моноаналитных тестов, сконструированных для выявления одного типа БТ. Показано, что тесты специфичны и могут быть применены для идентификации БТ в продуктах питания.

Ключевые слова: иммунохроматография, ботулинический токсин.

I.V.Shilenko, A.A.Titov, S.P.Yarkov, V.N.Zlobin

Development of the Multi-Analyte Test for Immune-Chromatographic Detection of Botulinum Toxins

State Research Institute of Biological Device Engineering, Moscow

Designed is the multi-analyte test for simultaneous immune chromatographic detection of A & B type botulinum neurotoxins (BT), using colloid gold nanoparticles. It is meant for food and environmental samples' analysis. The sensitivity of simultaneous BT detection of the A (30 ng/ml) and B (10 ng/ml) types is as high as that of mono-analytical tests, designed for one type BT detection. The test is demonstrated to be a specific one and can be used for BT detection in food stuffs.

Key words: immune-chromatography, botulinum toxin.

Ботулинические токсины (БТ) крайне токсичны для человека [1, 10]. Из всего спектра БТ наиболее токсичен токсин типа А (БТА) который рассматривается как один из наиболее вероятных поражающих биологических агентов, пригодных для осуществления террористических актов [3]. Признанными методами выявления и идентификации БТ являются: биологический (реакция нейтрализации токсина типоспецифическими антисыворотками на белых мышах) [2], молекулярно-генетические [4], иммунохимические – реакция непрямой гемагглютинации [1], твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА) [5], иммунохроматографический анализ (ИХА) [11].

Целью работы было конструирование мультианалитного иммунохроматографического теста (ИХ-тест) для одновременного выявления БТ типов А и В в одном цикле анализа в объектах окружающей среды и изучение его пригодности для выявления БТ в продуктах питания.

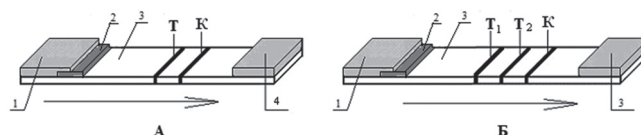
Материалы и методы

ИХ-тест представляет собой нарезанный на полоски мультимембранный композит, помещенный в пластиковую оправу. Для формирования мультимембранного композита применяли материалы фирмы «Millipore» – нитроцеллюлозные мембраны HF120, стекловолоконные и абсорбционные подложки. Антитела наносили на нитроцеллюлозную мембрану в виде линий. Моноаналитный тест содержал одну тестовую (Т) и одну контрольную (К) зоны, а мульти-

аналитный – две тестовых и одну контрольную зону антител (рисунок). Первая линия – тестовая зона (T_1) содержала моноклональные антитела (МКА) клон ВТА232 против БТА, вторая линия – тестовая зона (T_2) с МКА клон КВВ18 против БТ типа В (БТВ), третья линия – контрольная зона (К) состояла из кроличьих антимышиных иммуноглобулинов.

Сферические наночастицы коллоидного золота (НКЗ) средним диаметром (25 ± 5) нм получали по методу Френса [6]. Конъюгаты НКЗ с МКА клон ВТА 151 и/или ВТВ224 получали, как описано в [7, 8]. Суспензии конъюгатов оптической плотностью 3,0, измеренной при 524 нм, наносили на стекловолоконную подложку и подвергали высушиванию.

ИХА проводили при комнатной температуре. Результаты ИХА фиксировали визуально и/или с помощью анализатора иммунохроматограмм видеоцифрового «Рефлеком» (Россия) спустя 20 мин после внесения в ИХ-тест 150 мкл образца в 0,1 М



Схематическое изображение структуры моно- (А) и мультианалитного (Б) иммунохроматографических тестов для выявления ботулинических токсинов:

1 – подложка для нанесения образца; 2 – подложка с конъюгатом; 3 – аналитическая мембрана; 4 – впитывающая подложка; Т – тестовая зона с антителами к БТА или БТВ; T_1 – тестовая зона с антителами к БТА; T_2 – тестовая зона с антителами к БТВ; К – контрольная зона с антивидовыми антителами по отношению к антителам конъюгата.

Стрелкой показано направление тока жидкости

фосфатном буфере (рН 7,8), содержащем 0,25 % БСА и 0,4 % TWEEN 20 – буфере анализа (БА). За положительный результат ИХА принимали появление в тестовых зонах Т₁ и/или Т₂ окрашенных линий, за отрицательный – их отсутствие. За ложноположительный результат принимали появление окрашенной линии в тестовой зоне в отсутствие токсинов в образце. При отсутствии окрашенной линии в контрольной зоне результаты считали недействительными.

В качестве рабочих моделей БТ типов А и В использовали паспортизованные очищенные препараты соответствующих анатоксинов, полученные из филиала «Иммунопрепарат» ФГУП «Микроген», Уфа. Концентрация анатоксинов принималась равной концентрации белка в препарате.

Для исследования возможности выявления БТ в продуктах питания ИХА поступали следующим образом. Полутвердые продукты питания (консервы и сосиски) измельчали блендером, твердые продукты питания (вяленое мясо и рыба) измельчали ножом, затем блендером. В продукты питания вносили известные концентрации анатоксинов, перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Соки центрифугировали при 7000 g в течение 30 мин, супернатант смешивали с БА 1:1 по объему. Вязкие образцы и образцы с высоким содержанием сахара или жира (мёд, сгущенное и цельное молоко) разбавляли БА 1:5 по весу и центрифугировали. Полутвердые и твердые продукты питания смешивали с БА 1:4 по весу и обрабатывали ультразвуком на ультразвуковом диспергаторе (Labsonic 2000 «B.Braun», Германия) при охлаждении во льду в режиме «LOW» при максимальном резонансе в течение 60 с, затем центрифугировали, супернатант смешивали с БА 1:1 по объему. Доводили рН образцов до 7,5–8,0 путем внесения в образец 1N раствора NaOH.

Результаты и обсуждение

В нашей работе реализован вариант «сэндвич» ИХА, основанный на появлении окрашенной линии в тестовой зоне за счет образования комплекса конъюгат-аналит-антитело при взаимодействии МКА, специфичных к различным участкам белковых молекул токсинов. В контрольной зоне окрашенная линия появлялась при взаимодействии конъюгата с антителами контрольной зоны. Линии хорошо заметны визуально и могут регистрироваться с помощью приборов-рефлектометров.

Моноаналитные ИХ-тесты (рисунок, А) для выявления БТА или БТВ имели чувствительность выявления по анатоксинам 30 и 10 нг/мл соответственно.

Ключевой задачей исследования было получение мультианалитных конъюгатов НКЗ с МКА к БТА и БТВ для построения на их основе мультианалитного ИХ-теста. Исследовались два варианта создания мультианалитных конъюгатов. Первый вариант заключался в смешивании моноаналитных конъюгатов к БТА и БТВ и нанесении их на подложку для конъюгата.

Второй – получение мультианалитного конъюгата НКЗ со смесью МКА к БТ обоих типов. Эксперименты показали, что ИХ-тесты, полученные с использованием первого варианта получения мультианалитного конъюгата, не обладали достаточной чувствительностью. Результаты анализа ботулинических анатоксинов с помощью ИХ-теста, сконструированного на основе мультианалитного конъюгата, полученного по второму варианту, приведены в таблице. Схема построения такого теста приведена на рисунке (Б).

Экспериментальные данные показывают, что чувствительность выявления мультианалитным тестом – 30 нг/мл ботулинического анатоксина типа А и 10 нг/мл ботулинического анатоксина типа В. Видно, что мультианалитный тест не уступает по своим характеристикам моноаналитным тестам. Время проведения ИХА, как и в случае моноаналитных тестов, не превышало 20–25 мин.

Специфичность моно- и мультианалитных ИХ-тестов подтверждена тем, что они не давали перекрестных реакций с ботулиническим анатоксином типа Е, столбнячным и дифтерийным анатоксинами, взятых в концентрации 1000 нг/мл.

Представилось интересным выяснить возможность определения БТ в продуктах питания с помощью разработанных ИХ-тестов. Известно, что некоторые продукты питания могут содержать БТ, образовавшиеся в результате жизнедеятельности микроорганизмов [2]. При выявлении аналита с помощью ИХА велико влияние матрикса вещества, в котором он находится. Примененная нами схема пробоподготовки была направлена на полноценную экстракцию БТ в жидкую фазу, понижение вязкости образца, уменьшение содержания солей и твердых частиц в

Результаты выявления ботулинических анатоксинов с помощью мультианалитного ИХ-теста

Наименование анатоксина	Концентрация анатоксинов в БА, нг/мл	Интенсивность окрашивания тестовых и контрольной зон, отн. ед.		
		Т ₁	Т ₂	К
БТА	0	0	0	8,5
	30	1,2	0	8,2
	60	2,1	0	9,9
	160	2,3	0	8,3
	320	6,5	0	9,3
	640	5,9	0	7,9
БТВ	0	0	0	8,5
	10	0	2,0	7,2
	25	0	2,2	9,4
	50	0	3,0	9,1
	75	0	5,1	9,2
	100	0	3,9	10,9
Смесь БТА и БТВ	0/0	0	0	10,0
	30/25	1,4	2,6	10,5
	60/25	2,9	4,4	11,4
	160/10	3,8	2,0	11,2
	160/25	3,9	1,7	7,0
	160/50	4,6	4,1	7,6

Примечание. Даны средние значения интенсивности окрашивания зон для трех измерений каждой концентрации анатоксинов.

обработанном образце продуктов питания и поддержание уровня рН, при котором иммунохроматографический процесс был эффективен. В работе [11] предложена с целью понижения вязкости и уменьшения негативных эффектов при анализе жирных и липидосодержащих образцов обработка их метанолом. Примененная нами экстракция жиров и липидов метанолом из образцов пищи не увеличила чувствительности выявления БТ, однако обработка ультразвуком позволила эмульгировать жиры и анализировать даже такие образцы. Для того чтобы проверить возможность разрушения БТ при обработке образцов пищи ультразвуком, проводили озвучивание модельных растворов анатоксинов в БА. Воздействие ультразвука на анатоксины в БА при тех же мощностях и частоте, что и при воздействии на пищу, не привело к их деградации и не понижало чувствительность.

Чувствительность выявления БТ в продуктах питания зависит от состава и консистенции продукта. Наибольшую чувствительность (10–30 нг/мл) наблюдали при анализе соков и минеральной воды, наименьшую (200–440 нг/мл) – при анализе продуктов с высокой концентрацией жиров, липидов и углеводов (мясных консервов и сгущенного молока). Напиток «Кока-кола», по причине содержания в нем ортофосфорной кислоты, и образцы вяленой рыбы, содержащей значительное количество поваренной соли, показали ложноположительные результаты ИХА.

Сконструированные нами моно- и мультианалитные ИХ-тесты позволяют за короткое время определить БТ типов А и В как в нативном виде, так и в модельных смесях в продуктах питания. Чувствительность ИХ-тестов по БТ (10–30 нг/мл) уступает биологическим тестам с использованием мышей (0,01 нг/мл) и ТИФА (0,1–1,0 нг/мл), зато сокращает время и существенно упрощает технику самого анализа [11]. ИХ-тест не требует приборного оснащения для регистрации результатов. Применение ИХ-тестов сокращает время анализа (20–25 мин по сравнению с 2–3 ч для ТИФА) и удобно с точки зрения лабораторной техники. Наконец, ИХ-тесты могут применяться в лабораториях с невысокой приборной оснащенностью и даже в полевых условиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Поздеев О.К. Медицинская микробиология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007. 768 с.
2. Ракова И.Д., Гуржей С.Н., Сметанин Н.Н. О методах исследования на ботулизм. Мед. экстремальных ситуаций. 2010; 33(3):71–3.
3. Arnon S.S., Schechter R., Inglesby T.V., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S. et al. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. JAMA. 2001; 285:1059–70.
4. Fach P., Gibert M., Griffais R., Guillou J.P., Popoff M. R. PCR and gene probe identification of botulinum neurotoxin A-, B-, E-, F-, and G-producing *Clostridium* spp. and evaluation in food samples. Appl. Environ. Microbiol. 1995; 61:389–92.
5. Ferreira J.L., Maslanka S., Johnson E., Goodnough M. Detection of botulinum neurotoxins A, B, E, and F by amplified enzyme-linked immunosorbent assay: collaborative study. J. AOAC Int. 2003; 86:314–31.
6. Frens G. Preparation of gold dispersions of varying particle size: Controlled nucleation or the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. Nat. Phys. Sci. 1973; 241(1):20–2.
7. Hermanson G.T. Bioconjugate Techniques. Academic Press; 2008. P. 924–34.
8. Horisberger M., Rosset J. Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy. J. Histochem. Cytochem. 1977; 25(4):295–305.
9. Geoghegan W.D., Ackerman G.A. Adsorption of horseradish peroxidase, ovomucoid and anti-immunoglobulin to colloidal gold for the indirect detection of concavalin A, wheat germ agglutinin and goat anti-human immunoglobulin G on cell surfaces at the electron microscopic level: a new method, theory and application. J. Histochem. Cytochem. 1977; 25:1187–200.
10. Niemann H. Molecular biology of the clostridial neurotoxins. In: Alouf J.E., Freer J.H., editors. A sourcebook on bacterial protein toxins. Academic Press, London, United Kingdom; 1991. P. 303–8.
11. Sharma S.K., Eblen B.S., Bull R.L., Burr D.H., Whiting R.C. Evaluation of lateral-flow *Clostridium botulinum* neurotoxin detection kits for food analysis. Appl. Environ. Microbiol. 2005; 71(7):3935–41.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Pozdеев О.К. [Medical Microbiology]. М.: GEOTAR-Media; 2007. 768 p.
2. Rakova I.D., Gurzhey S.N., Smetanin N.N. [About the botulism diagnostic techniques]. Med. Ekstrem. Sit. 2010; 33(3):71–3.

Authors:

Shilenko I.V., Titov A.A., Yarkov S.P., Zlobin V.N. State Research Institute of Biological Device Engineering, Volokolamskoye Highway, 75, B. 1, Moscow, 125424, Russia. E-mail: niibp@dol.ru

Об авторах:

Шиленко И.В., Титов А.А., Ярков С.П., Злобин В.Н. Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения. 125424, Москва, Волоколамское шоссе, д. 75, корпус 1. E-mail: niibp@dol.ru

Поступила 03.12.10.

О.В.Громова¹, С.А.Нижегородцев¹, И.А.Дятлов², В.В.Кутырев¹

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ТАБЛЕТИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ С ПОМОЩЬЮ ТЕХНОЛОГИИ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ

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

²Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk

Разработана и внедрена в производство холерной химической вакцины технология получения О-антигена штамма *Vibrio cholerae* M41 с использованием ультрафильтрационных модулей на полых волокнах. Ультрафильтрация позволяет получать нативные высокоактивные препараты О-антигена, соответствующие требованиям действующей нормативной документации, экономить в 10–15 раз сульфат аммония, используемый для осаждения антигена, уменьшать вдвое длительность технологического цикла и снизить трудозатраты. Технология концентрирования протективных антигенов апробирована на штаммах *V. cholerae* O139 серогруппы MO45 и KM137, получены 3 серии экспериментальной вакцины против холеры, вызванной возбудителем O139 серогруппы.

Ключевые слова: холерная химическая вакцина, производственные штаммы, О-антиген, ультрафильтрация.

O.V.Gromova¹, S.A.Nizhegorodtsev¹, I.A.Dyatlov², V.V.Kutyrev²

Optimization of the Process of Cholera Chemical Pelleted Vaccine Production Using Ultrafiltration Technology

¹Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov; ²State Scientific Centre of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

Technology of O-antigen obtaining from *Vibrio cholerae* M41 production strain, using the hollow fiber ultrafiltration modules, is developed and introduced into cholera vaccine manufacturing. Application of ultrafiltration makes it possible to obtain native high-activity O-antigen preparations which comply with the current regulatory requirements. Besides, it provides for economy (10–15-fold) of ammonium sulphate, used for antigen precipitation, reduces the duration of technological cycle (2 times), and the labor inputs. The technology of protective antigen concentrating is tested on *V. cholerae* strains MO45 and KM137 of O139 serogroup. Three series of experimental *V. cholerae* O139 vaccine are obtained.

Key words: cholera chemical vaccine, production strains, O-antigen, ultrafiltration.

Одной из приоритетных задач медицины является резкое снижение заболеваемости, вызываемое возбудителями опасных и особо опасных инфекций. Важную роль в решении данной проблемы играют вакцины. В Российском научно-исследовательском институте «Микроб» разработана и производится бивалентная химическая таблетированная холерная вакцина, содержащая основные протективные антигены холерного вибриона: холероген-анатоксин и соматические О-антигены (О-АГ) серогрупп Огава и Инаба. Также создана экспериментальная модульная вакцина из штаммов O1 и O139 серогрупп [3, 6].

Для оптимизации производства проанализирована каждая стадия процесса получения препарата для поиска путей увеличения выхода вакцины без изменения ее качества. Наибольшие материальные и временные затраты обнаружены на стадиях выделения специфических компонентов вакцины.

Целью работы явилось усовершенствование производства оральной холерной химической вакцины путем внедрения новых технологий, для улучшения стандартности препарата, уменьшения затрат труда и повышения выхода целевого продукта. Конкретная задача исследования состояла во внедрении в произ-

водство вакцины новой технологии получения О-АГ с использованием ультрафильтрационных модулей на полых волокнах.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы-продуценты *V. cholerae* O1 серогруппы M41 Огава и 569В Инаба, а также штаммы O139 серогруппы MO45 (Япония) и KM-137 [9]. Выращивание штаммов проводили в производственных условиях [5]. Химический состав характеризовали, как описано ранее [6]. Гель-фильтрацию проводили на колонке (35×2 см) с TSK гелем HW-60 с фосфатным буфером M/150, pH 7,2. Безвредность и иммуногенность по ED₅₀ определяли на белых мышах, заражение иммунизированных мышей проводили внутривентально штаммами *V. cholerae* 879-М Инаба, *V. cholerae* 3122-Р Огава и *V. cholerae* P-16064 O139 [1, 5]. Активность холерогена определяли на взрослых кроликах с помощью внутрикожной реакции, Специфическую активность очищенных антигенов определяли в реакции иммунодиффузии в геле (РИД) и РНГА [6]. В серологических тестах использовали коммерческие холерные

сыворотки: О1 и О139-агглютинирующая и антихолерогенная (РосНИПЧИ «Микроб»).

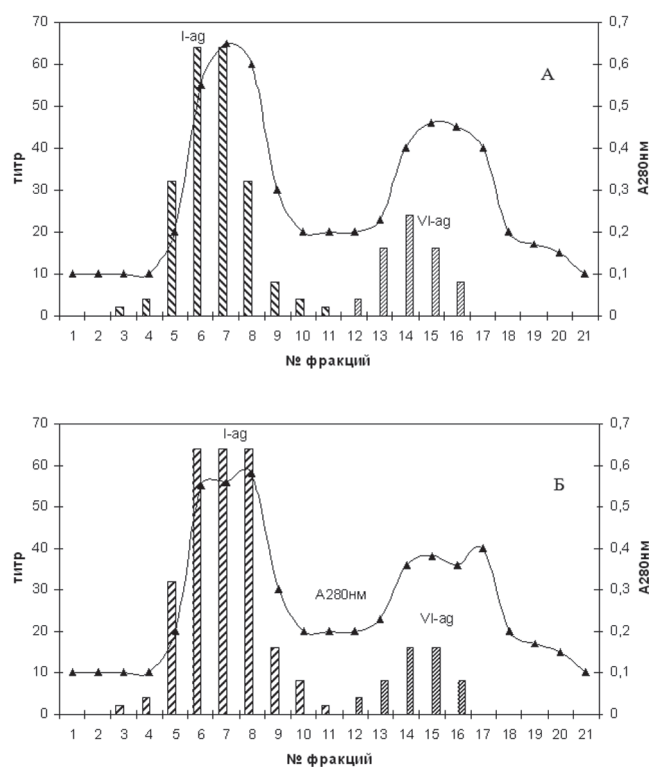
Результаты и обсуждение

Технологическая схема выделения иммуногенов коммерческой вакцины предполагает использование растворимых антигенов из культуральной жидкости штаммов-продуцентов [5]. Исходным материалом для получения О-АГ является центрифугат бульонной культуры штамма М41, выращенного в течение (10 ± 2) ч на казеиновом бульоне методом глубинного культивирования, детоксицированный в холодильной комнате в течение 30 сут при температуре $(8 \pm 2)^\circ\text{C}$. Согласно регламенту производства холерной вакцины для выделения у О-АГ из обеззараженной и детоксицированной культуральной жидкости требуется большое количество сульфата аммония. Для повышения эффективности и снижения затрат этого процесса предложен новый способ предварительной ультрафильтрации центрифугата с целью его концентрирования в 10–15 раз и удаления неспецифических примесей с молекулярной массой менее 20 кДа [2, 4]. Нами была сконструирована и смонтирована установка с использованием шести ультрафильтрационных волоконных колонок марки УВА-ПС-20-1040 суммарной производительностью по дистиллированной воде 4380 л/ч, соединенных последовательно с включенным в конструкцию вспомогательным оборудованием [7]. На данной установке проведено концентрирование 3 серий формализованного центрифугата штамма М41 Огава в количестве 450 л в трех производственных циклах. Скорость отвода фильтрата была высокой – 2,4 л/мин с последующим постепенным снижением до 0,82 л/мин. Среднее время концентрирования в 3 сериях равнялось (7 ± 1) ч. Концентраты О-АГ центрифугировали на сверхцентрифуге СГО-100 при 13000g для осаждения нерастворимых компонентов, из надосадочной жидкости осаждали О-АГ при 50 % насыщения сульфатом аммония с последующим отделением осадка и диализом. Далее материал лиофилизировали и использовали как компонент химической таблетированной вакцины (серии 09–011).

Результаты, полученные в процессе сравнительного изучения данных О-АГ, позволили сделать вывод о том, что внедрение нового технологического этапа не ухудшило их качества как компонентов вакцины, а в некоторых случаях имелось преимущество перед традиционной технологией (средние титры РНГА производственных серий 1:112, у экспериментальной серии 011 1:224). Изучение химического состава полученных О-АГ показало наличие 22–24 % углеводов, 12–15 % липидов, 3–5 % нуклеиновых кислот, что является сходным с коммерческими О-АГ. Некоторые отличия обнаружены в количестве белка: у экспериментальных О-АГ оно составляло 20–22 %, а у полученных традиционным способом – 25–27 %. Возможно, это связано с удалением в процессе ультра-

трафильтрации неспецифических белковых компонентов. Содержание альдогептозы во всех препаратах было близким и составляло 0,5–0,6 %. Как известно, альдогептоза является маркером липополисахарида холерного вибриона и может характеризовать содержание О-АГ в препаратах [6]. Таким образом, О-АГ, полученные с помощью технологии ультрафильтрации, по своим физико-химическим свойствам и серологической активности соответствовали препаратам, выделенным по регламенту производства. Результаты гель-хроматографического анализа О-АГ на колонке с TSK-гелем HW-60 (рисунок) продемонстрировали их подобие: в элюатах препаратов обнаружился специфический О-АГ и некоторое количество антигена VI, относящегося к неспецифическим термостабильным антигенам, что связано со стерилизацией обоих препаратов текущим паром.

Три сформированные экспериментально-производственные серии вакцины – 09, 010, 011 были проконтролированы по всем тестам, заложенным в ФСП-42-0020-0020-00. В результате проведенных контролей установлено, что все 3 серии соответствовали паспортным данным и требованиям нормативной документации. Средние данные по трем сериям препарата: антигенная активность по анти-токсинсвязыванию (ЕС) составила 100000 ЕС на таблетку (лимит 100000 ± 20000 ЕС), содержание О-АГ в РНГА в обратных значениях титра реакции равно 2500 (лимит не менее 2000). Иммуногенная актив-



Хроматография на TSK-геле HW-60
О-антигена холерного вибриона:

А – по регламенту, Б – с ультрафильтрацией. По оси абсцисс – номер фракций; по оси ординат – кривая элюции белка при A280 nm; I-ag, VI-ag – содержание антигенов (титр в пробе РИД)

ность по ED_{50} на белых мышах составила в среднем 1/30000 часть таблетки (лимит не более 1/20000 части таблетки). Все серии были нереактогенными при испытаниях на добровольцах (по пять волонтеров на серию), нетоксичны в дозе 1/160 части таблетки при подкожном введении белым мышам и специфически безопасны при испытаниях на кроликах (в 1 мг белка препарата содержалось в среднем 4000 условных кожных доз) при лимите не более 6000.

Для отработки технологии ультрафильтрации на материале штаммов *V. cholerae* O139 серогруппы было проведено производственное выращивание двух штаммов-продуцентов O139 серогруппы – МО-45 и КМ 137. Выращивание штаммов, получение формализованного центрифугата и его детоксикация проводились так же, как и штаммов O1 серогруппы.

Ультрафильтрацию формализованного центрифугата (125 л каждого штамма) проводили на производственном стенде в течение 2 ч с целью концентрирования содержащегося в нем О-АГ. Скорость фильтрации составила в среднем 1 л/мин. В процессе ультрафильтрации каждые 15 мин производили отбор проб фильтрата, который контролировался по мутности (что позволяло определять целостность волокон колонки) и содержанию О-АГ. Оставшийся на колонке препарат был смыт обратным током жидкости. Практически весь О-АГ, растворенный в культуральной жидкости, концентрировался в процессе ультрафильтрации и сохранялся в концентрате. Концентраты центрифугировали, О-АГ фракционировали сульфатом аммония и далее получали полуфабрикат вакцины, как описано для штамма М41.

Изучение химического состава полученных О-АГ O139 показало наличие 24–26 % углеводов, 20–22 % белка, 12–15 % липидов, 3–5 % нуклеиновых кислот что соответствует данным анализа фракций, полученных традиционным способом. Серологическая активность фракций также соответствовала фракциям О-АГ, полученным традиционно (титр РИД 1:8). Далее было скомпоновано и проконтролировано три серии таблеток O139 вакцины (015–017). Как компонент, содержащий в экспериментальной вакцине анатоксин холерогена и О-антиген Инаба, использовали материал штамма *V. cholerae* 569В. Средние данные по трем сериям препарата: антигенная активность по антитоксиносвязыванию (ЕС) составила 100000 ЕС на таблетку, содержание О-АГ в РИД в обратных значениях титра реакции равно 3200. Все серии были нетоксичны в дозе 1/160 части таблетки для белых мышей и специфически безопасны при испытаниях на кроликах.

Особенно интересным является тот факт, что иммуногенная активность экспериментальной вакцины против O139 серогруппы с применением ультрафильтрации (серии 015–017) по ED_{50} на белых мышах была значительно выше показателей серии 012, полученной традиционно (ED_{50} составила в среднем 1/50000 часть таблетки (015–017) и 1/35000 (012) при

заражении штаммом O1 серогруппы; 1/45000 часть таблетки (серии 015–017) и 1/28000 (012) при заражении штаммом O139 серогруппы).

Таким образом, метод производства холерной таблетированной вакцины с использованием препаратов О-АГ, полученных ультрафильтрацией был успешно апробирован на штаммах-продуцентах O1 и O139 серогруппы коммерческой и экспериментальной вакцин. Один цикл концентрирования по новой технологии позволил уменьшить количество используемого сульфата аммония в 10–15 раз, убрать этап осаждения балластной фракции, ее центрифугирования и диализа, уменьшить на 25 ч время технологического цикла.

Ультрафильтрат культуральной жидкости вакцинного штамма М41, накапливающийся в процессе получения О-АГ в качестве отхода производства, может служить источником ферментов холерного вибриона и применяться для производства питательных сред [8].

На основе разработанной технологии получения О-АГ холерного вибриона штамма М41 Огава методом ультрафильтрации было составлено Изменение № 3 к РП № 479-99 вакцины холерной бивалентной химической таблетированной, которое утверждено ГИСК им. Л.А.Тарасевича и внесено в регламент производства.

В результате настоящего исследования нами экспериментально обосновано использования метода ультрафильтрации на полых волокнах для получения антигенов холерного вибриона и проведено внедрение масштабируемой технологии изготовления таблетированной холерной вакцины (в том числе и против O139 сероварианта) с использованием данного метода.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. 180 с.
2. Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Дятлов И.А., Елисеев Ю.Ю., Киреев М.Н., Космаенко О.М. Способ получения О-антигена холерного очищенного. Патент РФ № 2143280. Оpubл. 27.12.99. Бюл. № 36.
3. Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Дятлов И.А., Елисеев Ю.Ю., Киреев М.Н., Наумов А.В. и др. Оральная химическая вакцина против холеры. Патент РФ № 2159128. Оpubл. 20.11.2000.
4. Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Дятлов И.А., Киреев М.Н., Федорова В.А., Аленкина Т.В. и др. Новый способ получения О-антигена холерного очищенного с целью создания холерных диагностических антисывороток. Биотехнология. 2002; 2:42–7.
5. Джапаридзе М.Н., Наумов А.В., Никитина Г.П., Мелещенко М.В., Доброва В.Г., Заворотных В.И. и др. Оральная химическая вакцина из гипертоксиогенных штаммов КМ-76 Инаба и КМ-68 Огава возбудителя холеры. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1991; 4:31–3.
6. Джапаридзе М.Н., Наумов А.В., Громова О.В., Адамов А.К., Елисеев Ю.Ю., Космаенко О.М. и др. Использование нового штамма *Vibrio cholerae* O139 в качестве продуцента энтеральной химической вакцины. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1996; 2:52–5.
7. Дятлов И.А., Нижегородцев С.А., Громова О.В., Васин Ю.Г., Бутков А.С., Клокова О.Д. и др. Разработка ультрафильтрационной технологии получения О-антигена холерного вибриона для производства вакцины. Пробл. особо опасных инф. 2001; 2(82):133–9.
8. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Киреев М.Н., Плотников О.П., Грачева И.В., Виноградова Н.А. и др. Способ получения питательной основы и питательная среда для культивирования микроорганизмов рода *Yersinia* и *Vibrio*. Патент РФ № 2360962. Оpubл. 10.07.09. Бюл. № 19.

9. Чеховская Г.В., Щелканова Е.Ю., Смирнова Н.И. Бескапсульные мутанты *Vibrio cholerae* O139 серогруппы: получение, идентификация и использование для приготовления диагностической O139 антисыворотки. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2000; 1:34–7.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. L.: Medgiz; 1962. 180 p.
2. Gromova O.V., Dzhaparidze M.N., Dyatlov I.A., Eliseev Yu.Yu., Kireev M.N., Kosmaenko O.M. [Method of obtainment of cholera O-antigen purified]. RF Patent 2143280. 27 Dec 1999.
3. Gromova O.V., Dzhaparidze M.N., Dyatlov I.A., Eliseev Yu.Yu., Kireev M.N., Naumov A.V. [Oral chemical cholera vaccine]. RF Patent 2159128. 20 Nov 2000.
4. Gromova O.V., Dzhaparidze M.N., Dyatlov I.A., Kireev M.N., Fedorova V.A., Alenkina T.V. et al. [New method of obtainment of the purified cholera O-antigen for the preparation of cholera diagnostic anti-serums]. Biotechnology. 2002; 2:42–7.
5. Dzhaparidze M.N., Naumov A.V., Nikitina G.P., Meleshchenko M.V., Dobrova V.G., Zavorotnykh V.I. et al. [Oral chemical vaccine obtained from the hyper-toxigenic cholera agent strains KM–76 Inaba and KM–68 Ogawa]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 1991; 4:31–3.
6. Dzhaparidze M.N., Naumov A.V., Gromova O.V., Adamov A.K., Eliseev Yu.Yu., Kosmaenko O.M. et al. [Usage of the new *Vibrio cholerae* O139 strain as a producer of enteric chemical vaccine]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 1996; 2:52–5.
7. Dyatlov I.A., Nizhegorodtsev S.A., Gromova O.V., Vasin Yu.G., Butov A.S., Klokova O.D. et al. [Development of the ultrafiltration technology of ob-

tainment of the cholerae vibrio O-antigen for the vaccine production]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2001; 2 (82):133–9.

8. Kuz'michenko I.A., Gromova O.V., Kireev M.N., Plotnikov O.P., Gracheva I.V., Vinogradova N.A., et al. [Method of obtainment of the nutrient substrate and nutrient medium for cultivation of *Vibrio* and *Yersinia* microorganisms]. RF Patent 2360962. 10 Jul 2009.

9. Chekhovskaya G.V., Shchelkanova E.Yu., Smirnova N.I. [Noncapsular mutants of *Vibrio cholerae* serogroup O139: their isolation, identification and use for the preparation of an O139 diagnostic antiserum]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2000; 1:34–7.

Authors:

Gromova O.V., Nizhegorodtsev S.A., Kuttyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Dyatlov I.A. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

Об авторах:

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

Дятлов И.А. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Оболенск, Московская обл. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 05.10.10.

А.В.Комиссаров, С.А.Еремин, А.Ю.Ульянов, Ю.А.Алешина, А.К.Никифоров, Ю.Г.Васин,
О.Д.Клокова, Н.И.Белякова

РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕХНОЛОГИИ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ПРОТЕКТИВНЫХ АНТИГЕНОВ ШТАММА *VIBRIO CHOLERAЕ* 569В ИНАБА МЕТОДОМ ТАНГЕНЦИАЛЬНОЙ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Разработана экспериментальная технология концентрирования протективных антигенов штамма *Vibrio cholerae* 569В Инаба (холерогена-анатоксина и О-антигена) методом тангенциальной ультрафильтрации. Проведена оптимизация технологического процесса концентрирования. Данная технология позволяет получать компоненты холерной вакцины, соответствующие нормируемым требованиям.

Ключевые слова: холерная вакцина, холероген-анатоксин, О-антиген, концентрирование, тангенциальная ультрафильтрация.

A.V.Komissarov, S.A.Eremin, A.Yu.Ulyanov, Yu.A.Aleshina, A.K.Nikiforov, Yu.G.Vasin, O.D.Kloкова,
N.I.Belyakova

Development of the Experimental Technology for Protective Antigens of *Vibrio cholerae* 569B Inaba Concentration by Means of Tangential Ultrafiltration

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Worked out is the experimental technology for protective antigens of *Vibrio cholerae* 569 B Inaba (cholera-anatoxin and O-antigen) concentrating by means of tangential ultrafiltration. Optimization of concentrating technological process is carried out. This technique makes it possible to obtain cholera vaccine components meeting all regulatory requirements.

Key words: cholera vaccine, cholera-anatoxin, O-antigen, concentrating procedure, tangential ultrafiltration.

Одним из недостатков существующей технологии производства вакцины холерной бивалентной химической, таблетированной является затратный и трудоемкий этап выделения нативных антигенов штамма *Vibrio cholerae* 569В Инаба. Данный недостаток обусловлен тем, что выделение О-антигена (О-АГ) и холерогена-анатоксина (ХА) проводят методом солевого осаждения сульфатом аммония непосредственно из детоксицированного безмикробного центрифугата формализированной культуральной жидкости холерного вибриона, что приводит к его значительному расходу. Устранить указанный технологический недостаток возможно предварительным концентрированием безмикробного формализированного центрифугата. Нами ранее была показана возможность применения метода тангенциальной ультрафильтрации для концентрирования одного из компонентов таблетированной холерной вакцины – О-АГ штамма *V. cholerae* М41 Огава из безмикробного центрифугата [2]. Поэтому исследования, направленные на внедрение в производственный процесс технологий концентрирования антигенных компонентов холерной химической вакцины, получаемых из штамма *V. cholerae* 569В Инаба тангенциальной ультрафильтрацией, имеют под собой определенную практическую основу и являются актуальными.

Целью данной работы являлась разработка экспериментальной технологии концентрирования О-АГ и ХА штамма *V. cholerae* 569В Инаба из без-

микробного центрифугата методом тангенциальной ультрафильтрации.

Материалы и методы

При выполнении работы использовали производственный штамм *V. cholerae* 569В Инаба, продуцент ХА и О-АГ (Государственная коллекция патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб»), который выращивали при 37 °С в реакторе-ферментере Р170 объемом 250 дм³ на среде из ферментативного гидролизата казеина в условиях глубинного культивирования. Через 10 ч выращивание прекращали добавлением формалина до конечной концентрации 0,6 %. Для концентрирования О-АГ и ХА применяли установки для микро- и ультрафильтрации на базе фильтродержателя АСФ-009, снаряженной мембранными модулями с номинальной отсечкой по молекулярной массе (НОММ) 10, 20 и 50 кДа, с площадью фильтрации равной 0,1 м² и Vivaflow-200 (производства фирмы Sartorius, Германия) с мембранными модулями 30 и 100 кДа, с площадью фильтрации равной 0,02 м². Критерием окончания процесса выбрано уменьшение объема безмикробного центрифугата в 10 раз. Активность О-АГ холерного вибриона определяли в реакции иммунодиффузии в геле (РИД) по Оухтерлони и реакции непрямо́й агглютинации (РНГА) с О1-сывороткой. Активность ХА холерного вибриона устанавливали в РИД с антихолерогенной сывороткой (АХС) и по единицам связывания ана-

Таблица 1

Показатели, полученные при концентрировании с использованием мембранных модулей с различными НОММ

Показатель	Значение показателя, полученного при использовании мембранного модуля с НОММ, кДа														
	10			20			30			50			100		
	Ц	Ф	К	Ц	Ф	К	Ц	Ф	К	Ц	Ф	К	Ц	Ф	К
Активность О-АГ в РИД с О1-сывороткой, обратный титр	4	0	64	4	0	64	4	0	64	4	0	64	4	0	64
Активность ХА в РИД с АХС, обратный титр	2	0	32	2	0	32	2	0	32	2	0	32	2	1	4
Средняя удельная скорость фильтрации, $\text{дм}^3/\text{м}^2/\text{час}$	13			21			34			39			62		

Примечание. Ц – безмикробный центрифугат, Ф – фильтрат, К – концентрат.

токсина (ЕС), определенным при подкожном введении препарата кроликам массой $(2,7 \pm 0,25)$ кг.

Результаты и обсуждение

Первый этап работы был связан с оценкой возможности использования мембран с различными НОММ для концентрирования ХА и О-АГ. В предварительных экспериментах процесс ультрафильтрации проводили при давлении на входе и выходе фильтрационной установки равными $(1,5 \pm 0,1)$ и $(0,5 \pm 0,1)$ кгс/см² соответственно и температуре проведения процесса – (8 ± 2) °С. Объемы безмикробного центрифугата составляли по 10,0 дм³. Среднюю удельную скорость фильтрации определяли по объему фильтрата, удаленному за промежуток времени от начала до окончания процесса концентрирования. Результаты данного этапа исследований, представленные в табл. 1, показывают, что использование мембранного модуля с НОММ 100 кДа для концентрирования нецелесообразно, так как значительная часть ХА проходит в фильтрат. При использовании других мембранных модулей для концентрирования безмикробных центрифугатов содержание О-АГ и ХА в концентрате увеличивается в 16 раз, при этом О-АГ и ХА в фильтрате не обнаруживается. Наибольшая средняя удельная скорость фильтрации определена при использовании мембранного модуля с НОММ 50 кДа, что дало нам основание выбрать его для проведения дальнейших исследований.

Для определения возможной сорбции ХА и

О-АГ внутри пор мембранных модулей проводили их отмывку путем рециркуляции через установку дистиллированной воды объемом 0,5 дм³ в течение 60 мин. Промывочную воду исследовали на наличие ХА и О-АГ путем постановки РИД. В промывочной воде ХА и О-АГ не обнаружены, что дает основание предполагать, что они не сорбируются на мембранных модулях.

Выделение протективных антигенов из безмикробных центрифугатов, подвергнутых концентрированию, проводили с использованием ряда последовательно выполняющихся операций:

осаждение балластных фракций сернокислым аммонием при 37 % насыщении, после формирования осадка при комнатной температуре в течение ночи материал центрифугировали на центрифуге Beckman при 10000 g в течение 20 мин;

осаждение ХА и О-АГ из полученного центрифугата сернокислым аммонием при 80 % насыщении, после формирования осадка при комнатной температуре в течение ночи материал центрифугировали на центрифуге Beckman при 10000 g в течение 20 мин;

диализ полученного осадка против дистиллированной воды;

стерилизация отдиализованного осадка путем фильтрации через мембраны с размером пор 0,2 мкм и лиофилизация.

Выделение протективных антигенов из безмикробного центрифугата, не подвергавшегося концентрированию, проводили как описано выше, за исключением проведения процесса центрифугирования,

Таблица 2

Сравнительные показатели сухих препаратов О-АГ и ХА, полученных по регламентной технологии и с использованием мембранных модулей с различными НОММ

Показатель	Значение показателя, полученного по					Нормируемое значение показателя
	регламентной технологии	экспериментальной технологии при использовании мембран с НОММ, кДа				
		10	20	30	50	
Объем безмикробного центрифугата, дм ³	550	10	10	10	10	–
Активность препарата:						
по ЕС	6000	6000	5500	6000	6000	≥2000
в РНГА с О1-сывороткой, обратный титр	256	252	300	264	264	≥100
Вес препарата, г	122	2,5	2,6	2,5	2,4	“

Примечание. «–» – требования отсутствуют.

Таблица 3

Сравнительные показатели сухих препаратов О-АГ и ХА, полученных при различных температурах фильтрации и по регламентной технологии

Показатель	Значение показателя, полученного по			Нормируемое значение показателя
	регламентной технологии	экспериментальной технологии при различных температурах фильтрации, °С		
		20±2	37±2	
Активность препарата				
по ЕС	6000	6000	6500	≥2000
в РНГА с О1-сывороткой, обратный титр	256	264	256	≥100

осуществляемого на производственной центрифуге СГО-100 при 15000 g. Определенные показатели качества сухих препаратов представлены в табл. 2.

Анализируя данные, представленные в табл. 2, можно сделать выводы, что значения показателей сухих препаратов О-АГ и ХА, приготовленных по экспериментальной технологии, соответствуют нормируемым и значимо не отличаются друг от друга, а выход (по соотношению веса сухого полуфабриката на объем безмикробного центрифугата) незначительно превышает значения показателей препаратов О-АГ и ХА, полученных по регламентной технологии. Следует отметить, что в реализованном эксперименте количество сульфата аммония, затраченного на осаждение по регламентному способу, составило 334,4 кг, а по предлагаемому – 0,608 кг, т.е. в 10 раз меньше, исходя из объемов препаратов, подвергаемых осаждению.

Ранее нами [2] было показано, что процесс ультрафильтрации возможно интенсифицировать путем проведения процедуры «сканирования» давления. Для повышения эффективности процесса концентрирования ХА и О-АГ были проведены исследования по выбору рационального соотношения давления на входе и выходе фильтрационной установки. Проведенные исследования показали, что оптимальными параметрами для концентрирования ХА и О-АГ являются давление на входе равное (2,5±0,1) и на выходе (0,5±0,1) кгс/см² соответственно, что совпало с обоснованными параметрами при концентрировании О-АГ штамма *V. cholerae* М-41 Огава [1]. Установленные параметры позволили увеличить среднюю удельную скорость фильтрации с 39 до 58 дм³/м²/час при сохранении показателей качества определенных ранее.

В ряде работ [1, 3, 4] показано, что с повышением температуры скорость процесса фильтрации возрастает. В связи с этим для дальнейшей оптимизации процесса фильтрации, важное значение приобретали исследования по изучению температурных режимов концентрирования и их влияния на качество полупродуктов.

Дополнительно к ранее исследованному процессу фильтрации при температуре (8±2) °С, апробировано два температурных режима проведения концентрирования ХА и О-АГ – (20±2) и (37±2) °С. Средняя удельная скорость фильтрации составила: при температуре (20±2) °С – 56 дм³/м²/ч и (37±2) °С –

72 дм³/м²/ч. Активность лиофилизированных препаратов, как следует из данных табл. 3, полученных в эксперименте, соответствовала нормируемым значениям и существенно не отличалась от активности препаратов, полученных по регламентной технологии.

Таким образом, нами разработана экспериментальная технология концентрирования ХА и О-АГ штамма *V. cholerae* 569В Инаба из безмикробного центрифугата методом тангенциальной ультрафильтрации, которая позволяет снизить количество сульфата аммония, используемого для осаждения до 10 раз и получать препараты с показателями качества, отвечающими требованиям нормативной документации. Является перспективным применение разработанной технологии в производственном процессе получения вакцины холерной бивалентной химической таблетированной.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дытнерский Ю.И. Мембранные процессы разделения жидких смесей. М.: Химия; 1995. 252 с.
2. Комиссаров А.В., Еремин С.А., Алешина Ю.А. и др. Экспериментальная оценка использования метода ультрафильтрации по принципу «кросс-флоу» для концентрирования О-антигена в производстве холерной бивалентной химической вакцины. Пробл. особо опасных инф. 2011; 2(108):83–5.
3. Комиссаров А.В., Комоско Г.В., Лещенко А.А. и др. Изучение процесса стерилизующей фильтрации жидкого противосибирезвенного лошадиного глобулина. Биотехнология. 2002; 2:66–74.
4. Черкасов А.Н., Пасечник В.А. Мембраны и сорбенты в биотехнологии. Л.: Химия; 1991. 239 с.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Dytnersky Yu. I. [Membrane processes of liquid-mixture separation]. Moscow: Khimiya; 1995. 252 p.
2. Komissarov A.V., Eremin S.A., Aleshina Yu. A., Vasin Yu.G., Klokov O.D., Belyakova N.I. [Experimental evaluation of application of "cross-flow" ultrafiltration method for O-antigen concentrating in cholera chemical bivalent vaccine production]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2011; 2(108):83–5.
3. Komissarov A.V., Komosko G.V., Leshchenko A.A. et al. [Study of sterilization filtration process of the liquid anti-anthrax equine globulin]. Biotechnology. 2002; 2:66–74.
4. Cherkasov A.N., Pasechnik V.A. [Membranes and sorbents in biotechnology]. Leningrad: Khimiya; 1991. 239 p.

Authors:

Komissarov A.V., Eremin S.A., Ulyanov A.Yu., Aleshina Yu.A., Nikiforov A.K., Vasin Yu.G., Klokov O.D., Belyakova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Комиссаров А.В., Еремин С.А., Алешина Ю.А., Никифоров А.К., Васин Ю.Г., Клоков О.Д., Белякова Н.И., Ульянов А.Ю. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 20.10.10.

И.А.Кузьмиченко, О.В.Громова, М.Н.Киреев, Н.И.Белякова

НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ РАЗЛИЧИЯ МЕЖДУ ПРОИЗВОДСТВЕННЫМИ ШТАММАМИ-ПРОДУЦЕНТАМИ ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Выявлены определенные различия в биохимических свойствах производственных штаммов 569В серовара Инаба и М41 серовара Огава холерного вибриона. Разница заключалась в содержании белка в культуральной жидкости, в динамике ферментативной активности в процессе реакторного выращивания штаммов и касалась активности протеазы, фосфолипазы A_2 и С. Показана различная устойчивость ферментов обоих штаммов к детоксицирующему действию формальдегида. Установлена разница в ферментативной активности фракций, полученных методом изоэлектрического осаждения белков культуральной жидкости в диапазоне рН 3,5–4,4.

Ключевые слова: холерный вибрион, производственные штаммы, ферменты культуральной жидкости.

I.A.Kuz'michenko, O.V.Gromova, M.N.Kireev, N.I.Belyakova

Several Biochemical Differences between the Production Strains, Cholera Chemical Vaccine Producers

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Detected are several differences in biochemical properties of *V. cholerae* 569 B Inaba and *V. cholerae* M41 Ogawa productive strains. The differences are in the protein content in culture liquid, in the dynamics of enzyme activity in the process of reactor strain growth, and in the protease, phospholipase A_2 and C activity. Demonstrated is the diverse resistance of enzymes of both of the strains to formaldehyde detoxification effect. Identified is the difference in enzyme activity of fractions, which are obtained by means of isoelectric precipitation of culture liquid proteins within the limits of pH 3,5–4,4.

Key words: cholera vibrio, production strain, culture liquid enzymes.

Для производства коммерческой вакцины холерной бивалентной химической таблетированной используют в настоящее время два штамма *Vibrio cholerae* – 569В серовара Инаба и М41 серовара Огава. Первый из них эффективно секретирует в культуральную жидкость холерный токсин и обладает слабой протеолитической активностью, второй, источник О1 антигена Огава, является нетоксигенным, однако отличается высокой активностью протеаз. Эти характеристики можно рассматривать как индивидуальные особенности метаболизма данных производственных штаммов, в связи с чем представляло интерес выяснить существование других биохимических отличий между ними. Компоненты вакцины, получаемые из их культуральной жидкости или её концентрата путем осаждения серноокислым аммонием в достаточно широком интервале насыщения, содержат в своем составе и другие сопутствующие биологически активные вещества. В частности, среди них обнаружены различные ферменты, обладающие определенной антигенной активностью [2, 3]. Целью настоящей работы явилось сопоставление активности ряда ферментов, присутствующих в культуральной жидкости у штаммов 569В и М41 холерного вибриона, что позволит более полно охарактеризовать материал, идущий на изготовление вакцины.

Материалы и методы

В культуральной жидкости и осажденных из нее при различных значениях рН фракциях определяли активность протеазы, фосфолипаз A_2 и С, лизофосфо-

липазы, твиназы (липазы), ДНК-азы и РНК-азы. Для этого использовали набор плотных тест-сред с включенными в них соответствующими субстратами [4]. За единицу активности принимали количество внесенного в лунки материала (в мкг белка или в млрд м.к.), дающее в тест-среде вокруг лунок за 18–20 ч инкубации при 37 °С зону визуального изменения шириной 2 мм. Удельную активность выражали количеством единиц на 1 мг белка препарата или на 100 млрд м.к. Белок определяли по Лоури после осаждения его из проб трихлоруксусной кислотой. В опытах по изоэлектрическому осаждению белков культуральной жидкости полученные осадки, отделенные центрифугированием и растворенные в 0,05 М трис-буфере (рН 8,0), и надосадочную жидкость, сконцентрированную в 10 раз и нейтрализованную до рН 7,0, использовали для определения активности ферментов и белка. Наличие холерогена-анатоксина и О-антигена определяли в реакции иммунодиффузии (РИД) с антитоксической кроличьей сывороткой и кроличьей О-сывороткой при двукратном разведении препаратов и выражали в единицах – обратных титрах разведения, дающего видимую линию преципитации. Цифры в таблицах представляют собой среднее из данных по 3–5 реакторам. Статистическую обработку данных проводили общепринятыми методами.

Результаты и обсуждение

При производственном культивировании холерных вибрионов в реакторе глубинным способом на казеиновом бульоне (рН 8,0) с подкормкой глюко-

зой и добавлением аммиака длительность выращивания обоих штаммов была одинакова и составляла для достижения максимальной концентрации 10 ч. Конечная концентрация вибрионов по оптическому стандарту мутности была также практически одинакова – (73,7±4,0) млрд м.к./мл у штамма 569В и (75,9±3,4) млрд м.к./мл у штамма М41. За этот период в культуральную жидкость, наряду с целевыми антигенами, поступали внеклеточные соединения различной природы, в основном белковой. Как оказалось, по содержанию белка в культуральной жидкости штамм 569В в несколько раз превосходил штамм М41, показатели составляли соответственно (890±48) и (260±12) мг/л, что указывало на существенную разницу в способности экскретировать белоксодержащие компоненты во внешнюю среду, возможно, за счет холерогена.

Анализ микробных взвесей (равноценных по ферментативной активности культуральной жидкости) обоих штаммов показал, что в процессе выращивания в ней присутствовали все изучаемые ферменты, однако к окончанию выращивания уровень их активности заметно менялся. Показатели этой динамики даны в табл. 1.

Обращает на себя внимание существенное различие между штаммами не только по протеазной активности, но и по активности фосфолипаз A_2 и С, последняя во взвесах штаммов 569В вообще не обнаружена. Другим различием было поступательное нарастание удельной активности этих трех ферментов у штамма М41, чего не отмечали у штамма 569В. Активность остальных ферментов после достижения стационарной фазы роста заметно снижалась, возможно, за счет ослабления их биосинтеза или распада.

В процессе длительного (30 сут) детоксирования культуральной жидкости формальдегидом у штамма М41 происходила полная утрата активности ДНК-азы и РНК-азы и существенная утрата активности лизофосфолипазы. В то же время у штамма 569В эти ферменты, несмотря на продолжительность контакта с формальдегидом, стабильно сохраняли активность, которую позднее регистрировали на всех стадиях производственного цикла и в целевом продукте – таблетках.

В дальнейшем мы охарактеризовали активность ферментов культуральной жидкости во фракциях, полученных с помощью изоэлектрического осаждения путем изменения рН в области кислых значений [5]. Этот способ используется для получения холерного токсина [6]. Кроме того, известен способ выделения

О-антигена, остающегося в жидкой фазе, после предварительного осаждения белков из культуральной жидкости штамма М41 при рН 4,2 [1]. В смеси белков, какой является культуральная жидкость, при достижении изоэлектрической точки происходит соосаждение белков со сходными свойствами, поэтому представляло интерес выяснить, как ведут себя некоторые ферменты при изоэлектрическом осаждении у двух сравниваемых токсигенного и нетоксигенного штаммов. С этой целью мы в разных порциях культуральной жидкости штаммов 569В и М41 устанавливали с помощью 6 М НСl рН 3,5, рН 3,8, рН 4,1 и рН 4,4. Для лучшего формирования осадков к пробам добавляли гексаметофосфат до конечной концентрации 0,25 %.

У обоих штаммов, несмотря на установленное различное содержание белка в исходной культуральной жидкости, наблюдали общую закономерность – по мере ступенчатого повышения рН количество осажденного белка уменьшалось (в среднем от 83,7 % при рН 3,5 до 22,7 % при рН 4,4), в то время как количество неосаждаемого белка соответственно возрастало (в среднем от 12,9 % при рН 3,5 до 77,3 % при рН 4,4). Что касается активности, то из табл. 2 видно, что ее уровень у штамма М41 во всех вариантах опытов был в несколько раз выше, чем у штамма 569В, за исключением твиназы в осадке при рН 3,5. В этих опытах мы сравнивали активность четырех ферментов, поскольку у остальных активность после детоксирования падала.

Слабоактивная протеаза у штамма 569В частично осаждалась только при рН 4,4. Однако в основном она присутствовала в центрифугате с рН 3,5 и 4,4. Высокоактивная протеаза у штамма М41 обнаружена во всех осадках, но основная ее доля также оставалась в растворе. Сходную картину наблюдали и в отношении активности фосфолипазы A_2 – она лишь частично осаждалась при кислых значениях рН, но наибольшей активностью в каждом варианте обладали центрифугаты, что может свидетельствовать о более высокой степени чистоты фермента после осаждения балластных белков.

Определенный интерес представляют данные по фосфолипазе С – у штамма М41 этот фермент заметно уступал по активности фосфолипазе A_2 , а у штамма 569В он не обнаружен ни в одной фракции. Существенно, что метод изоэлектрического осаждения у штамма М41 позволил разделить активность обеих фосфолипаз за счет отсутствия фосфолипазы С в надосадочной жидкости при рН 3,5 и 3,8.

Что касается двух основных антигенов холер-

Таблица 1

Начальная и конечная активность ферментов в культуральной жидкости штаммов 569В и М41 при выращивании в реакторе

Штамм	Удельная активность фермента на 100 млрд м.к.*						
	протеаза	фосфолипаза A_2	фосфолипаза С	лизофос-фолипаза	твиназа	ДНК-аза	РНК-аза
569В	1,7–2,2	4,5–1,9	0	3,2–1,8	5,0–2,6	5,3–1,4	9,1–5,3
М41	2,9–14,3	4,5–25,0	2,4–14,3	3,6–1,9	5,3–1,5	9,1–1,6	10,0–3,6

*Первая цифра в графе указывает удельную активность при ее появлении в культуральной жидкости (от 5 до 7 ч), вторая – активность по окончании выращивания (10 ч).

Распределение ферментативной активности во фракциях, полученных из культуральной жидкости штаммов 569В и М41 осаждением при кислых значениях pH

Фермент	Белок из культуральной жидкости	осаждением при кислых значениях pH							
		pH, при котором проведено осаждение							
		pH 3,5		pH 3,8		pH 4,1		pH 4,4	
		Удельная активность фермента на мг белка у штаммов							
		569В	М41	569В	М41	569В	М41	569В	М41
Протеаза	Осажденный	0	6,4	0	31,7	0	35,8	3,9	77,8
	Неосаждаемый	52,6	454,5	0	312,5	0	222,2	6,8	1785,7
Фосфолипаза A ₂	Осажденный	0	12,8	2,3	31,7	2,6	71,9	7,8	155,0
	Неосаждаемый	833,3	3636,4	227,3	1234,6	72,5	666,7	54,5	1265,8
Фосфолипаза С	Осажденный	0	3,2	0	10,6	0	18	0	19,4
	Неосаждаемый	0	0	0	0	0	55,6	0	210,5
Твиназа	Осажденный	18,3	3,2	0	2,7	0	3,0	0	0
	Неосаждаемый	52,6	54,5	14,1	155,0	9,1	55,6	6,8	210,5

ной вакцины – холерогена-анатоксина и О-антигена, их распределение по изучаемым фракциям было следующим. Наибольшая серологическая активность холерогена-анатоксина была сосредоточена в осадке при pH 3,5 и составила 4–8 ед. Титры О-антигенов Инаба и Огава в осадках в основном были ниже (2–4 ед.), чем в надосадочной жидкости. В ней наибольшая серологическая активность отмечена при pH 3,5 для О-антигена Инаба (16–32 ед.) и при pH 3,5 и 3,8 для О-антигена Огава (32 ед.). Такой способ осаждения удобен именно для выделения О-антигенов, поскольку, как упомянуто выше, при этих значениях pH осаждалась большая часть сопутствующих белков культуральной жидкости.

Таким образом, выявлены определенные различия в биохимических свойствах производственных штаммов 569В серовара Инаба и М41 серовара Огава. Значительную разницу в содержании белка, экскретируемого в культуральную жидкость, можно рассматривать как положительный фактор – более высокое содержание белка у штамма 569В благоприятно для выделения белкового холерогена-анатоксина, а его низкое содержание у штамма М41 более благоприятно для выделения О-антигена. Основное различие в ферментативной активности между штаммами проявлялось уже на стадии выращивания вибрионов в реакторе и касалось протеазы, фосфолипаз A₂ и С. Последний фермент не обнаружен в культуральной жидкости штамма 569В, однако это не вызвано отсутствием его биосинтеза, так как после концентрирования материала серноокислым аммонием выявляли невысокую активность фосфолипазы С. В то время как у штамма М41 удельная активность протеазы, фосфолипазы A₂ и С нарастала до окончания выращивания, у штамма 569В она снижалась. Но при этом ряд ферментов штамма 569В оказался более устойчив к длительному контакту с формальдегидом по сравнению с аналогичными ферментами штамма М41. Метод изоэлектрического осаждения, примененный в данной работе, позволил не только выявить разницу между штаммами по фракциям, но и показал, что ферменты лишь частично соосаждаются с другими белками, а основная доля их активности остается в жидкой фазе. Кроме того, данный метод осаждения позволил

получить у штамма М41 препарат с активностью фосфолипазы A₂, свободный от фосфолипазы С, подтвердив самостоятельность этого фермента. Что касается О-антигена, то согласно полученным данным оптимальным для его очистки от белков культуральной жидкости является их изоосаждение при pH 3,5–3,8.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Дятлов И.А., Елисеев Ю.Ю., Киреев М.Н., Космаенко О.М. Способ получения О-антигена холерного очищенного. Патент РФ № 2143280. Опубл. 27.12.99. Бюл. 36.
2. Джапаридзе М.Н., Сумароков А.А., Мартенс Л.А., Егорова В.Д., Караева Л.Т., Дертеева И.И. и др. Иммунохимическая и биохимическая характеристика профилактического препарата против холеры холерогена-анатоксина. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1976; 5:32–7.
3. Джапаридзе М.Н., Наумов А.В., Никитина Г.П., Мелещенко М.В., Доброва В.Г., Заворотных В.И. и др. Оральная химическая вакцина из гипертоксигенных штаммов КМ-76 Инаба и КМ-68 Огава возбудителя холеры. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1991; 4:31–3.
4. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Киреев М.Н., Белякова Н.И., Клокова О.Д. Тест-среды для определения активности твиназы, протеазы и фосфолипазы в холерной химической вакцине и ее компонентах. Пробл. особо опасных инф. 2002; 1(83):148–53.
5. Скоупс Р. Методы очистки белков. М.: Мир; 1985. 358 с.
6. Mekalanos J.J., Collier R.J., Romig W.R. Purification of cholerae toxin and its subunits: new methods of preparation and the use of hypotoxinogenic mutants. Infect. Immun. 1978; 20:552–9.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Gromova O.V., Dzharipidze M.N., Dyatlov I.A., Eliseev Yu.Yu., Kireev M.N., Kosmaenko O.M. [Method of obtainment of cholera O-antigen purified]. RF Patent 2143280. 27 Dec 1999.
2. Dzharipidze M.N., Sumarokov A.A., Martens L.A., Egorova V.D., Karaeva L.T., Derteva I.I. et al. [Immunochemical and biochemical characteristics of prophylactic cholera-anatoxin preparation]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 1976; 5:32–7.
3. Dzharipidze M.N., Naumov A.V., Nikitina G.P., Meleshchenko M.V., Dobrova V.G., Zavorotnykh V.I. et al. [Oral chemical vaccine obtained from the hyper-toxicogenic cholera agent strains KM-76 Inaba and KM-68 Ogawa]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 1991; 4:31–3.
4. Kuz'michenko I.A., Gromova O.V., Dzharipidze M.N., Kireev M.N., Belyakova N.I., Klokova O.D. [Test-media for the identification of tweenase, protease and phospholipase activity in cholera chemical vaccine and its components]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2002; 83:148–53.
5. Skoups R. [Methods of protein purification]. M.: Mir; 1985. 358 p.

Authors:

Kuz'michenko I.A., Gromova O.V., Kireev M.N., Belyakova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Киреев М.Н., Белякова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 15.03.10.

А.К.Никифоров, О.А.Волох, С.А.Еремин, Т.В.Алёнкина

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* ПО УРОВНЮ ПРОДУКЦИИ КАПСУЛЬНОГО АНТИГЕНА ЧУМНОГО МИКРОБА*Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

Рекомбинантный штамм *Yersinia pestis* KM277(EV11MpFSK-3) Km^r, является перспективным штаммом-продуцентом капсульного антигена (Ф1) поскольку его продуктивные свойства и иммунохимическая активность синтезируемого им антигена Ф1 была выше, чем у *Y. pestis* EV и его производных. Несомненным преимуществом штамма *Y. pestis* KM277 является его способность к синтезу Ф1 при температуре 28 °С и отсутствие у него собственных плазмид чумного микроба. Разработана схема масштабированного культивирования рекомбинантного штамма и получения препарата капсульного антигена.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, капсульный антиген (Ф1), культивирование.

A.K.Nikiforov, O.A.Volokh, S.A.Eremin, T.V.Alenkina

Comparative Assessment of *Yersinia pestis* Strains on the Level of Plague Microbe Capsular Antigen Production*Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov*

Yersinia pestis recombinant strain KM277 (EV11MpFSK-3) Km^r is a potential producer-strain of capsular antigen (F1), since its productive properties and immunochemical activity of F1-antigen, synthesized by it, are higher than in *Y. pestis* EV and its derivatives. The apparent advantage of the *Y. pestis* KM277 strain is the ability to synthesize F1 antigen at 28 °C, and the absence of its own plague-microbe plasmids in cells. Worked out is the scheme of scaled cultivation of the recombinant strain and obtainment of capsular antigen preparation.

Key words: *Yersinia pestis*, capsular antigen (F1), cultivation.

Существование природных очагов чумы, занимающих значительные территории (6–7 % суши), в т.ч. на территории Российской Федерации имеется 11 природных очагов (общей площадью более 250 тыс. км²), обуславливает потенциальную опасность эпидемических вспышек заболевания чумой [7], и в этой связи необходимость усовершенствования диагностических и профилактических препаратов. Одним из практически значимых антигенов чумного микроба является видоспецифический капсульный антиген – фракция 1 (Ф1), на основе которого созданы и длительное время успешно применяются на практике антигенные и иммуноглобулиновые диагностикумы для постановки серологических реакций [6], и интенсивно разрабатываются новые тест-системы [10].

В качестве штаммов продуцентов Ф1 нами были изучены изогенные производные штамма *Y. pestis* EV, утратившие ряд собственных плазмид, но несущих плазмиду pFra: *Y. pestis* KM225 (pFra⁺ pCad⁻ pPst⁻); *Y. pestis* KM226 (pFra⁺ pCad⁺ pPst⁻); *Y. pestis* KM227 (pFra⁺ pCad⁻ pPst⁺), сконструированные О.А.Проценко, и генно-инженерный штамм *Y. pestis* 277 (EV11MpFSK-3) Km^r. Ранее сообщалось о суперпродукции антигена Ф1 генно-инженерными штаммами *Y. pestis* со встроенной плазмидой pFSK3 по результатам серологических реакций и при выращивании на плотных питательных средах [1].

Выращивание на твердых питательных средах штаммов-продуцентов нетехнологично, поэтому сравнительная оценка испытуемых штаммов по способности накапливать биомассу и продукции Ф1 была

проведена в условиях бифазного и глубинного культивирования (малообъемного и масштабированного).

Материалы и методы

Биомассу выращивали в бифазной системе на флаконах, в качестве питательной среды использовали агар и бульон Хоттингера, pH 7,2 (10:1). Культивирование проводили в течение 72 ч при температуре 37 °С для штаммов *Y. pestis* EV и изогенных производных, 28 °С – для *Y. pestis* KM277. Малообъемное культивирование штаммов осуществляли в колбах (250 мл) на бульоне Хоттингера (pH 7,2) с механическим перемешиванием на термостатируемой качалке RC-ТК (США) при температуре 37 и 28 °С для KM277 в течение 24 ч. При культивировании *Y. pestis* KM277 во всех случаях в питательную среду добавляли канамицин. Масштабированное культивирование проводили в производственных условиях на реакторе У-6. Препараты капсульного антигена получали из инактивированной формалином биомассы. Выделение Ф1 из культуральной жидкости проводили методом изоэлектрической преципитации [4, 8] и осаждением сульфатом аммония [2], из клеточной массы – экстракцией и осаждением солевыми растворами [9]. Все полученные препараты Ф1 были лиофилизированы.

Контроль продукции капсульного антигена штаммами-продуцентами, а также активность препаратов на этапах получения осуществляли серологически в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с

эритроцитарным чумным иммуноглобулиновым диагностикумом (ФГУ ЦНИИ МО РФ, Киров) и реакции диффузионной преципитации (РДП) по Оухтерлони со специфическими чумными сыворотками коммерческих и экспериментальных серий. В качестве контроля использовали препараты Ф1, полученные из клеток агаровой культуры штамма *Y. pestis* EV.

Результаты и обсуждение

При малообъемном культивировании показано (рис. 1), что изогенные производные штамма *Y. pestis* EV превосходят по накоплению биомассы родительский штамм в 2,5–5 раз и по интенсивности выделения Ф1 в среду культивирования в 2–2,3 раза. Преимущество *Y. pestis* KM227 связано, в основном, с высокой скоростью роста и большим накоплением биомассы, хотя по уровню экскреции в среду Ф1 он значительно уступает родительскому штамму, что согласуется с литературными данными [4]. В то же время штамм *Y. pestis* KM277 превосходит все испытываемые штаммы по интенсивности экскреции Ф1 и отличается способностью продуцировать Ф1 при температуре 28 °С. Кроме того, у него отсутствуют все собственные плазмиды чумного микроба. Все эти качества позволяют считать данный штамм наиболее перспективным для использования в производстве чумной химической вакцины в качестве продуцента Ф1.

При анализе полученных данных обращает на себя внимание несовпадение высокого уровня секреции Ф1 в среду штаммом *Y. pestis* KM277 с незначительным выходом биомассы с единицы объема питательной среды. По нашему мнению, подобный феномен можно объяснить, опираясь на следующие данные: сверхсинтез продуктов метаболизма идет только в ограниченных условиях питания и, как правило, во вторую фазу роста периодических культур, когда рост биомассы замедляется или даже останавливается, а скорость синтеза антигенов увеличивается.

Все препараты Ф1, полученные из супернатанта

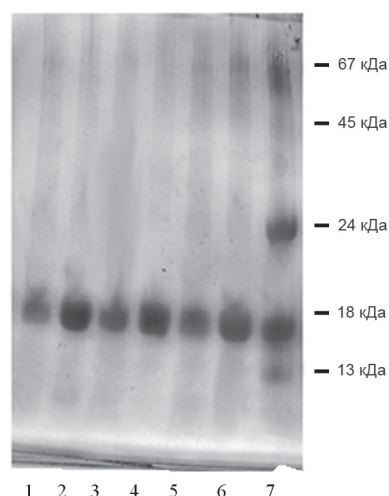


Рис. 1. Накопление биомассы и продукция Ф1 различными штаммами *Y. pestis* в условиях малообъемного культивирования

бульонной культуры различными методами, во всех испытанных концентрациях (0,25–20 мг/мл) давали в РДП одну зону преципитации, идентичную зоне преципитации, образуемой препаратами Ф1, полученными по методу E. Baker [9] из клеток агаровой культуры *Y. pestis* EV, что указывает на иммунохимическую гомогенность изучаемых препаратов Ф1. Для доказательства идентичности препаратов капсульного антигена, выделенных из клеток и супернатанта бульонной культуры штаммов *Y. pestis* EV и *Y. pestis* KM277, провели их сравнительный анализ в SDS-PAG электрофорезе. Полученные данные показали идентичность белкового профиля препаратов Ф1, выделенных из вакцинного и рекомбинантного штаммов осаждением сульфатом аммония и в изоэлектрической точке (рис. 2). Во всех препаратах регистрировался один мажорный белок с молекулярной массой около 17 кДа.

При использовании бифазной системы культивирования для получения биомассы *Y. pestis* KM277 и *Y. pestis* EV с последующим выделением препаратов Ф1 из клеток и культуральной жидкости были получены аналогичные результаты. Серологическая активность капсульного антигена у *Y. pestis* KM277 была выше, чем у *Y. pestis* EV как в самой биомассе, так и в культуральной жидкости и клетках: в РПГА в 100, 10 и 4 раза соответственно. Масса ацетонвысушенных клеток штамма KM277 была на 11,5 % больше, чем EV. Концентрация белка в препарате Ф1 из культуральной жидкости KM277 в 2,2 раза больше, чем из EV, в препаратах из клеток количество белка было одинаково (32 ± 1 мг/мл). Серологическая активность в системе РПГА-РНАт у препаратов Ф1 из штамма KM277 была выше в 4 раза (из ацетонвысушенных клеток) и в 100–200 раз (из культуральной жидкости) по сравнению с препаратами из штамма EV. Показана электрофоретическая (белковый профиль) и иммунохимическая идентичность препаратов Ф1 из штамма KM277 и EV.

На основе полученных из бульонной культуры препаратов Ф1 приготовлены экспериментальные

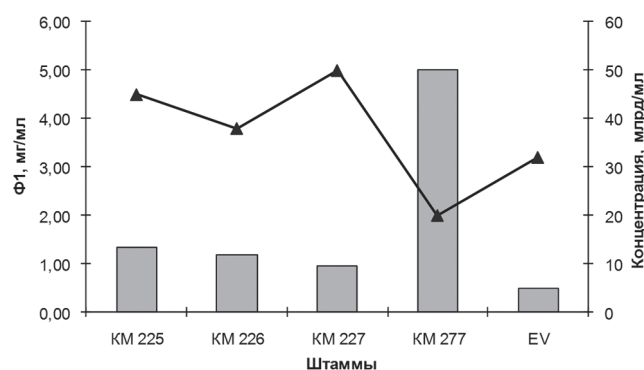


Рис. 2. Электрофореграмма препаратов Ф1, выделенных из штаммов *Y. pestis* KM 277 и *Y. pestis* EV: 1–3 – Ф1 *Y. pestis* KM277; 4–6 – Ф1 *Y. pestis* EV (1, 4 – из клеток; 2, 5 – из культуральной жидкости осаждением сульфатом аммония; 3, 6 – из культуральной жидкости изоэлектрической преципитацией); 7 – маркеры молекулярного веса

серии (по 3 из Ф1 каждого штамма) химической чумной вакцины (ХЧВ), состоящей из Ф1 и ОСА (основного соматического антигена) [3]. В «остром» эксперименте показано, что однократная иммунизация препаратами всех серий ХЧВ обеспечивала выживаемость белых мышей при заражении их вирулентным штаммом *Y. pestis* 231 в дозе 5000 м.к. (ID₅₀ = 25 м.к.). Причем серии вакцины с Ф1, выделенной из штамма *Y. pestis* KM277, обеспечивали защиту от заражения чумой с такой же активностью, как и серии ХЧВ с Ф1 из штамма *Y. pestis* EV (ЕД₅₀ (0,23±0,1) и (0,16±0,1) ч/д соответственно). Отмечалось достоверное увеличение продолжительности жизни иммунизированных животных ((12±0,5) и (16±0,5) сут для серий ХЧВ с препаратами Ф1 из штаммов 277 и EV соответственно) по сравнению с контрольной группой (3,4±0,2) сут.

Следующим этапом было проведение масштабированного культивирования рекомбинантного и вакцинного штаммов с последующим выделением препаратов Ф1. Накопление биомассы *Y. pestis* EV и *Y. pestis* KM277 осуществляли в реакторе У-6 с объемом питательной среды 125 л в бульоне из гидролизатов животного белка (рН 7,4) при температуре 37 и 28 °С соответственно. В результате через 28 ч культивирования штамма *Y. pestis* EV получено 100 л биомассы с концентрацией 10 млрд м.к./мл, активность Ф1 составила 1/4 в РДП с чумной агглютинирующей сывороткой, 1/10⁴ в РНГА, количество бактериальной массы – (610±5) г, после лиофилизации – (97±2) г. Тогда как через 22 ч культивирования рекомбинантного штамма *Y. pestis* KM277 получено 100 л биомассы с концентрацией 35 млрд м.к./мл, активность Ф1 в культуральной жидкости составила 1/128 в РДП, 1/10⁶ в РНГА, количество бактериальной массы (2200±5) г, после лиофилизации – (356±2) г.

Использование этапа концентрирования на ультрафильтрационной колонке F10HPS с полисульфоновыми волокнами для получения препарата Ф1 чумного микроба из культуральной жидкости позволяет без потерь сконцентрировать продукт в 40 раз [5]. Концентрация белка и специфическая активность Ф1 в полученных препаратах капсульного антигена из рекомбинантного штамма значительно выше, чем в препаратах из штамма *Y. pestis* EV (белок (15,2±0,1) мг/мл с >10⁹ АЕ/мг и (2,0±0,1) мг/мл с 1,6·10⁶ АЕ/мг соответственно). Из лиофилизированной клеточной массы также были выделены препараты Ф1. В этом случае содержание белка не зависело от штамма-продуцента – (6,9±0,5) мг на 1 г сухих клеток, но активность была выше в 4–8 раз у препарата из рекомбинантного штамма. Учитывая большой выход клеточной массы в последнем случае, получение антигенного препарата из сухих клеток является целесообразным, т.к. увеличивает общий выход продукта на 30–35 %.

В результате проведенных исследований установлено, что штамм *Y. pestis* KM277 превосходит штамм *Y. pestis* EV и его производные по способно-

сти синтеза в среду капсульного антигена в условиях глубинного культивирования и может быть использован в качестве продуцента Ф1 для оптимизации производства диагностических и профилактических препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимов А.П., Никуфоров А.К., Еремин С.А., Дроздов И.Г. Конструирование штамма *Yersinia pestis* с повышенной протективностью. Бюл. экп. биол. и мед. 1995; 11:27–31.
2. Вейнблат В.И., Дальвадянт С.Н., Веренков М.С. Методы выделения и очистки капсульного антигена и эндотоксина возбудителя чумы. Лаб. дело. 1983; 12:37–9.
3. Дальвадянт С.М., Филиппов А.Ф., Белобородов Р.А., Огарев Н.Н. Эффективность сочетанной иммунизации морских свинок против чумы препаратами фракции 1 и основного соматического антигена. Пробл. особо опасных инф. 1977; 3(55):105–12.
4. Дятлов И.А., Филиппов А.Ф., Бондаренко Л.Н. и др. Использование изогенной системы штаммов чумного микроба в технологии получения антигенов. В кн.: Генетика, микробиология и совершенствование методов лабораторной диагностики особо опасных инфекций. Саратов; 1991. С. 71–7.
5. Еремин С.А., Волох О.А., Шенелёв И.А. и др. Разработка новых технологических схем и масштабирование процессов получения антигенов чумного и туляреминого микробов. Пробл. особо опасных инф. 2006; 2(92):58–61.
6. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: Медицина; 2009. С. 27–61.
7. Попов Н.В., Куклев Е.В., Кутырев В.В. Тенденции эпизоотической активности природных очагов чумы России и стран СНГ в начале XXI столетия. Эпидемиол. и инф. бол. 2006; 2:7–10.
8. Титенко М.М., Вейнблат В.И., Веренков М.С., Васенин А.С. Препаративный метод выделения и очистки капсульного антигена возбудителя чумы при помощи изоэлектрической преципитации. В кн.: Диагностика и профилактика особо опасных инфекций. Саратов; 1983. С. 34–9.
9. 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.
10. Li B.D., Zhou Z., Wang Z. et al. Antibody profiling in plague patients by protein microarray. Microbes Infect. 2008; 10:45–51.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Anisimov A.P., Nikiforov A.K., Eremin S.A., Drozdov I.G. [Constructing of the *Yersinia pestis* strain with heightened (enhanced) protective capacity]. Byul. Eksp. Biolog. Med. 1995; 11:27–31.
2. Veynblat V.I., Dal'vadyants S.N., Verenkov M.C. [Methods of isolation and purification of plague-agent capsular antigen and intracellular toxin]. Lab. Delo. 1983; 12:37–9.
3. Dal'vadyants S.N., Filippov A.F., Beloborodov R.A., Ogarev N.N. [Effectiveness of the complex Guinea-pig immunization by anti-plague F1 and basic O-antigen preparations]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 1977; 55:105–12.
4. Dyatlov I.A., Filippov A.F., Bondarenko L.N. et al. [Application of the isogenic system of plague-agent strains in the process of antigen obtainment]. In: [Genetics, Microbiology, and Development of Methods of Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infections]. Saratov; 1991. P. 71–7.
5. Eremin S.A., Volokh O.A., Shepelev I.A. et al. [Developing of the new technological schemes, and scaling of the processes of plague and tularemia antigens' obtainment]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2006; 92:58–61.
6. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Guidelines]. M.: Meditsina; 2009. P. 27–61.
7. Popov N.V., Kuklev E.V., Kutyrev V.V. [Tendencies of epizootic activity of plague natural foci in the Russian Federation and CIS countries in early XXI century]. Epidem. Infek. Bol. 2006; 2:7–10.
8. Titlenko M.M., Veynblat V.I., Verenkov M.C., Vasenin A.S. [Preparation method of isolation and purification of plague-agent capsular antigen by means of isoelectric precipitation]. In: [Diagnostics and Prophylaxis of Particularly Dangerous Infections]. Saratov; 1983. P. 34–9.

Authors:

Nikiforov A.K., Volokh O.A., Eremin S.A., Alenikina T.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Никуфоров А.К., Волох О.А., Еремин С.А., Алёнкина Т.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 13.03.10.

И.А.Шепелёв, С.А.Еремин, Ю.Г.Васин, О.А.Волох, Т.В.Алёнкина, Н.И.Белякова, Е.М.Кузнецова, А.К.Никифоров

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОЦЕССОВ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ ДЛЯ МАСШТАБИРОВАННОГО ПОЛУЧЕНИЯ ОСНОВНЫХ АНТИГЕНОВ ЧУМНОГО МИКРОБА И ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Показана возможность применения ультрафильтрационных технологий при выделении холерного токсина и капсульного антигена чумного микроба в производственных условиях. Применение методов ультрафильтрации позволяет снизить потери на этапах выделения и очистки антигенных препаратов, концентрирование сырья или полуфабриката позволяет уменьшить трудозатраты, что ведет к повышению производительности и экономической эффективности.

Ключевые слова: ультрафильтрация, концентрирование, холерный токсин, капсульный антиген (Ф1).

I.A.Shepelev, S.A.Eremin, Yu.G.Vasin, O.A.Volokh, T.V.Alenkina, N.I.Belyakova, E.M.Kuznetsova, A.K.Nikiforov

Prospects for Application of Ultrafiltration Technology for the Scaled Preparation of Plague Microbe and Cholera Vibrio Major Antigens

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Demonstrated is the possibility of application of ultrafiltration technologies in the process of cholera toxin and plague agent capsular antigen precipitation under production conditions. Application of ultrafiltration techniques permits of the reduction of losses at the stages of isolation and purification of antigen preparations; and concentration of raw material or semi-finished product provides for the reduction of labor inputs. Thus it leads to the increase in productivity and economical efficiency.

Key words: ultrafiltration, concentration, cholera toxin, capsular antigen (F1).

Появление огромного количества новых фильтрующих материалов сделало баромембранные процессы, прежде всего метод ультрафильтрации, незаменимым в процессах биосепарации благодаря высокой производительности и малой энерго- и трудозатратности по сравнению с разделением с помощью органических растворителей, солей или дифференциальных методов центрифугирования. Ультрафильтрационная технология разделения растворов известна давно, она успешно применяется в пищевой, химической, биотехнологической и других отраслях промышленности, а также в производстве лекарственных средств [3, 9], широко используется в лабораторной практике при выделении антигенов как белковой, так и липополисахаридной природы [6, 7, 12].

Сотрудниками РосНИПЧИ «Микроб» разработана экспериментальная установка на основе ядерных ультрафильтрационных мембран для получения очищенного холерного экзотоксина [4]. Имеются данные о применении для концентрирования, диализа и диафильтрации ультрафильтрационного волоконного аппарата марки УВА-ПС-20-1040 (Россия) производительностью по дистиллированной воде 415 л/ч (предел исключения 20 кДа), при получении О-антигена холерного вибриона, что позволило повысить эффективность данного производственного этапа за счет сокращения времени на выполнение и количества расходных материалов при сохранении концентрации и биологической активности препарата [2].

В настоящее время в РосНИПЧИ «Микроб» ультрафильтрация на колонках с полыми волокнами используется при производстве химической холерной таблетированной вакцины (концентрирование культуральной жидкости холерного вибриона, диафильтрация О-антигена) и антирабического гетерологичного иммуноглобулина (диализ антирабического иммуноглобулина от этанола).

Целью наших исследований являлась оценка возможности использования ультрафильтрации на этапах выделения холерного токсина (ХТ) и капсульного антигена (Ф1) чумного микроба.

Материалы и методы

Препарат холерного токсина получали из производственного штамма-продуцента коммерческой оральной холерной химической бивалентной вакцины института «Микроб» *Vibrio cholerae* 569 В биовара Инаба О1 (ХТ+, ТСП+) классического серовара.

Культивирование штамма *V. cholerae* 569 В биовара Инаба проводили в реакторе (500 л) в производственных условиях, разработанных для холерной химической вакцины, на казеиновом бульоне, pH 7,8±0,2. Выращивание культуры в реакторе прекращали через (10,5±0,5) ч в стационарной фазе роста микробной популяции. Биомассу инаktivировали формалином (0,6 %). Для выделения ХТ использовали 30 л культуральной жидкости. Безмикробный

прозрачный центрифугат, полученный на сепараторе АСГ 3М при 9000 об./мин, подвергали стерилизующей мембранной фильтрации с использованием фильтра Сальникова с 8 стерилизующими пластинами СФ и определяли специфическую стерильность. Концентрацию ХТ и О-антигена на всех этапах выделения контролировали с помощью реакций диффузной преципитации (РДП) и непрямой гемагглютинации (РНГА) с антитоксической (АХС) и холерными О-сыворотками. Активность токсина определяли биологическим методом – постановкой реакции Крейга на кроликах породы шиншилла.

Препарат Ф1 получали из штамма-продуцента живой чумной вакцины *Yersinia pestis* EV (pFra+, pCad+, pPst+) и рекомбинантного штамма *Yersinia pestis* KM277(EV11MpFSK-3) Km^r. Штаммы получены из ГКПБ «Микроб». В предварительных малообъемных экспериментах нами была показана перспективность использования рекомбинантных штаммов-продуцентов Ф1 чумного микроба, в частности штамма *Y. pestis* KM 277, который отличался высоким уровнем синтеза антигена по сравнению с *Y. pestis* EV [3].

Накопление биомассы вакцинного штамма чумного микроба осуществляли в реакторе У-6 (250 л) с объемом питательной среды 125 л (Россия) на бульоне Хоттингера или казеиновом бульоне, pH 7,4. Выращивание проводили в течение 27 ч при температуре 37 °С при непрерывной аэрации и механическом перемешивании. В результате через 28 ч культивирования было получено 100 л биомассы с концентрацией 10 млрд м.к./мл, активность Ф1 составила 1/4 в РДП с чумной лошадиной агглютинирующей сывороткой. Глубинное культивирование штамма *Y. pestis* KM 277 проводили по аналогичной для вакцинного штамма схеме с модификациями. Температура выращивания в этом случае составляла 28 °С, в питательную среду на всех этапах культивирования добавляли канамицин (до 25 ед./мл). В результате через 22 ч культивирования было получено 100 л биомассы с концентрацией 35 млрд м.к./мл, активность Ф1 составила 1/128 в РДП с чумной лошадиной агглютинирующей сывороткой, 1/10⁶ в РНГА.

Биомассу в обоих случаях инактивировали формалином (0,6 %). После определения специфической стерильности культуральную жидкость отделяли от клеточек на сепараторе АСГ 3М при 9000 об./мин, а затем фильтровали через патронный фильтр 0,22 микрон («Технофильтр», Россия).

Концентрацию белка на всех этапах получения ХТ и Ф1 определяли по методу Лоури при 750 нм с применением набора реактивов «Bio-Rad DC Protein Assay» (США).

Результаты и обсуждение

Стандартная схема выделения холерного токсина из стерильного фильтрата культуральной жидкости штамма *V. cholerae* 569 В биовара Инаба включает в себя осаждение при низком значении pH в присутствии гексаметафосфата натрия (ГМФ), сепарацию и диализ в течение 24 ч, с последующей очисткой препарата ионообменной хроматографией на фосфоцеллюлозе [10, 11]. Недостатками является работа с большими объемами сырья, что значительно затрудняет и удорожает первоначальный этап осаждения ХТ.

В нашей работе было подобрано ультрафильтрационное оборудование для получения освобожденного от примесей и концентрированного сырья. В процессе выделения холерного токсина из культуральной жидкости штамма *V. cholerae* 569 В биовара Инаба с использованием ультрафильтрации культуральную жидкость (28,5 л), после стерилизующей фильтрации и контроля специфической стерильности, пропускали через ядерные мембраны 500 Å (вместо снятых с производства УАМ-500) по описанной ранее методике [4]. На этом этапе проходило отсечение фракции, содержащей О-антиген. Концентрирование полученного фильтрата проводили на ультрафильтрационной колонке F10HPS с полисульфоновыми волокнами («Fresenius», Германия, пропускающая способность от 0 до 20 кДа). Из полученного концентрата объемом 700 мл осаждали ХТ методом изоэлектрической преципитации в присутствии ГМФ [11] и диализовали.

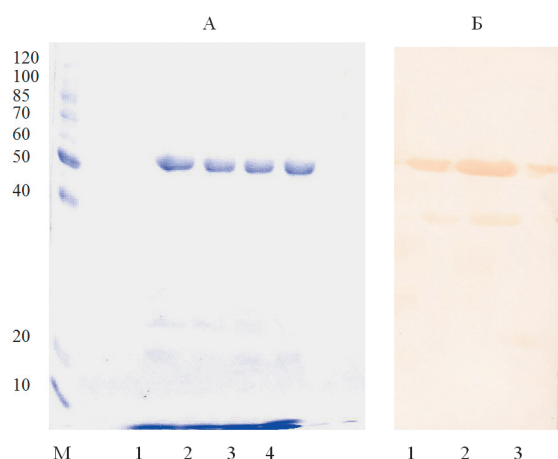
В табл. 1 представлен анализ содержания холерного токсина и О-антигена на этапах выделения

Таблица 1

Анализ содержания холерного токсина и О-антигена на этапах выделения из культуральной жидкости штамма *V. cholerae* 569 В биовара Инаба

Проба	РДП АХС сер 08	РДП «О» сер 42	Белок, мг/мл	РНГА АХС 0,8	РНГА «О» сер 65	Реакция Крейга
Культуральная жидкость	1/4	1/4 ± 1/8	0,90	<1/10	±1/40	96000
Мембранная ультрафильтрация						
Фильтрат	1/4	–	0,14	±1/40	±1/40	64000
Концентрат	1/2	1/32	0,76	<1/10	<1/100	32000
Колоночная ультрафильтрация						
Фильтрат	–	–	0,02	–	–	–
Концентрат	1/128 ± 1/256	1/4	6,9	1/640	1/160	128000
Холерный токсин жидкий	1/320 ± 1/640	–	3,5	>1/1792	<1/10	128000
Холерный токсин сухой	1/320	–	3,3	1/832	–	>128000

Примечание: «–» – отрицательный результат; реакция Крейга – усредненный обратный титр.



SDS-PAGE (А) и иммуноблоттинг (Б) препаратов ХТ, полученных различными методами:

1, 4 – препарат ХТ, полученный методом ультрафильтрации, 2 – методом мембранной фильтрации, 3 – без использования фильтрационных методов, М – маркеры от 10 до 200 кДа («Fermentas», EU)

из культуральной жидкости штамма *V. cholerae* 569 В биовара Инаба с использованием процессов ультрафильтрации. На этапе мембранной фильтрации происходит освобождение от О-антигена. При этом большая часть токсина остается в фильтрате, что подтверждается в реакциях РДП, РНГА с АХС и в реакции Крейга. Тест на холерогенность препарата холерного токсина на кроликах-сосунках оказался положительным. Последующая колоночная ультрафильтрация на колонке F10HPS позволяет без потерь сконцентрировать продукт в 60 раз.

Анализ активности в ДОТ-ИФА с антитоксической холерной сывороткой показал, что препарат ХТ, полученный с использованием ультрафильтрации, не уступает аналогичному препарату, полученному по стандартной методике: 1,5–3,1 нг/мл (титр 1/640000–1/320000) и 28 нг/мл (1/20000) соответственно. Проведенный анализ чистоты препаратов ХТ, полученных разными методами, в SDS-PAGE (по Lemmli) и иммуноблоттинге (по Towbin) с АХС, показал идентичность всех исследуемых образцов (рисунок).

Следующим этапом работы была оценка эффективности применения ультрафильтрационных методов для выделения Ф1 чумного микроба. Данный антиген уникален для возбудителя чумы, относится к протективным и диагностически значимым анти-

генам. Выделение Ф1 из культуральной жидкости проводили осаждением в изoeлектрической точке по модифицированному методу М.М.Титенко с соавт. [5], из клеточной массы – солевой экстракцией из ацетонвысушенных клеток с последующим осаждением сульфатом аммония по методу Е.Е.Вайер *et al.* [7]. В первом случае pH культуральной жидкости доводили до 5,0, осадок отделяли центрифугированием, pH супернатанта доводили до 7,0, а затем 3-кратно переосаждали при pH 4,1. Во втором случае клеточную массу обезжизивали холодным ацетоном, а затем проводили экстракцию капсульного антигена 2,5 % раствором хлорида натрия и осаждение его сульфатом аммония при 40 % насыщении раствора с последующим диализом.

Для модернизации получения препарата Ф1 из штамма-продуцента живой вакцины *Y. pestis* EV культуральную жидкость после сепарации (этап № 1) фильтровали через патронный фильтр 0,22 микрон («Технофильтр», Россия). Полученный фильтрат концентрировали (этап № 2) на колонке F10HPS. Осаждение препарата Ф1 из концентрата (этап № 3) проводили в изоточке. При выделении препарата Ф1 из штамма *Y. pestis* KM 277 культуральную жидкость (100 л) после сепарирования фильтровали с использованием фильтра Сальникова с 3 пластинами фильтровального картона для освобождения от клеточного дебриса с последующей фильтрацией через патронный фильтр 0,8-0,45-0,22 микрон («Технофильтр», Россия), этап № 1. Необходимость применения дополнительной очистки возникла из-за большой концентрации биомассы. Полученный фильтрат культуральной жидкости концентрировали на колонке F10HPS (этап № 2). Осаждение препарата Ф1 из концентрата проводили в изоточке (этап № 3) аналогично препарату из *Y. pestis* EV.

Использование ультрафильтрации для получения препарата Ф1 чумного микроба из культуральной жидкости позволяет без потерь сконцентрировать продукт в 40 раз (в результате из 20 л культуральной жидкости получен концентрат объемом 500 мл). При последующем осаждении получено до 200 мл полуфабриката Ф1. Активность антигена в РНГА и содержание белка контролировали на всех этапах выделения (табл. 2).

Таким образом, применение методов ультрафильтрации позволяет снизить потери на этапах выделения и очистки ХТ холерного вибриона и Ф1

Таблица 2

Содержание Ф1 на этапах выделения из культуральной жидкости (20 л) штамма-продуцента живой вакцины *Y. pestis* EV и штамма *Y. pestis* KM 277

Этап	Проба	Объем, л	<i>Y. pestis</i> EV		<i>Y. pestis</i> KM 277	
			Концентрация белка, мг/мл	РНГА	Концентрация белка, мг/мл	РНГА
1	Культуральная жидкость	20	0,9±0,05	1/10000	1,32±0,05	1/1000000
2	Фильтрат	19,5	0,02	–	0,5	1/3200
	Концентрат	0,5	2,1±0,05	1/80000	10,0±0,05	1/10 ⁹
3	Полуфабрикат Ф1	0,2	3,5±0,05	1/160000 ± 1/320000	14,6±0,05	1/4×10 ⁹

чумного микроба, концентрирование сырья или полужабриката позволяет уменьшить трудозатраты, что ведет к повышению производительности и экономической эффективности.

Другие перспективные направления использования процессов ультрафильтрации на этапах производства МИБП в Рос НИПЧИ «Микроб»: получение активного компонента дрожжевого аутолизата; очистка F(ab')₂ фрагментов антирабических иммуноглобулинов от продуктов гидролиза; получение перспективного антигена сибиреязвенного микроба.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Громова О.В., Джанпаридзе М.Н., Дятлов И.А. и др. Способ получения О-антигена холерного очищенного. Патент № 2143280 РФ. Оpubл. 27.12.1999.
2. Дытнерский Ю.И. Обратный осмос и ультрафильтрация. М.: «Химия»; 1978. 352 с.
3. Еремин С.А., Волох О.А., Авдеева Н.Г. и др. Пути совершенствования производства чумной химической вакцины. В кн.: Новые технологии в профилактике, диагностике, эпиднадзоре и лечении инфекционных заболеваний. Нижний Новгород: Изд-во Нижегород. гос. ун-та им. Лобачевского; 2004. С. 317–21.
4. Строганов В.В., Космаенко О.М., Тихонов Н.Г. и др. Экспериментальное изучение ультрафильтрационной установки для получения очищенного холерного экзотоксина. В кн.: Профилактика. особо опасных инф. Саратов; 1980. С. 52–9.
5. Титенко М.М., Вейнблат В.И., Веренков М.С., Васенин А.С. Препаративный метод выделения и очистки капсульного антигена возбудителя чумы при помощи изоэлектрической преципитации. В кн.: Диагн. и профилактика. особо опасных инф. Саратов; 1983. С. 34–9.
6. Arockiasamy A., Krishnaswamy S. Purification of integral outer-membrane protein OmpC, a surface antigen from *Salmonella typhi* for structure-function studies: a method applicable to enterobacterial major outer-membrane protein. Anal. Biochem. 2000; 283(1):64–70.
7. Baker E.E., Sommer H. et al. Studies on immunization against plague. 1. The isolation and characterization of the soluble antigen of *Pasteurella pestis*. J. Immunol. 1952; 68:131–45.
8. Brou A., Jaffrin M.Y., Ding L.H., Courtois J. Microfiltration and ultrafiltration of polysaccharides produced by fermentation using a rotating disk dynamic filtration system. Biotechnol. Bioeng. 2003; 82(4):429–37.

9. Harinarayan C., Skidmore K., Kao Y., Zydney A.L. et al. Small molecule clearance in ultrafiltration/diafiltration in relation to protein interaction: Study of citrate binding to a Fab. Biotechnol. Bioeng. 2009; 102(6):1718–22.
10. Mekalanos J.J., Collier R.J., Romig W.R. Purification of the cholera toxin and its subunits: new methods of preparation and the use of hypotoxinogenic mutants. Infect. Immun. 1978; 20:552–9.
11. Rappoport R.S., Bonde G., McCann T. et al. Development of a purified cholera toxoid. II. Preparation of a stable, antigenic toxoid by reaction of purified toxin with glutaraldehyde. Infect. Immun. 1974; 9:304–17.
12. Zydney A.L., Kuriyel R. Protein concentration and buffer exchange using ultrafiltration. In: Desai M.A., editor. Downstream Processing of Proteins: Methods and Protocols. Humana Press; 2000. P. 23–34. (Methods in Biotechnology; vol. 9). DOI: 10.1007/978-1-59259-027-8_3.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Gromova O.V., Dzhaparidze M.N., Dyatlov I.A. et al. [Method of obtaining of cholera O-antigen purified]. RF Patent 2143280. 26 May 1999.
2. Dytner'sky Yu. I. [Reverse Osmosis and Ultrafiltration]. M.: "Khimiya"; 1978. 352 p.
3. Eremin S.A., Volokh O.A., Avdeeva N.G. et al. [Ways of development of cholera chemical vaccine production]. In: [New Technologies in Prophylaxis, Diagnostics, Epidemiological Surveillance and Treatment of Infectious Diseases]. Nizhny Novgorod: Izd. Nizh. Gos. Univer. Imeni Lobachevskogo; 2004. P. 317–21.
4. Stroganov V.V., Kosmaenko O.M., Tikhonov N.G. et al. [Experimental studies of the ultrafiltration module for the obtaining of purified cholera exotoxin]. In: [Prophylaxis of Particularly Dangerous Infectious Diseases]. Saratov; 1980. P. 52–9.
5. Titenko M.M., Veynblat V.I., Verenkov M.S., Vasenin A.S. [Preparative method of isolation and purification of plague agent capsular antigen using isoelectric precipitation]. In: [Diagnostics and Prophylaxis of Particularly Dangerous Infectious Diseases]. Saratov; 1983. P. 34–9.

Authors:

Shepelev I.A., Eremin S.A., Vasin Yu.G., Volokh O.A., Alenkina T.V., Belyakova N.I., Kuznetsova E.M., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Шепелёв И.А., Еремин С.А., Васин Ю.Г., Волох О.А., Алёнкина Т.В., Белякова Н.И., Кузнецова Е.М., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 12.10.10..

**О совещании специалистов НИИ
по вопросу «Стандартизация молекулярных
методов типирования возбудителей
особо опасных инфекционных болезней»**

Во исполнение приказа Роспотребнадзора № 377 от 14.04.2011 г. и в соответствии с Планом основных организационных мероприятий Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на 2011 г. (п. 1.4.52.) 18 мая 2011 г. на базе ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» проведено совещание специалистов НИИ по вопросу «Стандартизация молекулярных методов типирования возбудителей особо опасных инфекционных болезней».

В работе совещания приняли участие научные сотрудники из 11 учреждений Роспотребнадзора. Представлено 14 научных докладов об основных задачах Референс-центров по мониторингу за возбудителями особо опасных инфекционных болезней бактериальной и вирусной природы, по разработке современных подходов к молекулярному типированию, информационному обеспечению деятельности в области молекулярного типирования штаммов возбудителей особо опасных инфекций, созданию базы данных геномных портретов штаммов возбудителей особо опасных инфекций.

**О рабочем совещании и учениях СПЭБ
РосНИПЧИ «Микроб» с участием
представителей учреждений Роспотребнадзора
и здравоохранения г. Казань**

Во исполнение приказов Роспотребнадзора № 487 от 13.05.2011 г. и № 440 от 08.12.2010 г. и в соответствии с Планом основных организационных мероприятий Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на 2011 год (п. 1.4.61) 25–26 мая 2011 г. в Саратове были проведены рабочее совещание и учения СПЭБ РосНИПЧИ «Микроб» с участием представителей учреждений Роспотребнадзора и здравоохранения г. Казань. Целью совещания была отработка вопросов взаимодействия СПЭБ и территориальных органов и учреждений Роспотребнадзора г. Казань в ходе обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения в период проведения XXVII Всемирной летней Универсиады 2013 г. в Казани.

В совещании и учениях СПЭБ приняли участие представители учреждений Роспотребнадзора и здравоохранения Казани (Управление Роспотребнадзора по Республике Татарстан, ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в Республике Татарстан, Управления здравоохранения г. Казань), а также РосНИПЧИ «Микроб», Управления Роспотребнадзора по Саратов-

ской области, ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Саратовской области».

В ходе совещания определены приоритетные направления в области санитарной охраны территории и санитарно-эпидемиологического надзора в Республике Татарстан в период проведения XXVII Всемирной летней Универсиады 2013 г. в Казани, определены основные задачи по взаимодействию РосНИПЧИ «Микроб» с учреждениями Роспотребнадзора и здравоохранения Республики Татарстан до конца 2011 и на 2012 г.

Согласованы задачи и тактика применения СПЭБ РосНИПЧИ «Микроб» в ходе обеспечения проведения XXVII Всемирной летней Универсиады 2013 г. в Казани. Приняты конкретные предложения по активизации подготовки кадров и осуществлению совместных научно-практических работ в рамках реализации договора о сотрудничестве между Управлением Роспотребнадзора по Республике Татарстан, ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в Республике Татарстан» и ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

**О совещании специалистов
Роспотребнадзора и противочумных учреждений
по проблеме «Холера и патогенные
для человека вибрионы»**

В соответствии с Планом основных организационных мероприятий Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на 2011 г. и приказом № 294 от 22.03.2011 г. на базе Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института 1–2 июня 2011 г. проведено совещание специалистов Роспотребнадзора и противочумных учреждений по проблеме «Холера и патогенные для человека вибрионы». На совещании были обсуждены следующие вопросы:

1. Оценка эпидемиологической обстановки по холере в мире в современный период. Прогноз. Организация эпидемиологического надзора за холерой на современном этапе.
2. Эволюция возбудителя холеры.
3. Состояние лабораторной диагностики холеры. Деятельность референс-центра по мониторингу возбудителя холеры.
4. Профилактика холеры на современном этапе.
5. Перспективы разработки современных медицинских и иммунобиологических препаратов, питательных сред, методов диагностики и специфической профилактики холеры.

Проведено заседание проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы» (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации.

К 80-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ДМИТРИЯ КОНСТАНТИНОВИЧА ЛЬВОВА

26 июня 2011 г. исполнилось 80 лет со дня рождения Дмитрия Константиновича Львова – ученого с мировым именем, выдающегося вирусолога, директора ФГУ НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского, руководителя отдела экологии вирусов, академика РАМН, доктора медицинских наук, профессора, лауреата Государственной премии.

С именем Д.К.Львова связаны создание и развитие нового научного направления – экологии вирусов, популяционной генетики арбовирусов, внедрение в практику культуральной вакцины, разработка стратегии и тактики иммунопрофилактики клещевого энцефалита. Под его руководством описаны неизвестные ранее инфекции, вызываемые вирусами, и изучена роль выделяемых вирусов в патологии человека. Д.К.Львов – один из инициаторов организации мониторинга вирусных гепатитов и создания федеральных программ по снижению заболеваемости вирусными гепатитами.

Дмитрий Константинович является ведущим специалистом в области экологии и молекулярной эпидемиологии гриппа.



Как член Координационного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации много внимания уделяет проблемам обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия страны, борьбы с особо опасными инфекциями, в том числе ликвидации эпидемических вспышек инфекционных болезней.

Научная, научно-организационная деятельность Д.К.Львова, его большой вклад в развитие вирусологии достойно оценены. Он – дважды лауреат премии имени Д.И.Ивановского, лауреат премии имени академика Н.Ф.Гамалеи, лауреат премии имени академика В.Д.Тимакова, награжден орденом «Знак Почета» и орденом Ленина. В 1999 г. ему присвоено звание лауреата Государственной премии РФ в области науки.

Редакционная коллегия журнала «Проблемы особо опасных инфекций» от всей души поздравляет Дмитрия Константиновича с юбилеем и желают ему крепкого здоровья, долгой плодотворной творческой жизни, счастья и благополучия, успеха во всех начинаниях.

К 70-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ТАМАРЫ ИВАНОВНЫ ИННОКЕНТЬЕВОЙ

Доктору медицинских наук, профессору, заместителю директору Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока Тамаре Ивановне Иннокентьевой 1 сентября 2011 г. исполняется 70 лет.

Основное направление научных исследований Тамары Ивановны – изучение взаимоотношений возбудителя чумы с носителями и переносчиками, изменчивости чумного микроба, нетрансмиссивных факторов в его сохранении и передаче, пространственной и биоценотической структуры природных очагов чумы Сибири и Монголии, совершенствование тактики и методики обследования очагов и эпидемиологического надзора за чумой и другими особо опасными инфекционными болезнями. Ею совместно с В.Е.Тарасовой впервые выявлен феномен повышения вирулентности и изменения других свойств вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV при пассировании через организм высокочувствительного животного.

Т.И.Иннокентьева – заместитель председателя Ученого совета института, председатель проблемно-



методической и аттестационной комиссий, работала в составе диссертационного совета при НИЦ проблем здоровья семьи и благополучия человека ВСНЦ СО РАМН. Участвует в работе по международному сотрудничеству института с Национальным центром исследований природно-очаговых инфекций Минздрава Монголии и противочумными учреждениями Китая, на протяжении многих лет работала в составе Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории РФ.

Тамара Ивановна Иннокентьева награждена орденом Дружбы, знаками «Отличнику здравоохранения», «Почетный работник госсанэпидслужбы России», медалью «Ветеран труда», медалью Министерства здоровья Монголии, грамотами Минздрава СССР и администраций различных регионов страны и института.

Редакционная коллегия журнала «Проблемы особо опасных инфекций» поздравляет Тамару Ивановну с юбилеем и желает доброго здоровья, долгих лет жизни, дальнейших творческих успехов.

**ПАМЯТИ АЛЕКСАНДРА ИВАНОВИЧА КОЛОГОРОВА
(1936–2011)**



20 июля на 76-м году жизни скончался один из ведущих специалистов противочумной службы России, крупный ученый, талантливый эпидемиолог и замечательный человек Александр Иванович Кологоров, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории санитарной охраны и чрезвычайных ситуаций отдела эпидемиологии

РосНИПЧИ «Микроб».

С 1975 г. научная деятельность А.И.Кологорова неразрывно связана с Российским научно-исследовательским противочумным институтом «Микроб».

Он занимался изучением эпидемиологии чумы и холеры в нашей стране и за рубежом, разрабаты-

вал и реализовывал на практике наиболее эффективные меры борьбы с холерой, чумой и другими особо опасными инфекционными болезнями, непосредственно участвовал в ликвидации вспышек и эпидемий холеры.

За успехи, достигнутые в научно-исследовательской и практической работе, А.И.Кологоров Указом Президента Российской Федерации был награжден медалью ордена «За заслуги перед Отечеством» второй степени, медалью «За трудовое отличие», нагрудным знаком «Отличнику здравоохранения» и многими почетными грамотами.

Своим доброжелательным отношением, трудолюбием и высокой принципиальностью Александр Иванович пользовался уважением сотрудников института «Микроб», противочумных и других учреждений здравоохранения Российской Федерации и стран ближнего зарубежья.

Все, кому довелось знать Александра Ивановича и работать с ним будут бережно хранить к нему глубочайшее уважение и самые теплые чувства.

**ПАМЯТИ МИХАИЛА ПЕТРОВИЧА ИВАНОВА
(1945–2011)**



25 июля на 66-м году жизни скончался один из ведущих организаторов и специалистов в области санитарной охраны территорий, главный врач филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург» на транспорте, прекрасный человек Михаил Петрович Иванов.

С 1969 г. трудовой путь Михаила Петровича связан с деятельностью государственной санитарно-эпидемиологической службы. Он обеспечивал Госсанэпиднадзор на водном и воздушном транспорте. За это время прошел путь от судового врача до главного врача филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург» на транспорте.

Преданность делу, высокая степень ответственности, трудолюбие, требовательность, скромность,

интеллигентность, чуткость и отзывчивость снискали Михаилу Петровичу уважение всех, кому довелось с ним работать.

Михаил Петрович внес большой вклад в развитие судовой гигиены, принимал участие в разработке Международных Медико-санитарных правил и отечественного санитарного законодательства.

По долгу службы работал в тесном контакте с проектными институтами и транспортными компаниями, что позволяло ему принимать непосредственное участие в создании морских и речных судов.

Михаил Петрович Иванов – «Заслуженный врач Российской Федерации», награжден почетными знаками «Отличник здравоохранения», «Почетный работник морского флота», медалью «За заслуги перед отечественным здравоохранением», почетными грамотами Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Михаил Петрович останется в нашей памяти грамотным, мудрым руководителем, отзывчивым человеком, добрым и заботливым другом.