

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 4(110)

декабрь · 2011

САРАТОВ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

З.Л.Девдариани, докт. мед. наук, профессор
Г.А.Ерошенко, докт. биол. наук
Т.Б.Караваяева (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 казенное учреждение здравоохранения
Российский научно-исследовательский противочумный
институт «Микроб», 2011

December 2011, Issue 110

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)
Lvov 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: rusrapi@microbe.ru
<http://microbe.rospotrebnadzor.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: rusrapi@microbe.ru. Сайт: microbe.rospotrebnadzor.ru
Зав. редакцией Л.С.Пронина. Тел. (845-2) 51-82-22. Факс (845-2) 51-52-12

Пробл. особо опасных инф. Декабрь 2011. Вып. 110. 1–102
Редактор Т.А.Поршакова. Технический редактор Т.К.Меркулова. Перевод на английский Т.Б.Караваяевой, А.П.Рыжовой, А.Ю.Мощиной

Подписано в печать 16.11.11. Формат 60×88 1/8. Бумага мелованная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 12,5. Гарнитура Таймс. Заказ 1508
Журнал отпечатан в ООО «ИППО/ЛТ-XXI век». 410012, Саратов, Б. Казачья, 79/85

Обзоры

Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Видяева Н.А., Кутырев В.В. Бактериальная биопленка и особенности ее образования у возбудителя чумы и других патогенных иерсиний

5

Попова П.Ю., Микшис Н.И., Щуковская Т.Н., Попов Ю.А. Взаимодействие возбудителя сибирской язвы с паттерн-распознающими рецепторами врожденного и адаптивного иммунитета

12

Храпова Н.П., Алексеев В.В. Современное состояние серодиагностики мелиоидоза

18

Эпидемиология

Куличенко А.Н., Евченко Ю.М., Мозлов Г.А., Григорьев М.П., Ляпустина Л.В., Чурикова Н.В. Эпизоотическая активность Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы

23

Мельникова О.В., Вершинин Е.А., Корзун В.М., Андаев Е.И., Сидорова Е.А. Современное состояние очага клещевого энцефалита в окрестностях Иркутска

27

Москвитина Э.А., Забашта М.В., Пичурина Н.Л., Орехов И.В., Ломов Ю.М., Адаменко В.И., Феров Д.А., Забашта А.В., Веркина Л.М., Ковалев Е.В., Айдинов Г.В., Швагер М.М., Дворцова И.В., Гайбарян К.С., Говорухина М.В., Мортикова Ю.Н. Лихорадка Западного Нила в Ростовской области: эколого-эпидемиологические особенности вспышки 2010 года

31

Микробиология

Грачева И.В., Валова Т.В., Григорьева Г.В. Традиционные и новые защитные среды для низкотемпературной консервации бактерий

36

Пименов Е.В., Оборин В.А., Ивонин А.Г. Оценка адгезивных свойств спор вакцинных штаммов *Bacillus anthracis* на эритроцитах млекопитающих с помощью фотокolorиметрии

41

Чаусов Е.В., Терновой В.А., Протопопова Е.В., Коновалова С.Н., Кононова Ю.В., Тупота Н.Л., Москвитина Н.С., Романенко В.Н., Иванова Н.В., Болшакова Н.П., Леонова Г.Н., Локтев В.Б. Молекулярно-генетический анализ полного генома вируса клещевого энцефалита сибирского субтипа на примере современного изолята Коларово-2008

44

Шашкова А.В., Горяев А.А., Заднова С.П., Краснов Я.М., Смирнова Н.И., Кутырев В.В. Конструирование ПЦР тест-системы для идентификации токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1, определения их биовара и дифференциации штаммов эльтор вибрионов на типичные и измененные

49

Шишкова Н.А., Кравченко Т.Б., Маринин Л.И., Мокриевич А.Н. Идентификация возбудителя сибирской язвы, выделенного из почвы скотомогильника

53

Диагностика, иммунология, иммунотерапия

Зубавичене Н.М., Золин В.В., Ставский Е.А. Липосомальные и суспензионные формы иммуноглобулинов против лихорадки Эбола как новые лекарственные препараты

57

Reviews

Kukleva L.M., Eroshenko G.A., Vidyayeva N.A., Kutyrev V.V. Bacterial Biofilm and Peculiarities of Its Formation in Plague Agent and in Other Pathogenic Yersinia

Popova P.Yu., Mikshis N.I., Shchukovskaya T.N., Popov Yu.A. Interaction between *Bacillus anthracis* and Pattern-Recognizing Receptors of Innate and Adaptive Immunity

Khrapova N.P., Alekseev V.V. Current State of Human Melioidosis Serodiagnostics

Epidemiology

Kulichenko A.N., Evchenko Yu.M., Mozlov G.A., Grigor'ev M.P., Lyapustina L.V., Churikova N.V. Epizootic Activity of the Central Caucasian High-Mountain Natural Plague Focus

Mel'nikova O.V., Vershinin E.A., Korzun V.M., Andayev E.I., Sidorova E.A. The Current State of Natural Foci of Tick-Borne Encephalitis near Irkutsk City

Moskvitina E.A., Zabashta M.V., Pichurina N.L., Orekhov I.V., Lomov Yu.M., Adamenko V.I., Feronov D.A., Zabashta A.V., Verkina L.M., Kovalev E.V., Aidinov G.V., Shvager M.M., Dvortsova I.V., Gaibaryan K.S., Govorukhina M.V., Mortikova Yu.N. West Nile Fever in the Rostov Region: Ecological and Epidemiological Peculiarities of the Outbreak in 2010

Microbiology

Gracheva I.V., Valova T.V., Grigor'eva G.V. Traditional and Modern Protective Media for the Low-Temperature Bacteria Preservation

Pimenov E.V., Oborin V.A., Ivonin A.G. Evaluation of the Adhesive Properties of Spores of *Bacillus anthracis* Vaccine Strains to the Mammalian Erythrocytes Using Photocolorimetry Technique

Chausov E.V., Ternovoy V.A., Protopopova E.V., Konovalova S.N., Kononova Yu.V., Tupota N.L., Moskvitina N.S., Romanenko V.N., Ivanova N.V., Bol'shakova N.P., Leonova G.N., Loktev V.B. Molecular Genetic Analysis of the Complete Genome of Tick-Borne Encephalitis Virus (Siberia Subtype): Modern Kolarovo-2008 Isolate

Shashkova A.V., Goryayev A.A., Zadnova S.P., Krasnov Ya.M., Smirnova N.I., Kutyrev V.V. Construction of the PCR Test-System for the Detection of *Vibrio cholerae* O1 Toxigenic Strains, for Indication of Their Biovar and for Differentiation between Typical and Altered El Tor-Vibrio Strains

Shishkova N.A., Kravchenko T.B., Marinin L.I., Mokrievich A.N. Identification of *Bacillus anthracis* Isolated from Soil of the Animal Burial Site

Diagnostics, Immunology, Immunotherapy

Zubavichene N.M., Zolin V.V., Stavsky E.A. Liposomal and Suspension Forms of Immunoglobulins Against Ebola Fever as the New Medical Preparations

Куклина Г.В., Фоменков О.О., Елагин Г.Д., Кутаев Д.А., Янов Д.С., Кытманов А.А., Богачева Н.В., Воробьева Т.П., Дармов И.В., Печенкин Д.В. Разработка иммуоферментной тест-системы для обнаружения *Legionella pneumophila* серогруппы 1

61

Лапин А.А., Мокриевич А.Н., Вахрамеева Г.М., Комбарова Т.И., Бахтеева И.В., Дятлов И.А., Павлов В.М. Иммунобиологические свойства штамма *Francisella tularensis* 15/10 с делетированным геном *recA*

65

Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Цыганкова О.И., Цыганкова Е.А., Куличенко А.Н. Использование методов молекулярного типирования *Bacillus anthracis* в Референс-центре по мониторингу за возбудителем сибирской язвы

68

Хлынцева А.Е., Лунева Н.М., Белова Е.В., Дятлов И.А., Шемякин И.Г. Разработка и испытания диагностикума на основе моноклональных антител для определения спор возбудителя сибирской язвы в реакции латекс-агглютинации

71

Биотехнология

Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Матвеева Ж.В. Клеточные культуры в производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина ..

76

Жулидов И.М., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Антонычева М.В., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Вахрушина Н.И., Белоусов А.Д., Еремин С.А., Киреев М.Н., Шарапова Н.А., Савицкая Л.В., Михеева Т.А., Минаева Л.Н., Галкина М.В., Свинцов Р.А., Аленкина Т.В., Васин Ю.Г., Базлов Г.В. Безотходные технологии в производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина

80

Краткие сообщения

Жолдошов С.Т. Особенности клинического течения сибирской язвы в современных условиях

85

Сазанова Е.В., Малиюкова Т.А., Бойко А.В., Растунцева Е.В., Лоцманова Е.Ю., Юсупова З.С. Хронометраж как способ контроля приобретения навыков работы с возбудителями особо опасных инфекций в процессе профессиональной переподготовки

88

Тихонов С.Н., Ротов К.А., Алексеев В.В., Снатенков Е.А. Изучение протективных свойств липосомального и свободного гентамицина при аэрогенном заражении возбудителем мелиоидоза

90

Юбилеи

Кабин В.В., Агапов Б.Л., Кузнецов А.А., Матросов А.Н. К 110-летию федерального казенного учреждения здравоохранения «Астраханская противочумная станция»

92

Информация

О проведении Круглого стола санитарно-эпидемиологических служб Российской Федерации и Республики Казахстан «Вопросы реагирования на чрезвычайные ситуации санитарно-эпидемиологического характера» в рамках VIII Форума межрегионального сотрудничества Российской Федерации и Республики Казахстан с участием глав государств (Астрахань, 14 сентября 2011 г.)

96

Решение Межведомственного совещания по проблемам санитарно-эпидемиологической охраны территории Российской Федерации (Астрахань, 19–20 октября 2011 г.)

96

Kuklina G.V., Fomenkov O.O., Elagin G.D., Kutaev D.A., Yanov D.S., Kytmanov A.A., Bogacheva N.V., Vorob'eva T.P., Darmov I.V., Pechenkin D.V. Development of the Immuno-Enzyme Test-System for the Detection of *Legionella pneumophila*, Serogroup I

Lapin A.A., Mokrievich A.N., Vakhrameeva G.M., Kombarova T.I., Bakhteeva I.V., Dyatlov I.A., Pavlov V.M. Immunobiological Properties of *Francisella tularensis* 15/10 Strain with Deleted *recA* Gene

Ryazanova A.G., Eremenko E.I., Tsygankova O.I., Tsygankova E.A., Kulichenko A.N. Application of *Bacillus anthracis* Molecular Typing Methods by the Reference Center for the Anthrax Agent Monitoring

Khlyntseva A.E., Luneva N.M., Belova E.V., Dyatlov I.A., Shemyakin I.G. Development and Testing of Monoclonal Antibodies-Based Diagnostic Preparation for *Bacillus anthracis* Spores Detection Using Latex Agglutination Method

Biotechnology

Generalov S.V., Abramova E.G., Nikiforov A.K., Matveeva Zh.V. Cell Structures in Heterologous Anti-Rabies Immunoglobulin Production

Zhulidov I.M., Abramova E.G., Nikiforov A.K., Antonycheva M.V., Shul'gina I.V., Lobovikova O.A., Vakhrushina N.I., Belousov A.D., Eremin S.A., Kireev M.N., Sharapova N.A., Savitskaya L.V., Mikheeva T.A., Minaeva L.N., Galkina M.V., Svintsov R.A., Alenkina T.V., Vasin Yu.G., Bazlov G.V. Non-Waste Alternative Technologies in the Production of Heterologous Anti-Rabies Immunoglobulin

Brief Communications

Zholdoshev S.T. Peculiarities of Anthrax Clinical Manifestations in the Current Context

Sazanova E.V., Malyukova T.A., Boiko A.V., Rastuntseva E.V., Lotsmanova E.Yu., Yusupova Z.S. Chronometry as a Method to Assess the Formation of Skills Required for Work with the Agents of Particularly Dangerous Infections in the Course of Professional Retraining

Tikhonov S.N., Rotov K.A., Alekseev V.V., Snatnikov E.A. Study of Protective Properties of Gentamicin in Liposome-Entrapped and Free Forms in Case of Aerogenic Melioidosis Infection

Anniversaries

Kabin V.V., Agapov B.L., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N. To 110th Anniversary of the Federal Public Health Institution "Astrakhan Plague Control Station"

Information

Information about the Penal Discussion "Issues of the Sanitary-and-Epidemiological Emergency Situations Response" held by the Sanitary-and-Epidemiological Services of the Russian Federation and the Republic of Kazakhstan within the Frames of the VIII Forum Concerning Trans-Regional Cooperation between the Russian Federation and the Republic of Kazakhstan with the Participation of the Heads of the States (Astrakhan, 14 September, 2011)

Resolution of the Interdepartmental Council on the Matters of Sanitary-and-Epidemiological Protection of the Territories of the Russian Federation (Astrakhan, 19–20, October, 2011)

Л.М.Куклева, Г.А.Ерошенко, Н.А.Видяева, В.В.Кутырев

**БАКТЕРИАЛЬНАЯ БИОПЛЕНКА И ОСОБЕННОСТИ ЕЕ ОБРАЗОВАНИЯ
У ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ И ДРУГИХ ПАТОГЕННЫХ ИЕРСИНИЙ**

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

В обзоре представлены современные литературные данные об общих закономерностях образования бактериальных биопленок, этапах ее формирования и структурно-функциональной организации, а также об участии различных ферментных систем в функционировании биопленки. Проведен анализ сведений об особенностях образования биопленок патогенными иерсиниями – *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*. Представлены данные об участии генов *hmsHFRS*-оперона хромосомной области пигментации *Y. pestis* в формировании структуры биопленки и ее регуляции генами *hmsP* и *hmsT*. Обобщены результаты исследований последних лет, посвященных генетической детерминированности процессов образования биопленки возбудителем чумы, в частности участием генов синтеза липополисахарида (*waaA*, *yrbH* и *gmhA*) и полиаминов (*speA* и *speC*), а также регуляторных генов *rcaA* и *phoP-phoQ*. Приведены результаты собственных исследований по изучению особенностей формирования биопленки штаммами возбудителя чумы разных подвидов на абиотических поверхностях и модели нематоды *Caenorhabditis elegans*. Обсуждена роль биопленки в сложном жизненном цикле возбудителя чумы, отмечено ее значение не только для обеспечения трансмиссии чумы с помощью блох, но и для сохранения *Y. pestis* во внешней среде вне организма теплокровного хозяина.

Ключевые слова: биопленка, возбудитель чумы, патогенные иерсинии.

L.M.Kukleva, G.A.Eroshenko, N.A.Vidyaeva, V.V.Kutyrev

Bacterial Biofilm and Peculiarities of Its Formation in Plague Agent and in Other Pathogenic *Yersinia*

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

This paper represents a review of the current literature data concerning general principles of bacterial biofilm formation, stages of biofilm production and its structural and functional organization, as well as the data concerning involvement of different enzyme systems with the process of biofilm functioning. Carried out is the analysis of the data on the peculiarities of biofilm formation by pathogenic *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. enterocolitica*. Displayed are the data on the role of *hmsHFRS*-operon genes, located in pigmentation chromosomal region of *Y. pestis*, in the process of biofilm structure formation, and the data on its regulation by *hmsP* and *hmsT* genes. Summarized are the results of the recent years' investigations devoted to the genetic determinacy of the plague agent biofilm formation processes, and in particular to the involvement of genes encoding synthesis of lipopolysaccharide (*waaA*, *yrbH* and *gmhA*) and polyamines (*speA* and *speC*), as well as *rcaA* and *phoP-phoQ* regulatory genes with biofilm formation procedures. Represented are the results of our own investigations concerning the studies of peculiarities of biofilm formation by plague agent strains of different subspecies on the abiotic surfaces and on the nematode model – *Caenorhabditis elegans*. Discussed is the role of the biofilm in the complex life span of the plague agent. Noted is biofilm significance not only for facilitation in plague transmission by fleas, but also for *Y. pestis* preservation in the environment, out of the organism of a warm-blooded host.

Key words: biofilm, plague agent, pathogenic *Yersinia*.

Согласно современным представлениям бактерии способны существовать как в виде свободноживущих планктонных клеток, так и в виде биопленок. J.Costerton *et al.* [15] определили биопленку как «структурированное сообщество бактериальных клеток, которые прикреплены к инертной или живой поверхности и окружены образуемым ими полимерным матриксом». Показано, что свыше 90 % бактерий могут формировать биопленки на различных типах поверхностей, а некоторые из них образуют биопленки и в условиях макроорганизма [14]. Свойства свободноживущих планктонных клеток и бактерий, входящих в биопленку, существенно различаются. Бактериальные клетки в составе биопленки обладают повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам внешней среды, в том числе к воздействию различных антимикробных агентов [25].

Большинство хронических инфекционных заболеваний человека и животных, с трудом поддающихся лечению лекарственными препаратами, как правило, вызваны биопленками патогенных бактерий [14].

В основе формирования биопленки лежат три ведущих механизма, которые зависят от вида микроорганизма, природы колонизируемой поверхности, физических и химических параметров окружающей среды [24]. Один из этих механизмов заключается в колонизации поверхности за счет движения по ней прикрепившихся клеток. Второй механизм обусловлен делением прикрепившихся клеток и их распространением в различные стороны от места прикрепления. И, наконец, пополнение клеточной массы биопленок может происходить за счет бактерий, циркулирующих в окружающей жидкости [25].

В качестве сигналов, обуславливающих вклю-

чение у планктонных бактерий механизмов перехода от свободного состояния к оседлому существованию на соответствующей поверхности, выступают изменения в содержании питательных веществ, железа и кислорода, температуры, осмолярности, pH среды и т.д. [38, 42].

Формирование биопленки проходит через ряд последовательных этапов, включающих прикрепление планктонных бактерий к поверхности, пролиферацию и последующее накопление массы клеток в виде многослойной структуры, содержащей синтезируемый самими клетками полимерный внеклеточный матрикс. По мере созревания биопленки некоторые бактерии открепляются и колонизируют новые поверхности. Структура биопленки регулируется как физико-химическими взаимодействиями с факторами внешней среды, так и генетическими механизмами самих бактерий [40].

Прикрепление к поверхности. Первым этапом в формировании биопленки является адгезия бактериальных клеток к биотической или абиотической поверхности [38]. Первичный контакт планктонного микроорганизма и поверхности происходит либо случайно (например, при пассивной миграции клеток с током жидкости), либо вследствие направленного движения, обусловленного хемотаксисом. Стадия первичной адгезии занимает несколько секунд, является обратимой и зависит от неспецифических физико-химических механизмов взаимодействия (гидрофобные и электростатические силы, стерическое соответствие молекул и т.д.) между поверхностными структурами микроорганизма и самого субстрата [37]. Вторая стадия адгезии характеризуется необратимым связыванием бактериальных клеток с поверхностью при помощи специфических молекул – адгезинов. Важную роль на этом этапе играют такие клеточные структуры, как фимбрии, поверхностные белки, липополисахарид и жгутики [24].

При переходе от планктонного к оседлому состоянию у бактерий происходит изменение многих процессов жизнедеятельности. Так, прикрепление к поверхности изменяет экспрессию почти 40 % бактериальных генов, участвующих в процессах мембранного транспорта, секреции, синтеза фосфолипидов и липополисахарида, регуляции генов [43]. При этом может происходить как активирование экспрессии генов (например, поринов), так и их репрессия (гены жгутикообразования) [24].

Созревание биопленки. Через некоторое время после необратимого прикрепления к поверхности, бактерии теряют подвижность, слипаются друг с другом, образуя многоклеточный слой. При достижении толщины слоя клеток более 10 мкм наступает следующая стадия, обозначаемая как стадия созревания биопленки [38].

Основной структурной единицей биопленки является микроколония, которая представляет собой многоклеточное образование толщиной в 3–5 слоев, образующееся после адгезии бактерии к поверхно-

сти [37]. При этом бактериальные клетки составляют не более 15 % объема биопленки, остальное представляет экзополисахаридный матрикс, который включает клеточные остатки и внеклеточную ДНК [38]. Микроколонии постепенно увеличиваются в размерах и объединяются с образованием макроколоний. Кроме микроколоний, в сложной трехмерной архитектуре биопленки в большом количестве встречаются поры и каналы, по которым осуществляется приток воды, питательных веществ и кислорода и выведение конечных продуктов метаболизма [43].

Ключевая роль в функционировании бактериальной биопленки принадлежит сигнальной молекуле *c-di-GMP* – циклическому димерному гуанозин монофосфату [16]. Уровень биосинтеза этой молекулы в клетке зависит от действия двух ферментов – дигуанилатциклазы и фосфодиэстеразы, содержащих, соответственно, GGDEF и EAL домены. Белки, включающие GGDEF- и EAL-домены, обнаружены исключительно у бактерий [34]. Большинство белков с GGDEF- и EAL-доменами участвуют не только в формировании биопленки, но и в процессах дифференцировки, подвижности, фотосинтеза и проявления вирулентности бактерий [41]. Эти белки составляют сложную бактериальную систему сигнальной трансдукции, обеспечивающую синтез молекулы-посредника – *c-di-GMP* [16].

Структуру биопленки в значительной мере определяет внеклеточное полимерное вещество или матрикс. «Экзополисахаридный матрикс» это общий термин, объединяющий большое разнообразие таких химических соединений, как экзополисахариды, белки, нуклеиновые кислоты и другие вещества [37]. Подавляющее большинство бактерий в составе экзополисахарида содержат линейный гомогликан β -1,6-N-ацетилглюкозамин или целлюлозу [34]. Некоторые микроорганизмы синтезируют несколько экстраклеточных полисахаридов, в том числе β -1,6-N-ацетилглюкозамин, целлюлозу, колановую кислоту [37].

Характерной особенностью биопленок, образуемых различными видами бактерий, является присутствие поверхностных белков, получивших название Вар-белков (biofilm associated proteins) [35]. Общими особенностями этой группы белков являются их высокий молекулярный вес, наличие сходных коровых доменов [34].

Потенциал роста любой биопленки ограничен доступностью питательных веществ и кислорода, перфузией их в различные слои биопленки и эффективностью удаления отходов, содержанием ионов водорода (pH среды), осмолярностью и т.д. [15].

Открепление (рассеивание) клеток. В определенный момент времени биопленка достигает критической массы и возникает динамическое равновесие, при котором от наружных слоев, наиболее удаленных от поверхности, начинают открепляться клетки, способные покидать биопленку и колонизировать другие поверхности [25]. Открепление бактерий от

вым элементом в биосинтезе биопленки [12, 22].

К настоящему времени полный биохимический и структурный анализ экзополисахарида *Y. pestis* пока не осуществлен, поэтому существует возможность присутствия в матриксе биопленки возбудителя чумы не только poly- β -1,6-GlcNAc, но и других полимеров.

Белки HmsT и HmsP контролируют Hms-зависимый биосинтез внеклеточного матрикса биопленки через противоположно направленное влияние на содержание c-di-GMP [11, 12, 32, 41]. HmsP и HmsT являются белками внутренней мембраны. Активный центр белка HmsP находится в цитоплазме на С-конце и содержит EAL-домен, который необходим для фосфодиэстеразной активности в отношении регуляторной молекулы – бис-(3'-5')-циклический димерный гуанозин монофосфат (c-di-GMP) [11, 32]. Цитоплазматический С-конец белка HmsT содержит GDDEF-домен, определяющий проявление дигуанилатциклазной активности этого фермента [12, 40]. Методами биохимического и генетического анализа показано существование взаимодействий между Hms белками внутренней мембраны – HmsT, HmsP, HmsR и HmsS [12].

Таким образом, Hms система *Y. pestis*, аналогично другим грамотрицательным бактериям, таким как *Salmonella*, *Gluconacetobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* и *Vibrio*, использует GGDEF- и EAL-доменные белки для контроля концентрации молекулы c-di-GMP, участвующей в регуляции синтеза экзополисахарида биопленки [16]. Полученные данные о значении генов *hmsT* и *hmsP* позволили высказать гипотезу о том, каким образом происходит регуляция образования биопленки.

Белки HmsR, HmsS, HmsT и HmsP формируют во внутренней мембране ферментативный комплекс. HmsR в ассоциации с HmsS осуществляют синтез поли-1,6-N-ацетилглюкозамина, а HmsP и HmsT регулируют этот процесс путем контроля уровня c-di-GMP [12]. В блохах при температуре 26 °C происходит увеличение уровня c-di-GMP, обусловленное действием HmsT. Это вызывает активизацию фермента HmsR, синтез поли-1,6-N-ацетилглюкозамина, формирование биопленки и переход к стадии блокирования блох. Блокированные блохи способны к эффективной передаче чумы млекопитающим. В организме млекопитающих при температуре 37 °C происходит деградация HmsT специфическими протеазами (Lon, ClpP и/или ClpX), а также повышение фосфодиэстеразной активности HmsP, что вызывает снижение уровня c-di-GMP и приводит к ингибированию образования биопленки в организме теплокровных животных [13]. Таким образом, в организме млекопитающих возбудитель чумы существует не в виде биопленки, а в виде свободно живущих бактерий, которые распространяются по организму хозяина и синтезируют поверхностно расположенные факторы вирулентности (белковая капсула FraI, протеаза Pla), препятствующие действию защитных сил теплокровного хозяина.

Участие других генов в образовании биопленки возбудителем чумы. Образование биопленки – это сложный физиологический процесс, в котором участвуют не только гены *hms* оперона. Так, показано, что на формирование биопленки влияет липополисахарид (ЛПС) – основной компонент наружной мембраны грамотрицательных бактерий. Мутации в генах *waaA*, *yrbH* и *gmhA*, кодирующих ферменты биосинтеза компонентов ЛПС, приводят к снижению образования биопленки у *Y. pestis*, причем *gmhA* мутанты практически не способны блокировать блох, что обусловлено, вероятно, уменьшением продукции экзополисахарида, а не изменениями его структуры [18, 47]. Влияние генов *waaA* и *gmhA* на формирование биопленки вызвано, вероятно, изменением транспорта экзополисахарида через наружную мембрану клетки, компонентом которой является ЛПС [18, 47]. Ген *yrbH* детерминирует синтез полифункционального белка YrbH, участвующего в биосинтезе липополисахарида, а один из его функциональных доменов, по-видимому, является негативным регулятором биопленки [47].

Установлено, что в образовании биопленки участвуют продукты генов *speA* (аргининдекарбоксилаза) и *speC* (орнитиндекарбоксилаза), детерминирующих образование полиаминов (спермидина и путресцина). Мутации в этих генах приводят к утрате способности формировать биопленку клетками *Y. pestis* [39]. В отсутствие полиаминов снижается уровень биосинтеза ключевых Hms белков – HmsR, HmsS и HmsT на 93, 43 и 90 % соответственно. При этом отсутствие полиаминов не влияет на инициацию транскрипции или стабильность иРНК, а их функция связана с регулированием трансляции HmsR и HmsT [50].

Недавно было выявлено влияние на формирование биопленки возбудителем чумы продукта гена *yapC* – аутотранспортного белка YapC, способного, по-видимому, осуществлять функцию адгезина [21].

Эволюционное становление жизненного цикла, связанного со сменой организмов теплокровного и холоднокровного животного, привело к изменению у возбудителя чумы ряда регуляторных систем. Так, выявлены существенные изменения в системе фосфорилирования Rcs, которая у бактерий контролирует экспрессию генов в ответ на такие внешние сигналы, как изменения температуры и осмолярности. У возбудителя чумы, в отличие от его эволюционного предшественника *Y. pseudotuberculosis*, выявлена мутация в гене *rscA* – отрицательном регуляторе образования биопленки, что привело к его превращению в псевдоген и способствовало накоплению массивной биопленки в пищеварительном тракте блох [44]. Такое генетическое событие обеспечило (наряду с приобретением плазмиды pFra, необходимой для выживания *Y. pestis* в блохах) освоение возбудителем чумы новой экологической ниши – пищеварительного тракта блохи и осуществление эффективной трансмиссии с помощью блох.

Изучено участие в формировании биопленки регуляторной (двухкомпонентной) системы PhoP-PhoQ, которая обуславливает ответные реакции микроорганизма на содержание во внешней среде ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} и способствует выживанию чумного микроба внутри макрофагов [23, 45]. Делеция в гене *phoP* приводит к существенному увеличению толщины образуемой клетками биопленки и прочности ее связывания с поверхностью, что свидетельствует об участии продукта гена *phoP* в негативной регуляции формирования биопленки. Кроме того, показано влияние белка PhoP на функционирование дигуанилатциклазы HmsT [45]. Обнаружение регуляторной роли PhoP хорошо согласуется с двухфазным жизненным циклом возбудителя чумы. Во время развития инфекции в организме млекопитающих PhoP позитивно регулирует гены, обеспечивающие выживание бактерий и вирулентность, и подавляет формирование биопленки, которая не нужна возбудителю в организме теплокровного хозяина [23, 45].

Особенности формирования биопленки у чумного микроба на различных поверхностях. Исследование процесса формирования биопленки и образования блока в преджелудке блохи представляет собой довольно сложную задачу из-за микроскопических размеров пищеварительного тракта насекомого-переносчика и недостаточно разработанных методов генетического анализа насекомых.

Были предприняты попытки изучения формирования биопленки *in vitro* при использовании боросиликатного стекла, различных типов пластиковых поверхностей [5, 11, 19, 29]. Показана способность возбудителя чумы образовывать на этих абиотических поверхностях видимую биопленку и установлена корреляция этого признака с формированием пигментированных колоний на средах с гемином или Конго красным.

Способность к образованию биопленки на биотической поверхности исследуют на модели нематоды *Caenorhabditis elegans*. Неприхотливость к условиям выращивания, высокая скорость генерации, а также хорошо развитая методология генетических и молекулярных исследований и полностью секвенированный геном делают модель *C. elegans* очень удобной для изучения образования биопленки возбудителем чумы.

Показано, что клетки *Y. pestis* образуют на голове и верхней части туловища нематоды *C. elegans* бактериальную биопленку, которая эффективно блокирует питание этого беспозвоночного животного, что поразительно похоже на поведение *Y. pestis* в блохах.

В составе биопленки, образуемой возбудителем чумы на поверхности нематоды, как и в организме блох, выявлен полисахарид [46, 47]. Формирование биопленки на поверхности *C. elegans*, как блокирование блох, строго коррелирует с фенотипом пигментации и требует участия в этом процессе продуктов оперона *hmsHFRS* [4, 17]. У штаммов *Y. pestis*, формирующих биопленку на кутикуле *C. elegans*, выяв-

лены интактные гены *gmhA*, *speA* и *speC*, ассоциируемые с проявлением способности к образованию биопленки в блохах [4].

Сравнительное изучение образования биопленки у штаммов основного и неосновных подвидов. Согласно отечественной схеме внутривидовой классификации вид *Y. pestis* представлен пятью подвидами: основным и 4 неосновными (кавказским, алтайским, гиссарским, улегейским) [7]. Большинство штаммов основного подвида обладают высокой вирулентностью и высоким эпидемическим потенциалом, в то время как штаммы неосновных подвидов имеют избирательную вирулентность и низкий эпидемический потенциал.

Образование биопленки штаммами основного подвида *Y. pestis* и генетические основы этого процесса достаточно хорошо изучены [4, 6, 17, 18, 20, 30, 46, 47]. Способность неосновных подвидов к формированию биопленки оставалась до недавнего времени практически не исследованной. Нами изучены особенности формирования биопленки штаммами *Y. pestis* разных подвидов [5, 8, 20]. В результате впервые установлено, что большинство изученных штаммов неосновных подвидов формируют на различных типах поверхностей (биотические и абиотические) хорошо сформированную биопленку, наличие которой четко коррелирует с фенотипом пигментации [5].

При изучении генов, участвующих в синтезе и регуляции образования биопленки, выявлено наличие у неосновных подвидов генов *hmsHFRS* оперона, регуляторных генов *hmsT* и *hmsP*, генов *gmhA* (биосинтез гептозы), *speA* и *speC* (синтез полиаминов) [5]. В гене *rscA* (негативный регулятор образования биопленки в блохах) у всех изученных штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвидов, в отличие от штаммов *Y. pseudotuberculosis*, выявлено наличие вставки размером 30 п.н. (с 294 по 323 п.н. от начала гена), которая приводит к нарушению структуры гена и способствует формированию массивной биопленки в пищеварительном тракте блохи [5]. Полученные данные свидетельствуют о том, что становление способности к образованию биопленки в блохах произошло уже на ранних этапах эволюции вида *Y. pestis* и обеспечило развитие нового механизма передачи инфекции – трансмиссии с помощью беспозвоночных животных.

Роль биопленки в сложном жизненном цикле возбудителя чумы. Биопленка, по-видимому, играет важную роль не только в обеспечении трансмиссии чумы с помощью блох, но и в сохранении возбудителя во внешней среде вне организма теплокровного хозяина. До сих пор многое в сложном жизненном цикле *Y. pestis* остается неясным, в том числе не установлены способы сохранения возбудителя в периоды между эпизодами, которые часто бывают очень длительными и занимают до нескольких десятков лет. Все больше данных свидетельствуют в пользу того, что значимую роль в сохранении возбудителя чумы играют беспозвоночные животные – члены сложного биоценоза, в котором существует возбу-

дитель чумы. Общеизвестным является механизм длительного сохранения *Y. pestis* в виде биопленок в пищеварительном тракте переносчиков – блох. В организме заблокированной блохи чумной микроб может сохраняться достаточно долго – до нескольких месяцев [2]. Кроме того, сами заблокированные блохи способствуют диссеминации возбудителя, рассеивая фрагменты биопленки во внешнюю среду. Показано, что в условиях эксперимента в составе конгломератов биопленок с остатками кровяной пищи – «глыбок» – возбудитель чумы сохранял свою жизнеспособность в течение 7 лет наблюдения [3].

В сохранении возбудителя чумы во внешней среде, вероятно, принимают участие и члены почвенного биоценоза – нематоды и простейшие. В экспериментальных условиях показано, что чумной микроб может сохраняться в цистах простейших, а нематоды способствуют переносу клеток *Y. pestis* [6, 9]. Описан механизм вертикальной передачи возбудителя чумы из почвы в организм теплокровных животных, который происходит с участием паразитических нематод, способных переносить фрагменты биопленок в пищеварительный тракт блохи, заражая насекомых, обеспечивающих последующее инфицирование грызунов [8]. Перенос осуществляется по схеме: биопленки *Y. pestis* – личинки паразитических нематод – личинки блох – куколки блох – имаго блох – зараженные грызуны. Этот механизм удовлетворительно объясняет быстрое, иногда взрывное, начало эпизоотий чумы, которые начинаются одновременно на больших территориях природного очага. Наличие только заблокированных блох не может обеспечить такого быстрого начала эпизоотий чумы. Они играют важную роль в последующем развитии эпизоотий и в долговременном сохранении возбудителя в составе биопленок.

Таким образом, биопленки играют важную роль в жизненном цикле возбудителя чумы, однако их истинное значение еще предстоит выяснить.

Особенности формирования биопленки штаммами *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica*. Экспериментально показано, что штаммы возбудителя псевдотуберкулеза, как и *Y. pestis*, способны образовывать биопленку на абиотических поверхностях и кутикуле головной части нематоды *C. elegans*, что препятствует поеданию бактерий беспозвоночными животными [4, 5, 17, 19, 30]. Однако выявлены и существенные различия в формировании биопленки этими близкородственными бактериями [16, 28]. Так, по данным G. Joshua *et al.* [30] большинство штаммов *Y. pseudotuberculosis* не способны блокировать нематод в лабораторных условиях. Из 41 изученного ими штамма возбудителя псевдотуберкулеза, относящегося к 21 серовару, 76 % не образовывали биопленку на кутикуле нематод. Также установлено, что *Y. pseudotuberculosis* никогда не образует биопленку в преджелудке блохи, хотя на некоторое время может колонизировать его [2, 19].

Y. pseudotuberculosis, так же как и *Y. pestis*, содержит оперон *hmsHFRS*, детерминирующий биосинтез

экзополисахарида, а также регуляторные гены *hmsT* и *hmsP*, необходимые для формирования биопленки на абиотических и биотических поверхностях [17, 26, 29]. Высказано предположение о том, что различия в образовании биопленки между двумя видами *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* существуют не на уровне структуры экзополисахарида, а затрагивают процессы регуляции [20, 27]. В пользу этого предположения свидетельствуют экспериментальные данные о влиянии регуляторных генов *flhDC* и *rcaA* на способность *Y. pseudotuberculosis* образовывать биопленку на абиотической и биотической поверхностях [44, 49].

Способность к формированию биопленки у возбудителя кишечного иерсиниоза – *Y. enterocolitica* практически не изучена. По-видимому, биопленка *Y. enterocolitica* не является фактором его вирулентности, а способствует выживанию этого возбудителя во внешней среде, что подтверждает его способность к длительному сохранению в почве и воде. Показано, что образование биопленки клетками *Y. enterocolitica* зависит от наличия жгутиков, поскольку мутанты, лишенные жгутиков, дефектны по образованию биопленки из-за неспособности осуществлять эффективную адгезию к поверхности [31]. Различия в формировании биопленки клетками *Y. pestis* и *Y. enterocolitica*, по-видимому, связаны и с особенностями *hms* оперонов этих возбудителей, поскольку у возбудителя иерсиниоза были выявлены гены *hmsHFRS* и *hmsP*, но *hmsT* не обнаружен [31].

Проведенный анализ литературных данных и результатов собственных исследований позволяет заключить, что образование биопленок является сложным динамическим процессом, который регулируется многоуровневыми механизмами и обеспечивает соответствие метаболических процессов бактерий условиям их существования. Способностью к образованию биопленок обладают как патогенные, так и непатогенные бактерии, причем и те и другие используют ее для защиты от агрессивных воздействий среды обитания – иммунной системы хозяина или факторов внешней среды. В сложном жизненном цикле возбудителя чумы биопленка играет роль в обеспечении его трансмиссии с помощью беспозвоночных животных, а также в сохранении во внешней среде вне организма теплокровных животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бибикина В.А., Классовский Л.Н. Передача чумы блохами. М.: Медицина; 1974. 187 с.
2. Ващенко В.С. Блохи – переносчики возбудителей болезней человека и животных. Л.: Наука; 1988. 163 с.
3. 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):51–4.
4. Видяева Н.А., Ерошенко Г.А., Шавина Н.Ю. и др. Формирование биопленки штаммами *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов и *Yersinia pseudotuberculosis* на модели *Canorhabditis elegans*. Пробл. особо опасных инф. 2009; 1(99):31–4.
5. Видяева Н.А., Ерошенко Г.А., Шавина Н.Ю. и др. Изучение способности к образованию биопленок у штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2009; 5:13–19.
6. Видяева Н.А., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М. и др. Изучение

образования биопленки у штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в 2009 г. в Астраханской области. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2010; 3:3–7.

7. Кутырев В.В., Проценко О.А. Классификация и молекулярно-генетические исследования *Yersinia pestis*. Пробл. особо опасных инф. 1998; 78:11–17.

8. Кутырев В.В., Ерошенко Г.А., Попов Н.В. и др. Молекулярные основы взаимодействия возбудителя чумы с беспозвоночными животными. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2009; 4:6–13.

9. Никулишин С.В., Онацкая Т.Г., Луканина Л.М. и др. Изучение ассоциаций почвенных амёб *Hartmannella rhysodes* с бактериями – возбудителями чумы и псевдотуберкулеза в эксперименте. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1992; 9–10:2–5.

10. Achtmann M., Zurth K., Morelli G. et al. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999; 96(24):14043–8.

11. Bobrov A., Kirillina O., Perry R. The phosphodiesterase activity of the HmsP EAL domain is required for negative regulation of biofilm formation in *Yersinia pestis*. FEMS Microbiol. Lett. 2005; 247:123–30.

12. Bobrov A., Kirillina O., Forman S. et al. Insights into *Yersinia pestis* biofilm development: topology and co-interaction of Hms inner membrane proteins involved in exopolysaccharide production. Environ. Microbiol. 2008; 10(6):1419–32.

13. Bobrov A., Kirillina J., Ryjenkov D. et al. Systematic analysis of cyclic di-GMP signalling enzymes and their role in biofilm formation and virulence in *Yersinia pestis*. Mol. Microbiol. 2011; 79(2):533–51.

14. Bryers J. Medical biofilms. Biotechnol. Bioeng. 2008; 100(1):1–18.

15. Costerton J., Stewart P., Greenberg E. Bacterial biofilms: a common case of persistent infections. Science. 1999; 284:1318–22.

16. Cotter P., Stibitz S. c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. Curr. Opin. Microbiol. 2007; 10:17–23.

17. Darby C., Hsu J., Ghori N. et al. *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. Nature. 2002; 417:243–4.

18. Darby C., Ananth S., Tan L. et al. Identification of gmhA, a *Yersinia pestis* gene required for flea blockage, by using a *Caenorhabditis elegans* biofilm system. Infect. Immun. 2005; 73(11): 7236–42.

19. Erickson D., Jarrett C., Wren B. et al. Serotype differences and lack of biofilm formation characterize *Yersinia pseudotuberculosis* infection of the *Xenopsylla cheopis* flea vector of *Yersinia pestis*. J. Bacteriol. 2006; 188: 1113–9.

20. Eroshenko G.A., Vidyayeva N.A., Kutyrev V.V. Comparative analysis of biofilm formation by main and nonmain subspecies *Yersinia pestis* strains. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2010; 59:513–520.

21. Felek S., Lawrenz M., Krukons E. The *Yersinia pestis* autotransporter YapC mediates host cell binding, autoaggregation and biofilm formation. Microbiology. 2008; 154:1802–12.

22. Forman S., Bobrov A., Kirillina O. et al. Identification of critical amino acid residues in the plague biofilm Hms proteins. Microbiology. 2006; 152:3399–410.

23. Grabenstein J., Fukuto Y., Palmer L. et al. Characterization of phagosome trafficking and identification of PhoP-regulated genes important for survival of *Yersinia pestis* in macrophages. Infect. Immun. 2006; 74:3727–41.

24. Hall-Stoodley L., Costerton J., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Microbiology. 2004; 2:95–108.

25. Hall-Stoodley L., Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. Cel. Microbiol. 2009; 11(7):1034–43.

26. Hinnebusch J., Perry R., Schwan T. Role of the *Yersinia pestis* hemin storage (hms) locus in the transmission of plague by fleas. Science. 1996; 273:367–70.

27. Hinnebusch J., Erickson D. *Yersinia pestis* biofilm in the flea vector and its role in the transmission of plague. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2008; 322:229–48.

28. Jackson S., Burrows T. The pigmentation of *Pasteurella pestis* on a defined medium containing haemin. Brit. J. Exp. Pathol. 1956; 37:570–6.

29. Jarrett C., Deak E., Isherwood K. et al. Transmission of *Yersinia pestis* from an infectious biofilm in the flea vector. J. Infect. Dis. 2004; 190:783–92.

30. Joshua G., Karlyshev A., Smith M. et al. *Caenorhabditis elegans* model of *Yersinia* infection: biofilm formation on a biotic surface. Microbiology. 2003; 149:3221–9.

31. Kim T., Young B., Young G. Effect of flagellar mutations on *Yersinia enterocolitica* biofilm formation. Appl. Environ. Microbiol. 2008; 74(17):5466–74.

32. Kirillina O., Fetherston J., Bobrov A. et al. HmsP, a putative phosphodiesterase, and HmsT, a putative diguanylate cyclase, control Hms-dependent biofilm formation in *Yersinia pestis*. Mol. Microbiol. 2004; 54(1):75–88.

33. Khweek A., Fetherston J., Perry R. Analysis of HmsH and its

role in plague biofilm formation. Microbiology. 2010; 156:1424–38.

34. Lasa I. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. Intern. Microbiol. 2006; 9:21–8.

35. Lasa I., Penades J. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. Res. Microbiol. 2006; 157:99–107.

36. Lillard J., Fetherston J., Pedersen L. et al. Sequence and genetic analysis of the haemin storage (hms) system of *Yersinia pestis*. Gene. 1997; 193:13–21.

37. Monds R., O'Toole G. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. Trends Microbiol. 2009; 17(2):73–87.

38. O'Toole G., Kaplan Y., Kolter R. Biofilm formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol. 2000; 54:49–79.

39. Patel C., Wortham B., Lines J. et al. Polyamines are essential for the formation of plague biofilm. J. Bacteriol. 2006; 188:2355–63.

40. Perry R., Bobrov A., Kirillina O. et al. Temperature regulation of the hemin storage (Hms+) phenotype of *Yersinia pestis* is posttranscriptional. J. Bacteriol. 2004; 186:1638–47.

41. Simm R., Fetherston J., Fader A. et al. Phenotypic convergence mediated by GGDEF-domain-containing proteins. J. Bacteriol. 2005; 187(19):6816–23.

42. Stanley N., Lazazzera B. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. Mol. Microbiol. 2004; 52(4):917–24.

43. Stoodley P., Sauer R., Davies D. et al. Biofilms as complex differentiated communities. Annu. Rev. Microbiol. 2002; 56:187–209.

44. Sun Y., Hinnebusch J., Darby C. Experimental evidence for negative selection in the evolution of a *Yersinia pestis* pseudogene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008; 105(23):8097–101.

45. Sun Y., Koumoutsi A., Darby C. The response regulator PhoP negatively regulates *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis* biofilms. FEMS Microbiol. Lett. 2009; 290:85–90.

46. Tan L., Darby C. A movable surface: formation of *Yersinia sp.* biofilms on motile *Caenorhabditis elegans*. J. Bacteriol. 2004; 186:5087–92.

47. Tan L., Darby C. *Yersinia pestis* YrbH is a multifunctional protein required for both 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid biosynthesis and biofilm formation. Mol. Microbiol. 2006; 61:861–70.

48. Vuong C., Kocianova S., Voyich J. et al. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. J. Biol. Chem. 2004; 279:54881–6.

49. Wang Y., Ding L., Hu Y. et al. The fhDC gene affects motility and biofilm formation in *Yersinia pseudotuberculosis*. Sci. China. 2007; 50(6):814–21.

50. Wortham B., Oliveira M., Fetherston J. et al. Polyamines are required for the expression of key Hms proteins important for *Yersinia pestis* biofilm formation. Environ. Microbiol. 2010; 12(7):2034–47.

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

1. Bibikova V.A., Klassovsky L.N. [Plague Transmission by Fleas]. M.: Meditsina; 1974. 187 p.

2. Vashchenok V.S. [Fleas – vectors of infectious agents, which cause human and animal diseases]. L.: Nauka; 1988. 163 p.

3. Velichko L.N., Kondrashkina K.I., Ermilov A.P. et al. [Flea excrements are the natural habitat for *Y. pestis* long-lasting preservation]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 1978; 64:51–4.

4. Vidyayeva N.A., Eroshenko G.A., Shavina N. Yu., Kuznetsov O.S., Kutyrev V.V. [Biofilm formation in *Yersinia pestis* strains of the main and non-main subspecies and *Yersinia pseudotuberculosis* on the model of *Caenorhabditis elegans*]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2009; 1(99):31–4.

5. Vidyayeva N.A., Eroshenko G.A., Shavina N. Yu., Konnov N.P., Kuznetsov O.S., Odinkov G.N., Kutyrev V.V. [Study of the ability to form biofilms in *Yersinia pestis* strains of the main and non-main subspecies]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2009; 5:13–9.

6. Vidyayeva N.A., Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Kuznetsov O.S., Kutyrev V.V. [Study of the process of biofilm formation in *Yersinia pestis* strains isolated in 2009 in the territory of the Astrakhan region]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2010; 3:3–7.

7. Kutyrev V.V., Protsenko O.A. [Classification and molecular genetic studies of *Yersinia pestis*]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 1998; 78:11–7.

8. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Popov N.V., Vidyayeva N.A., Konnov N.P. [Molecular basis for interaction between plague agent and invertebrate animals]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 2009; 4:6–13.

9. Nikul'shin S.V., Onatskaya T.G., Lukaniina L.M. et al. [Studies of associations between soil *Hartmannella rhysodes* amoeba and pathogenic bacteria – *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, by way of experiment]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 1992; 9–10:2–5.

Authors:

Kukleva L.M., Eroshenko G.A., Vidyayeva N.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Видяева Н.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 29.08.11.

П.Ю.Попова, Н.И.Микшис, Т.Н.Щуковская, Ю.А.Попов

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ С ПАТТЕРН-РАСПОЗНАЮЩИМИ РЕЦЕПТОРАМИ ВРОЖДЕННОГО И АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА

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

По современным представлениям защита организма от патогенов обеспечивается функционированием двух звеньев иммунной системы – врожденной и приобретенной. На начальных этапах рецепторы неспецифического иммунитета, в том числе толл-подобные рецепторы, распознают консервативные патоген-ассоциированные молекулярные структуры. Последующая активация сигнальных путей приводит к быстрой нейтрализации и элиминации чужеродного агента. Одновременно происходит инициация начальных этапов адаптивного иммунитета, реализация каскада провоспалительных реакций. В обзоре обобщены и проанализированы литературные данные об особенностях развития врожденного и адаптивного иммунитета в случаях взаимодействия макроорганизма с возбудителем сибирской язвы. Потенциальными лигандами толл-подобных рецепторов у сибирезавяленного микроба являются протективный антиген, липопротеин, компоненты клеточной стенки, антролизин О, CpG последовательность ДНК и др. Приведены результаты экспериментов, доказывающих влияние синтетических агонистов толл-подобных рецепторов на реализацию цитотоксичности *Bacillus anthracis* и течение инфекционного процесса у лабораторных животных. Модификаторы функций толл-подобных рецепторов могут быть использованы как иммуностимуляторы при конструировании эффективных средств антиинфекционной защиты. Врожденный и приобретенный компоненты иммунитета, имея свои уникальные механизмы специфического распознавания возбудителя сибирской язвы, находятся во взаимодействии, дополняют и усиливают друг друга.

Ключевые слова: сибирская язва, *Bacillus anthracis*, иммунитет, Толл-подобные рецепторы, вакцины

P.Yu.Popova, N.I.Mikshis, T.N.Shchukovskaya, Yu.A.Popov

Interaction between *Bacillus anthracis* and Pattern-Recognizing Receptors of Innate and Adaptive Immunity

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

According to modern views, protection of an organism from different pathogens is achieved through functioning of the two chains of immune system – innate and acquired ones. Initially, receptors of non-specific immunity, including Toll-like receptors, identify conservative pathogen-associated molecular structures. The subsequent activation of signaling pathways leads to rapid neutralization and elimination of foreign agent. Concurrently, initiation of the adaptive immunity, and realization of pro-inflammatory reactions' cascade take place. The review summarizes literature data concerning peculiarities of innate and adaptive types of immunity in case of interaction between macro-organism and *Bacillus anthracis*. Protective antigen, lipoprotein, cell wall components, anthrolysine O, CpG DNA sequence and others are the potential ligands of Toll-like receptors in *B. anthracis*. Demonstrated are the results of experiments that bear evidence of the fact, that synthetic agonists of Toll-like receptors influence realization of *B. anthracis* cytotoxicity and course of infection in laboratory animals. Modifiers of Toll-like receptor functions can be used as immunostimulators for designing of effective means of anti-infectious protection. Innate and adaptive components of the immunity, having their own unique mechanisms of the specific *B. anthracis* identification, interact with each other, strengthen and complement each other.

Key words: anthrax, *Bacillus anthracis*, immunity, Toll-like receptors, vaccines.

Согласно данным эпидемиологических наблюдений ситуация по сибирской язве остается напряженной во многих странах мира. Вероятность подъема заболеваемости увеличивается при отсутствии или недостаточности профилактических мероприятий на эндемичной территории. В системе превентивных мер центральное место принадлежит вакцинации населения групп риска и сельскохозяйственных животных. В настоящее время в практике здравоохранения Российской Федерации для специфической профилактики сибирской язвы у людей используют живую вакцину *Bacillus anthracis* СТИ-1 [8]. Препараты на основе аттенуированных бескапсульных производных различных штаммов *B. anthracis* получены отечественными и зарубежными исследователями в середине XX века. Существенным их недостатком

является относительно высокий уровень реактогенности, связанный с воздействием на макроорганизм токсичных продуктов жизнедеятельности бактериального штамма. Используемые за рубежом химические вакцины менее реактогенны, однако по иммунологической эффективности они уступают препаратам на основе аттенуированных штаммов *B. anthracis*.

Достижения биологической и медицинской наук за последние несколько десятилетий расширили представления о клеточных и молекулярных механизмах взаимодействия макро- и микроорганизмов. В распоряжении исследователей появились принципиально новые подходы, основанные на современных знаниях о структуре и генетической детерминации факторов патогенности и иммуногенности микроорганизмов, о клеточных и молекулярных механизмах развития

патологических и иммунных процессов в организме человека или животного. В процессе создания новых вакцин и усовершенствования существующих используются как методы классической вакцинологии, так и приемы, основанные на достижениях геномики, протеомики, молекулярной биологии и иммунологии. Развитие генной инженерии и молекулярной генетики значительно снизило возможные риски, возникающие ввиду нестабильности введенного в микроорганизм чужеродного генетического материала. Однако с течением времени стало очевидно, что продукты геномных технологий обладают недостаточной иммуногенностью, так как в большинстве своем лишены патоген-ассоциированных молекулярных структур, взаимодействующих с рецепторами врожденного иммунитета.

По современным представлениям защита организма от патогенов обеспечивается функционированием взаимодополняющих звеньев иммунной системы – врожденной (неспецифической) и приобретенной (адаптивной, специфической). Врожденная иммунная система является первой линией защиты на пути микроорганизмов. В отличие от медленно развивающихся реакций адаптивной иммунной системы, заключающихся главным образом в пролиферации иммунокомпетентных клеток и образовании антител, для активации неспецифического иммунитета требуется относительно небольшой промежуток времени – минуты или часы. По мнению некоторых авторов, уничтожение и удаление патогенов нередко происходит без участия адаптивной иммунной системы, лишь посредством реакций врожденного иммунитета [16, 31].

В активации механизмов неспецифического иммунитета можно выделить два основных этапа – идентификация агонистов рецепторами и передача сигнала клеткам, обеспечивающим формирование адаптивного иммунитета [11]. На первом этапе происходит распознавание широкого спектра высококонсервативных структур, не подвергающихся мутационным изменениям и необходимых для выживания микроорганизмов – патоген-ассоциированных молекулярных структур (ПАМС) [30]. Примерами таких молекулярных паттернов могут служить компоненты клеточной стенки бактерий и грибов (липополисахариды грамотрицательных бактерий, пептидогликаны грамположительных микроорганизмов), нуклеиновые кислоты (вирусная двуспиральная РНК; ДНК бактерий, обогащенная CpG-последовательностями), белки (флагеллин, профилин).

Узнавание ПАМС осуществляется так называемыми паттерн-распознающими рецепторами (ППР). К ППР относят различные по строению и происхождению молекулы, обнаруженные на поверхностной мембране клеток, на мембранах эндоплазматического ретикулума и эндолизосом, в цитозоле, а также во внеклеточных средах, что позволяет врожденной иммунной системе контролировать большинство компартментов клетки и организма. Взаимодействие

ПАМС с ППР приводит либо к непосредственной нейтрализации патогена, либо к запуску каскада провоспалительных реакций, в конечном итоге приводящих к блокированию жизнедеятельности и элиминации патогена из макроорганизма [14].

В настоящее время наиболее хорошо изучена подгруппа Толл-подобных рецепторов (Toll-like receptor, TLR). Впервые представитель этого семейства (белок Toll) был открыт у *Drosophila melanogaster*. Впоследствии подобные рецепторы выявляли у растений, насекомых и позвоночных, включая млекопитающих и человека [1]. На данный момент у человека изучено 10 функциональных TLR. Рецепторы данного семейства способны распознавать практически все основные виды патогенов – бактерии, грибы, простейшие, вирусы [28].

Конститутивно TLR обнаруживаются главным образом на клетках миеломоноцитарного ряда, на различных популяциях лимфоцитов, дендритных клетках, гепатоцитах [13]. Помимо иммунокомпетентных клеток, TLR экспрессируются клетками других типов, вступающих в непосредственный контакт с патогенами в зоне их проникновения (кожа, респираторный, кишечный и урогенитальный тракты). Взаимодействие с патогенами может происходить на клеточной поверхности с участием TLR 1, 2, 4, 5, 6 и 11. В противоположность им, TLR 3, 7, 8 и 9 после синтеза остаются в эндоплазматической сети и при активации клетки транслоцируются в лизосомы, участвуя в распознавании нуклеиновых кислот.

Взаимодействие компонентов возбудителей с TLR является специфичным, то есть для каждого рецептора имеется свой лиганд. Часть TLR узкоспецифична, например, TLR3 связывает только двуспиральную РНК, TLR5 – флагеллин, TLR9 – CpG ДНК. Более широким диапазоном взаимодействия с ПАМС обладает TLR4, связывающийся с вирусными структурами, липополисахаридом, маннаном грибов. Большинство TLR функционируют в форме гомодимеров, исключение составляют TLR1 и TLR6, образующие гетеродимеры с TLR2 [30].

В молекуле TLR присутствуют два консервативных домена. Внеклеточная N-концевая часть представлена лигандраспознающим LRR-доменом (тандемные повторяющиеся участки с повышенным содержанием лейцина). Внутриклеточная C-концевая часть рецептора – сигнальный TIR-домен (Toll/IL-1 гомологичный домен), отвечающий за взаимодействие с адаптерными молекулами. Между LRR- и TIR-доменами находится короткий трансмембранный участок, который обеспечивает внутриклеточную сортировку TLR [12].

Связывание лиганда приводит к конформационным изменениям TLR, необходимым для привлечения сигнальных молекул. Как правило, они включают адаптерную молекулу MyD88 (белок первичного ответа миелоидной дифференцировки 88), TIRAP (адаптерный белок, содержащий TIR-домен), IRAK киназы (киназы, ассоциированные с рецептором

интерлейкина-1 (ИЛ-1)), TRAF (фактор 6, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухоли (ФНО- α)) [3]. Конечным итогом активации сигнального пути является индукция экспрессии генов провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-12, ИЛ-18, ФНО- α), хемокинов (ИЛ-8) и антимикробных пептидов (дефензинов, кателицидинов) [12, 13, 17].

Таким образом, активация системы врожденного иммунитета инициирует развитие комплекса воспалительных реакций, приводящих к уничтожению и элиминации патогена.

Роль TLR в формировании неспецифической резистентности к сибиреязвенному микробу в последнее время изучается достаточно интенсивно. Распознавание *B. anthracis* врожденной иммунной системой, по мнению некоторых авторов, играет ключевую роль в развитии инфекции [29, 33].

Синтез компонентов токсина сибиреязвенного микроба детерминируется генами, входящими в состав высокомолекулярного репликона *pXO1* [20]. Структура экзотоксина характерна для А-В модели бактериальных токсинов: общей субъединицей В является протективный антиген (ПА), субъединицу А представляют отечный фактор (ОФ) или летальный фактор (ЛФ). ОФ является кальмодулин-зависимой аденилатциклазой, действие которой заключается в превращении аденозинтрифосфата в циклический аденозинмонофосфат (цАМФ). Накопление цАМФ приводит к изменению внутриклеточного водного баланса и клинически выражается в массивном отеке тканей. ЛФ-цинк-зависимая металлопротеаза, расщепляющая аминокислотные последовательности митоген-активируемых протеиновых киназ, что приводит к инактивации сигналов интермедиатов, необходимых для формирования иммунного ответа. ЛФ оказывает повреждающее воздействие на различные иммунные клетки – макрофаги, нейтрофилы, Т- и В-лимфоциты, блокируя процессы пролиферации, продукцию цитокинов и иммуноглобулинов. ОФ и ЛФ, взаимодействуя с ПА, формируют отечный и летальный токсины, которые после попадания в клетку реализуют свое повреждающее действие на макроорганизм [22]. Отечный токсин оказывает ингибирующий эффект на нейтрофилы. Компоненты клеточной стенки и летальный токсин стимулируют продукцию провоспалительных цитокинов, что приводит к развитию обширных геморрагий и клеточной деструкции.

Участвуя, таким образом, в реализации вирулентных свойств сибиреязвенного микроба, ПА является основным иммуногеном *B. anthracis*. Однако, помимо ПА, на иммунный ответ макроорганизма оказывают влияние и другие факторы. Установлено, что штаммы *B. anthracis*, синтезирующие ПА в сочетании с ОФ или ЛФ, оказывают более выраженный протективный эффект при заражении мышей вирулентными сибиреязвенными штаммами, по сравнению с генно-инженерными штаммами, синтезирующими только ПА [24]. Добавление к ПА по-

лимера капсулы сибиреязвенного микроба улучшает иммунологические характеристики препарата [18]. Показано, что для обеспечения полноценной защиты лабораторных животных от заражения вирулентным штаммом *B. anthracis* необходимо наличие в иммунизирующем препарате споровых антигенов [4, 15].

К настоящему времени у возбудителя сибирской язвы выявлено несколько потенциальных лигандов TLR: для TLR2 – липопроtein и компоненты клеточной стенки, для TLR4 – антролизин О, для TLR9 – CpG последовательность ДНК [23, 29, 35].

М. Triantafilou *et al.* исследовали закономерности распознавания возбудителя сибирской язвы посредством TLR. Клетки эпителия легких человека инкубировали с различными антигенами *B. anthracis* – компонентами клеточной стенки, ПА и ЛФ. При отсутствии стимуляции на поверхности клеток экспрессировалось минимальное количество TLR. Экспрессия TLR2 и TLR6 существенно возрастала в ответ на стимуляцию компонентами клеточной стенки сибиреязвенного микроба или ПА. В этих случаях увеличивался синтез провоспалительных цитокинов – интерферона- α и ИЛ-6. Стимуляция ЛФ или комбинацией ПА и ЛФ в гораздо меньшей степени влияла на экспрессию TLR2 и TLR6. Аналогичные результаты были получены при использовании клеточных линий с гетеродимерами TLR2/6. Вместе с тем клеточные линии, не экспрессирующие TLR, после контакта со всеми исследованными антигенами не были способны к продукции интерлейкинов. Таким образом, при сибирской язве активация сигнального пути осуществляется главным образом через гетеродимеры TLR2/6 вслед за воздействием на них компонентов клеточной стенки или ПА. Неспособность ЛФ, а также комбинации ЛФ и ПА, активировать TLR2/6 лежит в основе патогенеза сибиреязвенной инфекции. При образовании комплекса ПА с ЛФ происходит изменение структуры ПА и, как следствие, он не распознается системой врожденного иммунитета. По мнению авторов, данный феномен отчасти объясняет столь высокую патогенность природных штаммов *B. anthracis* [29].

В работе S. Weiss *et al.* подтверждено участие TLR2 в активации макрофагов при сибиреязвенной инфекции. Исследования проводили *in vitro* с использованием клеточных линий и перитонеальных макрофагов лабораторных животных и *in vivo* – на биомоделях с активными и инактивированными TLR2 [33].

Теоретически индукция врожденного иммунитета путем введения лигандов TLR до начала инфекционного процесса может способствовать повышению устойчивости макроорганизма к инфекции, приведет к снижению продукции цитокинов, а также защитит макрофаги от ассоциированной с возбудителем сибирской язвы цитотоксичности. Для подтверждения данной гипотезы изучали секрецию цитокинов (ИЛ-6, ИЛ-10, ИЛ-12, ФНО- α) макрофагами костного мозга мышей после контакта со спорами и вегетативными

клетками возбудителя сибирской язвы, сравнивая результаты, полученные с использованием стимуляции лигандами TLR7 и TLR9 и без нее. В предварительных экспериментах было установлено, что лиганд TLR9 не стимулирует синтез провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ФНО- α , но активно индуцирует повышение уровня ИЛ-12 и ИЛ-10. Лиганды TLR7 индуцируют синтез всех четырех цитокинов, но не столь активны в отношении ФНО- α . Обнаружено также, что споры сибиреязвенного микроба обладают менее выраженной способностью к индукции секреции цитокинов макрофагами. В результате при взаимодействии макрофагов с вегетативными клетками *B. anthracis* лиганды TLR7 и TLR9 достоверно уменьшали продукцию цитокинов [25]. В экспериментах *in vivo* интраназальное введение агонистов TLR9 и TLR7 способствовало значительному замедлению развития легочной формы сибирской язвы и сокращению числа летальных исходов у лабораторных животных [34, 35].

Считается, что специфическим лигандом для TLR4 является липополисахарид грамотрицательных бактерий. Тем не менее, в случае воздействия микробных клеток *B. anthracis* на макрофаги костного мозга мышей наблюдали апоптоз, зависящий от активации TLR4. В своей работе J.M.Park *et al.* установили, что лигандом TLR4 у сибиреязвенного микроба является антролизин О, который индуцирует экспрессию генов цитокинов и апоптоз макрофагов [23].

Показано, что интерферон 1 типа способен защищать 60 % линейных белых мышей от развития заболевания при ингаляционном попадании возбудителя сибирской язвы [32]. В качестве средства неспецифической профилактики сибирской язвы предлагается также использовать кателицидин, относящийся к группе катионных пептидов и обладающий бактерицидными и иммуномодулирующими свойствами [21].

Стимуляция системы врожденного иммунитета посредством активации TLR имеет немаловажное значение для регуляции начальных этапов развития адаптивного иммунитета и выбору варианта развития иммунного ответа в зависимости от типа патогена. Как известно, активация Т- и В-клеток происходит за счет сигналов, поступающих от врожденной иммунной системы. Система врожденного иммунитета регулирует функции дендритных клеток, облегчает процессинг и презентацию антигенов, запускает секрецию цитокинов, стимулирующих дифференцировку Т-хелперов. С другой стороны, адаптивная иммунная система антиген-специфически усиливает ответ врожденной иммунной системы, что в ряде случаев приводит к быстрой элиминации возбудителей инфекционных заболеваний [11]. Таким образом, обе системы иммунитета, находясь во взаимодействии, имеют свои уникальные механизмы специфического распознавания патогенов, дополняющие, усиливающие и регулирующие друг друга.

Особенности формирования адаптивного иммунитета подробно изучались на примере лицензиро-

ванных средств специфической профилактики сибирской язвы. В странах бывшего Советского Союза для вакцинации населения, подвергающегося риску заражения возбудителем особо опасного инфекционного заболевания, рекомендована живая споровая вакцина – *B. anthracis* СТИ-1.

Установлено, что эффективность вакцинации живой споровой вакциной *B. anthracis* СТИ-1 при регламентированной двукратной иммунизации с интервалом 21 день составляет 87,8 %. Исследование привитых с помощью косвенных иммунологических тестов через 3, 6 и 12 мес. после введения вакцины выявило, соответственно, 75–80, 55–60 и 43–48 % лиц с высоким уровнем иммунитета. Но даже при двукратной иммунизации людей лицензированной споровой вакциной иммунитет ослабевает раньше (менее года), чем у переболевших сибирской язвой (несколько лет).

Проблемой использования живых вакцин является их реактогенность. По некоторым данным, у лиц, привитых *B. anthracis* СТИ-1, общие реакции средней и сильной степени тяжести возникают в 0,65–2,61 %, осложнения локального характера – 10,7–13,3 % случаев от общего числа вакцинированных [6].

В медицинской практике США и Великобритании для вакцинопрофилактики людей с начала 50-х гг. XX века используются химические вакцины для подкожного или внутримышечного введения, основой которых является адсорбированный на гидроокиси алюминия ПА, выделенный из культурального фильтрата штамма *B. anthracis* Sterne 34F₂ или его производного.

В ответ на введение препарата ПА формируется напряженный, но недостаточно длительный иммунитет, что приводит к необходимости многократных бустерных иммунизаций. Кроме того, химическая вакцина индуцирует в макроорганизме преимущественно гуморальное звено адаптивного иммунитета, в то время как для формирования полноценной защиты от заражения возбудителем сибирской язвы необходим и клеточный иммунный ответ [2]. Живые вакцины обеспечивают более эффективную защиту от заражения возбудителем сибирской язвы ввиду наличия у них дополнительных антигенов [19], а также ПАМС, взаимодействующих с рецепторами врожденного иммунитета.

Химические вакцины, получаемые из аттенуированных штаммов *B. anthracis*, содержат ненормированные количества токсичных примесей – ОФ, ЛФ и других продуктов жизнедеятельности микробных клеток. По литературным данным, наиболее часто регистрируемыми побочными действиями химических препаратов являются: аллергические реакции, отек, инфильтрация и боль в месте введения вакцины, головная боль, астения и кожный зуд. В редких случаях в ответ на введение вакцины могут отмечаться так называемые отсроченные осложнения – одышка, выраженное потоотделение, бледность кожи, экзанте-

ма. Зарегистрированы случаи некроза в области инъекции химической вакцины [27].

Разработанная в 1998 г. в России комбинированная сибиреязвенная вакцина представляет собой композицию бесклеточного препарата ПА, адсорбированного на геле гидроокиси алюминия, и спор вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 [9]. Эффективность защиты от заражения возбудителем сибирской язвы при введении данной вакцины составляет 90–100 %. Формирование напряженного иммунитета при регламентированном однократном применении комбинированной вакцины наступает уже к 7–10-м суткам, в то время как при двукратном и трехкратном применении живой и химической вакцин – через 1–1,5 мес. соответственно. Показана эффективность сочетанного применения комбинированной вакцины с антибиотиками. Доклинические испытания комбинированного препарата не выявили существенных отличий по безвредности и реактогенности в сравнении с живой вакциной. В ряде случаев уровень защиты экспериментальных животных превышал эффект от применения каждого из ее компонентов в отдельности [8].

Основной принцип совершенствования живых вакцин заключается в генно-инженерном конструировании авирулентных штаммов, синтезирующих иммуногенные антигены. Например, устранения токсичности образующихся *in vivo* комплексов ПА с ОФ и ЛФ можно достичь контролируемой модификацией кодирующих их генов [26]. Подобные генетические конструкции при сохранении всех преимуществ живых вакцин являются менее реактогенными. Они могут быть использованы и как продуценты антигена, характеризующегося высокой иммуногенностью и ареактогенностью.

Основной принцип совершенствования химических вакцин заключается во введении дополнительных антигенов, выбор которых осуществляется исходя из особенностей патогенеза и иммуногенеза инфекционных заболеваний. В качестве компонентов, повышающих иммуногенность сибиреязвенных химических вакцин, предлагаются споровые и капсульные антигены, белки S-слоя, детоксицированные ОФ и ЛФ [5]. Перспективным направлением считают разработку иммуноактиваторов, модулирующих формирование адаптивного иммунитета [10]. Их действие направлено непосредственно на иммунокомпетентные клетки, прежде всего антиген-презентирующие клетки. К иммуноактиваторам относят природные и синтетические агонисты TLR, цитокины, хемокины, костимулирующие молекулы.

Модификаторы функций TLR могут использоваться как адъюванты в конструировании эффективных средств антиинфекционной защиты, в том числе при пандемиях и актах биотерроризма, а также в качестве средств моно- или комплексной терапии практически всех видов патологии человека. В 2007 г. на разных стадиях клинических испытаний находились 32 модификатора функций TLR и сигнальных путей

развития иммунных реакций. Однако в настоящее время для применения в практике разрешены только монофосфорилированный липид А – агонист TLR4 и синтетический препарат imiquimod – агонист TLR7.

Перспективно исследование семейства цитозингуанин дезоксинуклеотидов (CpG-семейство), являющихся агонистами TLR9. Установлено, что CpG-участки молекул ДНК могут до 500 раз ускорять и усиливать выработку антиген-специфических антител. Способность представителей CpG-семейства переключать Th-2 ответ на Th-1 широко применяется при конструировании антиаллергических терапевтических вакцин. Препараты, содержащие CpG-мотивы, рассматриваются как оптимальная платформа для комбинированных адъювантов [10].

В ближайшем будущем ожидается расширение работ по созданию новых модификаторов TLR, оценке их клинической эффективности и безопасности. Интересно, что комбинация агонистов TLR позволяет создавать вакцины против широкого круга патогенов, в том числе и относящихся к различным таксономическим группам бактерий, вирусов, простейших или грибов, а также вакцины, сочетающие антиинфекционную активность с действием против других видов патологии – аллергической, аутоиммунной, онкологической природы. В России разработана вакцина Иммуновак. Она состоит из антигенных комплексов условно-патогенных бактерий и содержит лиганды, активация которых обеспечивает защиту против бактериальных (TLR2, TLR4, TLR6 и TLR8), вирусных инфекций (TLR2, TLR4, TLR9) и положительно влияет на течение аллергии (TLR4, TLR9). Существует мнение, что именно комбинированные адъюванты станут неотъемлемым компонентом вакцин нового поколения [7].

Таким образом, при создании современных средств неспецифической и специфической профилактики сибирской язвы необходимо проводить комплексное исследование их взаимодействия с паттерн-распознающими рецепторами врожденного и приобретенного иммунитета. Данный подход позволит существенно повысить эффективность разрабатываемого препарата и минимизировать его вредное влияние на макроорганизм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Байракова А.Л., Воронцова Е.А., Афанасьев С.С., Алёшкин В.А., Несвижский Ю.В., Караулов А.В. и др. Роль и биологическое значение Toll-подобных рецепторов в антиинфекционной резистентности организма. Вестник Российской АМН. 2008; 1:45–54.
2. Дербин М.И., Садовой Н.В., Тарумов В.С., Гарин Н.С. Сравнительное изучение гуморального противосибиреязвенного иммунитета у привитых живой и химической вакцинами. Иммунология. 1982; 3:49–52.
3. Ковальчук Л.В., Хорева М.В., Варивода А.С. Врожденные компоненты иммунитета: Toll-подобные рецепторы в норме и при иммунопатологии. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005; 4:96–104.
4. Маринин Л.И., Онищенко Г.Г., Кравченко Т.Б., Дятлов И.А., Тюрин Е.А., Степанов А.В. и др. Сибирская язва человека: эпидемиология, профилактика, диагностика, лечение. М.: ЗАО МП «Гигиена»; 2008. 416 с.
5. Микиш Н.И., Попов Ю.А., Кутырев В.В. Современные представления о факторах патогенности и иммуногенности воз-

будителя сибирской язвы. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2010; 3: 96–101.

6. Онищенко Г.Г., Васильев Н.Т., Литусов Н.В., Харечко А.Т., Васильев П.Г., Садовой Н.В. и др. Сибирская язва: актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики. М.: ВУНМИЦ МЗ РФ; 1999. 447 с.

7. Онищенко Г.Г., Пальцев М.А., Зверев В.В., Иванов А.А., Киселёв В.И., Нетесов С.В. и др. Биологическая безопасность. М.: ОАО «Издательство «Медицина». 2006. 304 с.

8. Пименов Е.В., Дармов И.В., Васильев Н.Т., Кожухов В.В., Бондарев В.П., Кутырев В.В. и др. Состояние вопроса и перспективы разработки вакцин против сибирской язвы. Эпидемиол. и вакцинопрофилактик. 2002; 5:42–6.

9. Садовой Н.В., Кравец И.Д., Селиваненко Г.М., Харечко Г.С., Садовая Е.А., Васильев П.Г. и др. Вакцина сибиреязвенная комбинированная. Патент РФ № 2115433.

10. Семенов Б.Ф., Зверев В.В., Хайтов Р.М. Прогноз развития вакцинопрофилактики в первые десятилетия XXI века. Иммунол. 2009; 6:324–35.

11. Симбирцев А.С. Толл-белки: специфические рецепторы неспецифического иммунитета. Иммунология. 2005; 6:368–77.

12. Хайтов Р.М., Пащенко М.В., Пинегин Б.В. Роль паттерн-распознающих рецепторов во врожденном и адаптивном иммунитете. Иммунология. 2009; 1:66–76.

13. Хорева М.В., Ковальчук Л.В., Варивода А.С., Николаева И.Н., Грачева Л.А., Галухина Е.Р. и др. Опосредованные через Toll-подобные рецепторы выработка цитокинов и экспрессия поверхностных маркеров лейкоцитами человека. Аллергол. и иммунол. 2006; 7(2):199–206.

14. Balamayooran T., Balamayooran G., Jeyaseelan S. Toll-like receptors and NOD-like receptors in pulmonary antibacterial immunity. *Innate Immun.* 2010; 16(3):201–10.

15. Brossier F., Levy M., Mock M. Anthrax spores make an essential contribution to vaccine efficacy. *Infect. Immun.* 2002; 70(2):661–4.

16. Hallman M., Ramet M., Ezekowitz R.A. Toll-like receptors as sensors of pathogens. *Pediatr. res.* 2001; 50(3):315–21.

17. Hughes M. A., Green C. S., Lowchyi L., Lee G.M., Grippe V.K., Smith M.F. et al. MyD88-dependent signaling contributes to protection following *Bacillus anthracis* spore challenge of mice: implications for toll-like receptor signaling. *Infect. Immun.* 2005; 73(11):7535–40.

18. Joyce J., Cook J., Chabot D., Hepler R., Shoop W., Xu Q., et al. Immunogenicity and protective efficacy of *Bacillus anthracis* poly-γ-D-glutamic acid capsule covalently coupled to a protein carrier using a novel triazine-based conjugation strategy. *Biol. chem.* 2006; 281(8):4831–3.

19. Ivins B., Welkos S. Recent advances in the development of an improved human anthrax vaccine. *Eur. J. Epidemiol.* 1988; 4:12–19.

20. Koehler T.M. *Bacillus anthracis* physiology and genetics. *Mol. Aspects Med.* 2009; 30:386–96.

21. Lizaranby M.W., Swiecki M.K., Dizon B.L., Pflughoeft K.J., Koehler T.M., Kearney J.F. Cathelicidin administration protects mice from *Bacillus anthracis* spore challenge. *J. Immunol.* 2008; 181(11):4989–5000.

22. Mock M., Fouet A. Anthrax. *Microbiol. Rev.* 2001; 55:647–71.

23. Park J.M., Ng V.H., Maeda S., Rest R.F., Karin M. Anthrolysin O and other Gram-positive cytolysins are Toll-like receptor 4 agonists. *J. Exp. Med.* 2004; 200(12):1647–55.

24. Pezard C., Weber M., Sirard J., Berche P., Mock M. Protective immunity induced by *Bacillus anthracis* toxin-deficient strains. *Infect. Immun.* 1995; 63:1369–72.

25. Sabet M., Cottam H. B., Guiney D.G. Modulation of cytokine production and enhancement of cell viability by TLR7 and TLR9 ligands during anthrax infection of macrophages. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2006; 47:369–79.

26. Singh Y., Klimpel K., Arora N., Sharma M., Leppla S. The chymotrypsin-sensitive site, FFD315, in anthrax toxin protective antigen is required for translocation of lethal factor. *J. Biol. Chem.* 1994; 269:29039–46.

27. Swanson-Bearman B., Krenzelok E. Delayed life-threatening reaction to anthrax vaccine. *J. Clin. Toxicol.* 2001; 39(1):81–4.

28. Takeda K., Akira S. Toll receptors and pathogen resistance.

Cell. Microbiol. 2003; 5(3):143–53.

29. Triantafyllou M., Uddin A., Maher S., Charalambous N., Hamm T.S.C., Alsumati A. et al. Anthrax toxin evades Toll-like receptor recognition whereas its cell wall components trigger activation via TLR 2/6 heterodimers. *Cell. Microbiol.* 2007; 9(12):2880–92.

30. Uematsu S., Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *J. Mol. Med.* 2006; 84:712–25.

31. Valiante N., O'Hagan D., Ulmer J. Innate immunity and biodefence vaccines. *Cell. Microbiol.* 2003; 5(11):755–60.

32. Walberg K., Baron S., Poast J., Schwartz B., Izotova L., Pestka S. et al. Interferon protects mice against inhalation anthrax. *J. Interferon Cytokine Res.* 2008; 28(10):597–601.

33. Weiss S., Levy H., Fisher M., Kobiler D., Altboum Z. Involvement of TLR2 in innate immune response to *Bacillus anthracis* infection. *Innate Immun.* 2009; 15(1):43–51.

34. Wu C.C., Hayashi T., Takabayashi K., Sabet M., Smee D.F., Guiney D.D. et al. Immunotherapeutic activity of a conjugate of a Toll-like receptor 7 ligand. *PNAS.* 2007; 104(10):3990–95.

35. Wu C.C., Sabet M., Hayashi T. In vivo efficacy of a phosphodiester TLR9 aptamer and its beneficial effect in a pulmonary anthrax infection model. *Cell. Immunol.* 2008; 251(2):78–85.

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

1. Bairakova A.L., Voropaeva E.A., Afanas'ev S.S., Aleshkin V.A., Nesvizhskiy Yu.V., Karaulov A.V. et al. [Role and biological significance of Toll-like receptors in the process of anti-infectious resistance of organism]. *Vestnik RAMS.* 2008; 1:45–54.

2. Derbin M.I., Sadovoy N.V., Tarumov V.S., Garin N.S. [Comparative studies of humoral anti-anthrax immunity in those inoculated by live and chemical vaccines]. *Immunologia.* 1982; 3:49–52.

3. Koval'chuk L.V., Khoreva M.V., Varivoda A.S. [Inborn components of immunity: Toll-like receptors in the normal state and immune pathology]. *Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2005; 4:96–104.

4. Marinin L.I., Onishchenko G.G., Kravchenko T.B., Dyatlov I.A., Tyurin E.A., Stepanov A.V. et al. [Human anthrax: epidemiology, prophylaxis, diagnostics, and treatment]. M.: ZAO MP "Gigiena"; 2008. 416 p.

5. Mikshis N.I., Popov Yu. A., Kutyrev V.V. [Modern views on pathogenicity and immunogenicity factors of *Bacillus anthracis*]. *Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2010; 3:96–101.

6. Onishchenko G.G., Vasil'ev N.T., Litusov N.V., Kharechko A.T., Vasil'ev P.G., Sadovoy N.V. et al. [Anthrax: relevant aspects of microbiology, epidemiology, clinical picture, diagnostics, treatment and prophylaxis]. M.: Ministry of Health of the Russian Federation; 1999. 447 p.

7. Onishchenko G.G., Pal'tsev M.A., Zverev V.V., Ivanov A.A., Kiselev V.I., Netesov S.V. et al. [Biosafety]. M.: ОАО Изд. "Медицина". 2006. 304 p.

8. Pimenov E.V., Darmov I.V., Vasil'ev N.T., Kozhukhov V.V., Bondarev V.P., Kutyrev V.V. et al. [Current state and perspectives of the development of anthrax vaccines]. *Epidemiol. Vaktsinoprofilakt.* 2002; 5:42–6.

9. Sadovoy N.V., Kravets I.D., Selivanenko G.M., Kharechko G.S., Sadovaya E.A., Vasil'ev P.G. et al. [Combined anthrax vaccine]. RF Patent № 2115433.

10. Semenov B.F., Zverev V.V., Khaitov R.M. [Prognosis of the development of vaccine prophylaxis in the first decades of the XXI century]. *Immunologia.* 2009; 6:324–35.

11. Simbirtev A.S. [Toll-proteins: specific receptors of non-specific immunity]. *Immunologia.* 2005; 6:368–77.

12. Khaitov R.M., Pashchenkov M.V., Pinegin B.V. [Role of the pattern-identifying receptors in inborn and adaptive immunity]. *Immunologia.* 2009; 1:66–7.

13. Khoreva M.V., Koval'chuk L.V., Varivoda A.S., Nikolaeva I.N., Gracheva L.A., Galukhina E.R. et al. [Toll-like receptor mediated cytokine production and surface marker expression by means of human leukocytes]. *Allergol. Immunol.* 2006; 7(2):199–206.

Authors:

Popova P.Yu., Mikshis N.I., Shchukovskaya T.N., Popov Yu.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Попова П.Ю., Микуш Н.И., Щуковская Т.Н., Попов Ю.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 30.11.10.

Н.П.Храпова, В.В.Алексеев

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ СЕРОДИАГНОСТИКИ МЕЛИОИДОЗА

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград

Аналитический обзор посвящен вопросам серодиагностики мелиоидоза и перспективам ее совершенствования. Материалы цитируемых публикаций отражают значимость обнаружения специфических антител в исследуемых пробах как для ранней, так и ретроспективной диагностики мелиоидоза, а также для корректного лечения больных этой опасной инфекцией.

В обзоре обобщены сведения о современных подходах к выбору метода серодиагностики в эндемичных и неэндемичных зонах распространения возбудителя инфекции, достоинствах и ограничениях наиболее широко применяемых методов обнаружения специфических антител (РНГА и ТИФМ). В последние годы внимание профильных специалистов направлено преимущественно на создание коммерчески доступных иммуноферментных тест-систем для обнаружения антител к возбудителю мелиоидоза, что обеспечит внедрение ТИФМ в лабораторную практику раннего выявления случаев заболевания людей мелиоидозом.

Ключевые слова: мелиоидоз, методы обнаружения антител.

N.P.Khrapova, V.V.Alekseev

Current State of Human Melioidosis Serodiagnostics

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd

This analytical review is devoted to matters of human melioidosis serodiagnostics and prospects of its development and enhancement. Materials of the publications cited reflect particular significance of the specific antibody detection, for both the early and retrospective diagnostics of human melioidosis, as well as for the correct treatment of patients.

Summarized are the data on modern approaches to the selection of serodiagnostics methods in the endemic and non-endemic areas, on the advantages and limitations of the most widely applicable methods for the specific antibody detection (indirect hemagglutination test and solid-phase ELISA). In recent years, development of commercially available enzyme-linked test systems for the detection of antibodies to human melioidosis agent has become an object of intense interest, as this will provide for solid-phase ELISA implementation into the laboratory practice for early detection of melioidosis cases in humans.

Key words: melioidosis, methods of antibody detection.

Вопросы раннего выявления случаев заболевания людей мелиоидозом постоянно находятся в поле зрения специализированных лабораторий в связи с существующим риском завоза инфекции на территорию Российской Федерации из регионов эндемичного распространения *Burkholderia pseudomallei*, а также в контексте рассматриваемых сценариев биотеррористических атак с применением данного микроорганизма [4, 12, 17, 19]. Как в первом, так и во втором случае будут востребованы не только средства обнаружения патогена, но и средства серодиагностики.

При возникновении чрезвычайных ситуаций, обусловленных предполагаемым или реализованным биотеррористическим актом, сеть наблюдения и лабораторного контроля гражданской обороны Российской Федерации последовательно переходит на режим повышенной готовности, затем – на режим чрезвычайной ситуации. При этом лабораторный контроль регламентированных объектов исследования в части установления факта применения биологических агентов нацелен на своевременное обнаружение и идентификацию патогенов [3]. После появления спорадических или массовых случаев заболеваний людей, лаборатории, работающие по схеме индикации биологических средств, будут получать разнообразные пробы, в том числе пробы клиниче-

ского материала. С этого момента, помимо выявления антигена (возбудителя инфекции), сотрудники лабораторной службы приступают к обнаружению специфических антител, в частности, к возбудителю мелиоидоза. Выявление специфических антител имеет существенное значение для постановки правильного диагноза мелиоидоза и начала своевременного лечения [33, 37].

Для этих целей был разработан ряд тестов, каждый из которых имеет определенные ограничения [11, 36, 45, 47]. Наиболее информативными иммунодиагностическими тестами, пригодными для использования в практических лабораториях, признаны реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) и твердофазный иммуноферментный метод (ТИФМ).

Несмотря на большое число публикаций, посвященных результатам применения РНГА и ТИФМ для серодиагностики мелиоидоза, единой тактики применения РНГА с диагностикумами эритроцитарными антигенными и тест-систем иммуноферментных для обнаружения антител не предложено. Остается открытым вопрос о диагностических титрах антител в сыворотках крови людей, находящихся в регионах эндемичного распространения возбудителя мелиоидоза или вне этих регионов. Определенные сложности возникают при разработке технологий изготовле-

ния препаратов и тест-систем, выявляющих только антитела к антигенам возбудителя мелиоидоза. Для большей части средств характерна группоспецифичность, проявляющаяся во взаимодействии с антителами не только мелиоидозных сывороток, но сывороток к антигенам близкородственных буркхольдерий.

В регионах эндемичного распространения *B. pseudomallei* при широкомасштабных сероэпидемиологических исследованиях чаще всего используют РНГА с диагностикумами эритроцитарными антигенными, приготовленными на основе различных антигенов данного микроорганизма [9, 21, 33]. Подавляющее большинство препаратов выявляют антитела не только к *B. pseudomallei*, но и к *B. mallei* и *B. thailandensis*. Этот недостаток можно устранить, используя модификацию традиционного метода, разработанную R.Tiyawisuttri et al. [41], позволяющую исключить перекрестную активность диагностикума в отношении *B. thailandensis*, но не *B. mallei*.

Известно, что среди населения эндемичных территорий имеется определенный процент серопозитивных лиц. Так, в Малайзии при исследовании 200 доноров у 53 из них были выявлены антитела к *B. pseudomallei* в титрах равных или превышавших 1:40 [28]. Наличие фоновых антител создает трудности при постановке правильного диагноза и является одним из основных ограничений при корректной расшифровке результатов РНГА.

С помощью РНГА выявляют в среднем 20–25 % серопозитивных лиц среди населения отдельных провинций и областей Юго-Восточной Азии и Австралии [14, 28, 43]. При этом диапазон значений титров антител составляет 1:40–1:160, что затрудняет корректное диагностирование заболевания, особенно в случаях субклинических форм течения мелиоидоза. При выявлении антител к *B. pseudomallei* в титрах > 1:160 обязательным является бактериологическое подтверждение мелиоидозной инфекции [43]. Это способствует установлению точного диагноза в конкретном случае и объективной оценке заболеваемости мелиоидозом в соответствующем регионе.

В гиперэндемичных областях ценность результатов РНГА снижается, так как уровень серопозитивности населения, включая детей и подростков (от 4 до 15 лет), достигает 70 % [13, 14]. По данным A.C.Cheng et al., относительные показатели числа серопозитивных лиц среди детско-подросткового контингента и ежегодного прироста этих показателей могут служить своеобразными маркерами эпидемиологической обстановки в той или иной провинции [14].

При клинических ситуациях результаты РНГА не всегда отражают тяжесть состояния больного. Установлено, что у ряда пациентов с острым сепсисом уровень антител недостаточно высок для выявления в РНГА, что чревато получением ложноотрицательных результатов [9]. В ряде случаев низкие титры антител в РНГА, регистрируемые у больных с септициемией, обусловлены их инфицированием *B. pseudomallei* с атипичным вариантом ЛПС [8, 30].

Диагностическая и прогностическая ценность метода в подобных ситуациях минимальна.

В неэндемичных регионах, где регистрируют лишь спорадические завозные случаи заболевания, ограничение, обусловленное наличием фоновых антител, не столь существенно; РНГА используют в качестве одного из методов диагностики мелиоидоза [48].

Следует отметить, что отсутствие стандартного коммерческого препарата для серодиагностики мелиоидоза не позволило сформировать единую точку зрения в отношении диагностического титра выявляемых антител для лиц, инфицированных *B. pseudomallei*, перенесших заболевание или временно находившихся в зонах распространения инфекции. Как следствие этого в конкретных клинических ситуациях возникают трудности при расшифровке результатов данного метода серодиагностики.

Для диагностирования острых форм заболевания ранее был предложен тест выявления специфических IgM [10], однако ввиду отсутствия результатов большого числа наблюдений, его значимость на сегодняшний день до конца не ясна.

В нашей стране накоплен определенный опыт в части изготовления диагностикума эритроцитарного антигенного мелиоидозного. Сотрудники ВолгоградНИПЧИ для конструирования экспериментальных образцов такого препарата использовали различные антигены, изолированные из *B. pseudomallei*: водно-солевые экстракты, ПС фракции, ЛПС, «цетавлоновый» антиген, 6+d антиген [1, 2]. Эти препараты были апробированы при экспериментальном моделировании инфекции, их эффективность в клинических ситуациях не определена. Практически все они обладали относительно невысоким уровнем специфичности, так как были приготовлены на основе антигенных комплексов, способных взаимодействовать с антителами сапных, туляреминых, бруцеллезных, сальмонеллезных сывороток. По мнению Н.Н.Пивня, наиболее значимыми для серодиагностики мелиоидоза являются антигены 5, 6, 8 и d.

В настоящее время на рынке отечественных коммерческих МИБП для серодиагностики мелиоидоза и сапа представлен единственный препарат «диагностикум эритроцитарный для выявления антител к возбудителям мелиоидоза и сапа антигенный жидкий» (ФСП 42-0095-0224-00), разработанный сотрудниками ФГУ «48 ЦНИИ МО» (Киров).

Несмотря на ряд недостатков и ограничений, РНГА востребована в регионах эндемичного распространения *B. pseudomallei* как простой в исполнении метод, обеспечивающий получение ответа существенно раньше, чем при бактериологическом исследовании, не требует больших трудо- и материальных затрат, а также сложной аппаратуры [9]. В небольших и слабо оснащенных лабораториях его по-прежнему используют как для эпидемиологических исследований, так и для диагностики мелиоидоза.

Совершенствование серодиагностики мелиоидоза связано, прежде всего, с разработкой различных

вариантов ТИФМ и широким внедрением этого метода в практику обнаружения специфических антител к антигенам патогенных буркхолдрий.

Изучением возможности использования ТИФМ для целей обнаружения антител к *B. pseudomallei* начали заниматься в 90-х годах прошлого столетия. Необходимо было решить вопросы выбора антигена для создания высокоэффективной твердой фазы, провести сравнительный анализ чувствительности и специфичности ТИФМ и РНГА, выработать тактику применения этих методов в условиях эндемичных и неэндемичных зон распространения возбудителя мелиоидоза.

Были апробированы разнообразные экспериментальные иммуноферментные тест-системы, приготовленные на основе идентифицированных и охарактеризованных мелиоидозных антигенов: 36 kDa экзотоксина [22], 19,5 [7] и 40 kDa белков [46], ЛПС [6, 32], гликолипида [32], однако ни один из них, использованный в ТИФМ в качестве лиганда, до сих пор не оценен в широкомасштабных испытаниях с точки зрения клинической значимости.

Установлено, что для разработки тест-системы иммуноферментной мелиоидозной, предназначенной для обнаружения антител, целесообразно использовать антигены 8 и 6, аффинно очищенные на моноклональных иммуносорбентах [5].

Позже появились сообщения об использовании аффинно очищенного поверхностного экзополисахарида с молекулярной массой ≥ 150 kDa в непрямом варианте ТИФМ при обнаружении антител к *B. pseudomallei* [34]. Диагностическая ценность иммуноферментной тест-системы, приготовленной на основе этого антигена, подтверждена в условиях эндемичного региона при работе с пробами клинического материала [20]. Авторы публикации пришли к заключению, что при использовании поверхностного антигена выявление специфических IgG антител имеет преимущества при диагностике острого мелиоидоза, так как применение этой же тест-системы для обнаружения IgM было не столь удачным. Эти результаты противоречат ранее опубликованным данным о том, что при диагностике острого мелиоидоза обнаружение IgM антител является более эффективным и значимым, чем обнаружение IgG [10, 23, 24 25].

Последующее накопление данных по вопросу тактики применения иммуноферментных тест-систем, предназначенных для выявления IgM и IgG к внеклеточным антигенам *B. pseudomallei*, позволило установить, что на ранней стадии развития инфекции чувствительность метода при обнаружении IgM составляет 80 %, специфичность – 70 %, а после появления IgG и нарастания их титров эти показатели достигают 99 и 96 % соответственно [15].

Для повышения эффективности поиска специфических антител в эндемичных регионах J.Vadivelu *et al.* рекомендовали применять два метода серодиагностики: IgM-ELISA и РНГА [42].

В этих регионах специалисты особенно пристально изучают нераспознанные случаи острой инфекции. В связи с этим обсуждению подлежат не только вопросы эпидемиологии и клиники мелиоидоза, но и эффективной серодиагностики. S.Sutthirattana *et al.* обобщили результаты исследования сывороток лихорадивших стационарных больных и выздоравливающих пациентов, полученные в зонах эндемичного распространения возбудителя инфекции в течение трех лет. Это позволило им выработать критерии оценки данных получаемых анализов: лихорадящие пациенты с титрами IgM $\geq 1:200$ или ≥ 4 -кратным подъемом IgG – это больные в острой фазе мелиоидоза; выявление у нелихорадящих больных титров IgG $\geq 1:400$ – свидетельство перенесенной ранее инфекции [40].

Помимо сообщений о разработке и применении на практике общепринятого варианта ТИФМ, опубликованы данные о дальнейшем совершенствовании тестов серодиагностики мелиоидоза, в частности, о применении иммунохроматографических тестов для быстрого выявления IgG и IgM [16, 18, 19, 33]. В 2000 г. был разработан коммерчески доступный иммунохроматографический тест для обнаружения мелиоидозных IgM и IgG антител в сыворотках больных с подтвержденным и неустановленным диагнозом. Чувствительность теста составляла для IgM и IgG 93 и 100 % соответственно, специфичность как в первом, так и во втором случае была равна 95 % [18]. В эндемичных регионах с недостаточными возможностями лабораторных баз эти тесты могут сыграть важную роль в постановке диагноза.

R.W.Sermiswan *et al.*, оценивая реальные возможности применения серологических реакций в условиях этих сложных регионов распространения данной инфекции, пришли к заключению об их практичности и доступности для большинства лабораторий [35]. Заслуживают внимания данные о применении универсальных иммуноферментных тест-систем, предназначенных для выявления специфических антител в сыворотках любой видовой принадлежности [27].

Несомненный интерес представляют данные о результативности применения методов серодиагностики в неэндемичных регионах. Так, W.D.Spletstoeser *et al.* опубликовали результаты апробации иммуноферментной тест-системы, приготовленной ими на основе экзополисахарида *B. pseudomallei*, вне зон распространения возбудителя мелиоидоза. Авторы исследовали сыворотки больных мелиоидозом и доноров (48 и 200 сывороток соответственно) и пришли к выводу о пригодности данной тест-системы для использования в неэндемичных областях. Они отметили также необходимость разработки дополнительных методов исследования для подтверждения полученных данных, например, иммуноблоттинга с рекомбинантными антигенами [38].

В то же время, сотрудники диагностической службы Великобритании, исследуя пробы материа-

ла, собранные после установления 49 завозных случаев мелиоидоза в Европу (за десятилетний период), использовали среди прочих тест-систему иммуноферментную для обнаружения сывороточных антител к консервативной области ЛПС *B. pseudomallei*. При тестировании 202 образцов сывороток от 179 пациентов были выявлены 8 сывороток с титрами $\geq 1:2000$. У этих же пациентов была выделена культура *B. pseudomallei* [26].

Многие специалисты, занимающиеся диагностикой мелиоидоза, отдавая должное простоте и информативности РНГА, основным методом серодиагностики этой опасной инфекции считают непрямой вариант ТИФМ. А перспективы дальнейшего совершенствования этого метода связывают с получением и использованием рекомбинантных белков, специфичных для *B. pseudomallei*, в качестве основы разрабатываемых тест-систем [44].

Проблема эффективной серодиагностики мелиоидоза не теряет актуальности и требует повышенного внимания специалистов к исследованию проб сыворотки крови у людей с неустановленным диагнозом на фоне симптомокомплекса, характерного для вышеназванной особо опасной инфекции.

Необходимость в повышении степени подготовленности материальной базы специализированных лабораторий к воспроизведению этапов серодиагностики мелиоидоза обусловлена не только опасностью возникновения «ассиметричной угрозы» вследствие биотеррористического акта. Аналитические данные о завозных случаях мелиоидоза в Европу [26], регистрируемом расширении границ зон эндемичного распространения возбудителя мелиоидоза, его глобального распространения [17, 19] фокусируют внимание специалистов на существующем риске завоза инфекции на территорию любой страны, на востребованности высокоэффективных препаратов для серодиагностики мелиоидоза вне эндемичных зон распространения патогена [39].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барков А.М., Ларионов Г.М., Дунаев Г.С., Лобанов А.Н. Использование РНГА для диагностики сапа и мелиоидоза. В кн: Особо опасные инфекционные заболевания: диагностика, профилактика и биологические свойства возбудителей. Волгоград; 1990. Вып. 4. С. 200–1.
2. Замарин А.Е., Пивень Н.Н., Мананакоев В.В., Манолов А.Д., Волков Е.А. Поиск оптимального набора антигенов возбудителей сапа и мелиоидоза, пригодных для получения высокоэффективных группоспецифических сывороток. В кн: Особо опасные инфекционные заболевания: диагностика, профилактика и биологические свойства возбудителей. Волгоград; 1990. Вып. 4. С. 230–3.
3. Онищенко Г.Г., редактор. Специфическая индикация патогенных биологических агентов. Практическое руководство. М.: МП Гигиена, 2006. 288 с.
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: Медицина, 2009. 472 с.
5. Пивень Н.Н., Смирнова В.И. Выделение, очистка и химический состав поверхностного полисахаридного антигенного комплекса возбудителя мелиоидоза. В кн: Особо опасные инфекционные заболевания: диагностика, профилактика и биологические свойства возбудителей. Волгоград; 1990. Вып. 4. С. 111–7.
6. Anandan S., Augustine A., Mathai E., Jesudason M.V. Evaluation of IgM ELISA using a sonicate and a lipopolysaccharide antigen for the serodiagnosis of melioidosis. Indian J. Med. Microbiol.

2010; 28(2):158–61.

7. Anuntagool N., Rugdech P., Sirisinha S. Identification of specific antigens of *Pseudomonas pseudomallei* and evaluation of their efficacies for diagnosis of melioidosis. J. Clin. Microbiol. 1993; 31:1232–6.
8. Anuntagool N., Intachote P., Wuthiekanun V., White N., Sirisinha S. Lipopolysaccharide from nonvirulent Ara⁺ *Burkholderia pseudomallei* isolates in immunologically indistinguishable from lipopolysaccharide from virulent Ara⁺ clinical isolates. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1998; 5:225–9.
9. Appasakij H., Silpapojakul K.R., Wansit R., Pornpatkul M. Diagnostic value of the indirect hemagglutination test for melioidosis in an endemic area. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1990; 42(3):248–53.
10. Ashdown L.R. Relationship and significance of specific immunoglobulin M antibody response in clinical and sub-clinical melioidosis. J. Clin. Microbiol. 1981; 14:361–4.
11. Ashdown L.R., Johnson R.W., Koehler J.M., Coony C.A. Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of clinical and subclinical melioidosis. J. Infect. Dis. 1989; 160:253–60.
12. Bossi P., Guihot A., Bricare F. Emerging or re-emerging infections that can be used for bioterrorism. Press Med. 2005; 34(2, Pt.2):149–55.
13. Chaowagul W. Update on clinical aspects of melioidosis. In: Abstracts of the 5th World Melioidosis Congress (21–23 Nov 2007), Thailand. 2007. P. 52.
14. Cheng A.C., Wuthiekanun V., Limmathurotsakul D., Chieracul W., Peacock S.J. Intensity of exposure and incidence of melioidosis in Thai children. In: Abstracts of the 5th World Melioidosis Congress (21–23 Nov 2007), Thailand. 2007. P. 115.
15. Chenthamarakshan V., Vadivelu J., Puthucherry S.D. Detection of immunoglobulins M and G to culture supernatant antigen of *Burkholderia pseudomallei* in melioidosis patients. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2001; 39(1):1–7.
16. Chuah S.C., Gilmore G., Norton R.E. Rapid serological diagnosis of melioidosis: an evaluation of a prototype immunochromatographic test. Pathology. 2005; 37(2):169–71.
17. Currie B.J., Dance D.A.B., Cheng A.C. The global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis: an update. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2008; 102(1):1–4.
18. Cuzzubbo A.J., Chenthamarakshan V., Valivelu J., Puthucherry S.D., Rowland D., Devine P.L. Evaluation of a new commercially available immunoglobulin M and immunoglobulin G immunochromatographic test for diagnosis of melioidosis infection. J. Clin. Microbiol. 2000; 38(4):1670–1.
19. Dance D.A. Melioidosis as an emerging global problem. Acta Trop. 2000; 74(2–3):115–9.
20. Dharakul T., Songsivilai S., Anuntagool N., Chaowagul W., Wongbunnate S., Intachote P. et al. Diagnostic value of an antibody enzyme-linked immunosorbent assay using affinity-purified antigen in an area endemic for melioidosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1997; 56(4):418–23.
21. Gilmore G., Barnes J., Ketheesan N., Norton R. Comparison of the use of *Burkholderia thailandensis*, *B. cepacia* and *B. pseudomallei* antigens in indirect haemagglutination assay for melioidosis. In: Abstracts of the 5th World Melioidosis Congress (21–23 Nov 2007), Thailand. 2007. P. 231.
22. Ismail G., Embi M.N., Omar O. Enzyme-immunoassay for the detection of antibody to *Pseudomonas pseudomallei* exotoxin in mice. FEMS Microbiol. Lett. 1987; 40(1):27–31.
23. Khupulsup K., Petchclai B. Application of indirect hemagglutination test and indirect fluorescent antibody test for IgM antibody for diagnosis of melioidosis in Thailand. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1986; 35:366–9.
24. Kunakorn M., Boonma P., Khupulsup K., Petchclai B. Enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin M specific antibody for diagnosis of melioidosis. J. Clin. Microbiol. 1990; 28:249–53.
25. Kunakorn M., Petchclai B., Khupulsup K., Naigowit P. Gold blot for detection of immunoglobulin M (IgM)- and IgG-specific antibodies for rapid serodiagnosis of melioidosis. J. Clin. Microbiol. 1991; 29:2065–7.
26. Malnick H., Englander H.M., Dance D.A., Smith M.D., Simpson A.J., Pitt T.L. A decade of experience of the United Kingdoms melioidosis diagnostic service. In: Abstracts of the 5th World Melioidosis Congress (21–23 Nov 2007), Thailand. 2007. P. 229.
27. Mekaprateep M., Tharavichitkul P., Srikittakarn L. Application of a non-species dependent ELISA for the detection of antibodies in sera of *Burkholderia pseudomallei*-immunized goats. J. Microbiol. Methods. 2010; 83(2):266–9.
28. Norazah A., Rohani M.Y., Chang P.T., Kamel A.G. Indirect hemagglutination antibodies against *Burkholderia pseudomallei* in normal blood donors and suspected cases of melioidosis in Malaysia. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 1996; 27(2):263–6.
29. O'Brien M., Freeman K., Lum G., Cheng A.C., Jacups S.P., Currie B.J. Further evaluation of a rapid diagnostic test for melioidosis in an area of endemicity. J. Clin. Microbiol. 2004; 42(5):2239–40.
30. Perry M.B., Maclean L.L., Schollaardt T., Bryan L.E., Ho

M. Structural characterization of lipopolysaccharide O antigens of *Burkholderia pseudomallei*. Infect. Immun. 1995; 63:3348–52.

31. Petkanjanapong V., Naigowit P., Kondo E., Kanai K. Use of endotoxin antigens in enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *P. pseudomallei* infections (melioidosis). Asian Pacific J. Allergy Immunol. 1992;10:145–50.

32. Phung L.V., Han Y., Oka S., Hotta H., Smith M.D., Theeparakun P. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using glycolipid antigen for the serodiagnosis of melioidosis. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1995; 12(3–4):259–64.

33. Puthucheary S.D. Human melioidosis. Singapore University Press, Singapore; 2002. 95 p. (in Laboratory investigations. P. 46–62).

34. Rugdech P., Anuntagool N., Sirisinha S. Monoclonal antibodies to *Pseudomonas pseudomallei* and their potential for diagnosis of melioidosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1995; 52(3):231–5.

35. Sermswan R.W., Wongratanacheewin S., Anuntagool N., Sirisinha S. Comparison of the polymerase chain reaction and serologic tests for diagnosis of septicemic melioidosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2000; 63(3–4):146–9.

36. Sirisinha S., Anuntagool N., Intachote P. Improved methods for diagnosis of melioidosis. J. Sci. Soc. Thailand. 1996; 22:131–42.

37. Sirisinha S., Anuntagool N., Dharakul T., Ekpo P., Wongratanacheewin S., Naigowit P. et al. Recent developments in laboratory diagnosis of melioidosis. Acta Trop. 2000; 74:235–45.

38. Splettstoesser W.D., Puthucheary S.D., Kopf S., Buckendahl A., Frangoulidis D. Serodiagnosis of melioidosis in a non-endemic area: validation and comparison of an extrapolymerase chain reaction (EPS)-based in-house ELISA and standardized lateral flow assays. In: Abstracts of the 5th World Melioidosis Congress (21–23 Nov 2007), Thailand. 2007. P. 243.

39. Splettstoesser W.D., Frangoulidis D., Puthucheary S.D. Validation and comparison of an extrapolymerase chain reaction (EPS)-based in-house ELISA and PanBio melioidosis in a non-endemic area. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2008; 102(Sup. 1):45–6.

40. Sutthirattana S., Petkanjanapong W., Baggett H., Maloney S.A., Fisk T.L., Chaitha I. et al. Epidemiologic and clinical characteristics of acute melioidosis and prevalence of *Burkholderia pseudomallei* antibodies among patients to community hospitals in northern and northeastern Thailand. In: Abstracts of the 5th World Melioidosis Congress (21–23 Nov 2007), Thailand. 2007. P. 117.

41. Tiya-wisut-sri R., Peacock S.J., Langa S., Limmathurotsakul D., Cheng A.C., Chierakul W. et al. Antibodies from patients with melioidosis recognize *Burkholderia mallei* but not *Burkholderia thailandensis* antigens in the indirect hemagglutination assay J. Clin. Microbiol. 2005; 43(9):4872–4.

42. Vadivelu J., Puthucheary S.D., Gendeh G.S., Parasakhi N. Serodiagnosis of melioidosis in Malaysia. Singap. Med. J. 1995; 36(3):299–302.

43. Withiekanun V., Langa S., Swaddiwudhipong W., Jedsadapanpong W., Kaengnet Y., Chierakul W. et al. Melioidosis in Myanmar: forgotten but not gone? In: Abstracts of the 5th World Melioidosis Congress (21–23 Nov 2007), Thailand. 2007. P. 119.

44. Wongprompitak P., Thepthai C., Songsivilai S., Dharakul T. *Burkholderia pseudomallei*-specific recombinant protein and its potential in the diagnosis of melioidosis. Asian Pac. J. Allergy Immunol. 2001; 19(1):37–41.

45. Wongratanacheewin S., Sermswan R.W., Anuntagool N., Sirisinha S. Retrospective study on the diagnostic value of IgG ELISA, dot immunoassay and indirect hemagglutination in septicemic melioidosis. Asian Pac. J. Allergy Immunol. 2001; 19(2):129–33.

46. Wongratanacheewin S., Amornpunt S., Sermswan R.W., Tattawasart U., Wongwajana S. Use of culture-filtrated antigen in an ELISA and a dot immunoassay for diagnosis of melioidosis. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health. 1995; 26(2):329–34.

47. Wuthiekanun V., Amornchai P., Chierakul W., Cheng A.C., White N.J., Peacock S.J., Day N.P. Evaluation of immunoglobulin M (IgM) and IgG rapid cassette test kits for diagnosis of melioidosis in an area of endemicity. J. Clin. Microbiol. 2004; 42(8):3435–7.

48. Yap E.H., Chan Y.C., Ti T.Y. et al. Serodiagnosis of melioidosis in Singapore by the indirect haemagglutination test. Singap. Med. J. 1991; 32(4):211–3.

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

1. Barkov A.M., Larionov G.M., Dunaev G.S., Lobanov A.N. [Usage of passive hemagglutination test for the diagnostics of glanders and melioidosis]. In: [Particularly Dangerous Infectious Diseases: Diagnostics, Prophylaxis, and Biological Properties of the Agents]. 1990; 4:200–1.

2. Zamarin A.E., Piven' N.N., Mananakov V.V., Manolov A.D., Volkov E.A. [Search for an optimal set of antigens of glanders and melioidosis agents, suitable for the obtainment of high efficiency group-specific sera]. In: [Particularly Dangerous Infectious Diseases: Diagnostics, Prophylaxis, and Biological Properties of the Agents]. 1990; 4:230–3.

3. Onishchenko G.G., editor [Specific Indication of Pathogenic Biological Agents. Practical Guidelines]. M.: MP Gigiena, 2006. 288 p.

4. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Guidelines]. M.: Meditsina, 2009. 472 p.

5. Piven' N.N., Smirnova V.I. [Isolation, purification and chemical composition of the surface polysaccharide antigen complex of melioidosis agent]. In: [Particularly Dangerous Infectious Diseases: Diagnostics, Prophylaxis, and Biological Properties of the Agents]. 1990; 4:111–7.

Authors:

Khrapova N.P., Alekseev V.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute. Golubinskaya St., 7, Volgograd, 400131, Russia. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Об авторах:

Храпова Н.П., Алексеев В.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 12.01.11.

А.Н.Куличенко¹, Ю.М.Евченко¹, Г.А.Мозлов², М.П.Григорьев¹, Л.В.Ляпустина¹, Н.В.Чурикова¹

ЭПИЗООТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЦЕНТРАЛЬНО-КАВКАЗСКОГО ВЫСОКОГОРНОГО ПРИРОДНОГО ОЧАГА ЧУМЫ

¹ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь;

²ФКУЗ «Кабардино-Балкарская противочумная станция», Нальчик

Анализ многолетних данных позволил на фоне общей тенденции к снижению выделить три периода эпизоотической активности Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы. Третий период (2001–2010 гг.) характеризуется мощным воздействием факторов природного и антропогенного порядка на паразитарную систему очага. Природными факторами, обусловившими депрессивное состояние природного очага чумы, явились неблагоприятные для жизнедеятельности горных сусликов погодные условия. Антропогенным фактором следует признать снижение нагрузки на пастбища от выпаса скота, что привело к уменьшению площадей, пригодных для жизнедеятельности популяций горных сусликов. С учетом действия указанного фактора, краткосрочный и среднесрочный прогнозы эпизоотической активности Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы предполагают редкие неинтенсивные эпизоотии.

Ключевые слова: природный очаг чумы, эпизоотическая активность, краткосрочный и среднесрочный прогнозы.

A.N.Kulichenko, Yu.M.Evchenko, G.A.Mozlov, M.P.Grigor'ev, L.V.Lyapustina, N.V.Churikova

Epizootic Activity of the Central Caucasian High-Mountain Natural Plague Focus

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol; Kabardino-Balkarian Plague Control Station, Nalchik

Analysis of the long-term data made it possible to identify three periods of epizootic activity of the Central Caucasian high-mountain natural plague focus against the background of the overall downward trend. In the third period (2000–2010) the focus was shown to be under the intense negative influence of natural and anthropogenic factors that stipulated its depression. The natural factors were weather conditions unfavorable for life-sustaining activity of mountain ground-squirrels, the main plague carriers in this focus. Anthropogenic pressure over the focus manifested as follows. The quantity of cattle decreased, that resulted in decrease of territories of the mountain pasturelands, the natural habitats of mountain ground-squirrels. As areas suitable for life-sustaining activity of the mountain ground-squirrel populations reduced, the number of their settlements declined. With account taken for the effect of the anthropogenic influence stated above, short-term and medium-term prognoses of epizootic activity of Central Caucasian high-mountain natural plague focus indicate of rare non-intensive epizooties.

Key words: natural plague foci, epizootic activity, short-term and medium-term prognoses.

Общеизвестно, что на эпизоотическую активность природных очагов различных инфекций воздействуют факторы природного и антропогенного характера. Глобальное потепление, соответствующие изменения климата и ландшафтов влияют на состояние природных очагов чумы. В частности, прогнозируется продолжение межэпизоотического периода в степных и полупустынных очагах сусликового типа, а в отношении высокогорных природных очагов чумы долгосрочный прогноз предполагает сохранение эпизоотической активности [3]. Краткосрочные прогнозы, публикуемые ежегодно, ориентируют на локальные эпизоотии низкой интенсивности в горных очагах сусликового типа [4, 5, 6, 7].

В условиях Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы воздействие факторов природного и антропогенного характера определило устойчивую тенденцию к снижению эпизоотической активности. Данный очаг с момента открытия в 1971 г. до начала XXI века считался наиболее актив-

ным и стабильным в эпизоотических проявлениях из всех природных очагов Российской Федерации [1, 2]. Однако за последние два десятилетия его эпизоотическая активность значительно снизилась. Тем не менее, расположение очага в относительно густонаселенном регионе, наличие активно развивающейся рекреационной зоны не снижают эпидемиологическую значимость данной территории.

Целью исследования явилась характеристика современного состояния Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы и определение некоторых факторов, оказывающих первостепенное влияние на его эпизоотическую активность.

Материалы и методы

Для анализа эпизоотической активности природного очага в разные периоды его функционирования создана база данных в системе Excel Microsoft Office 2000. Она включила сведения о выделенных штам-

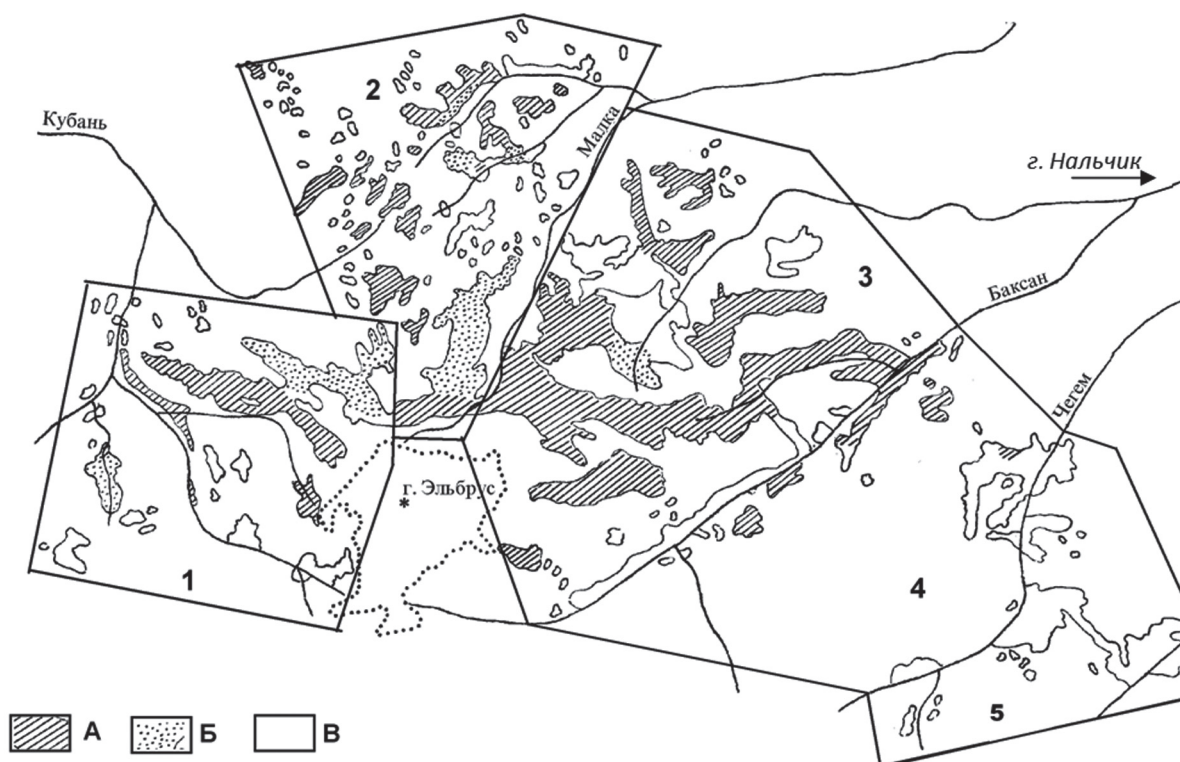


Рис. 1. Ландшафтно-эпизоотологические районы и поселения горных сусликов в Центрально-Кавказском высокогорном природном очаге чумы:

1 – Верхне-Кубанский; 2 – Кубано-Малкинский; 3 – Малко-Баксанский; 4 – Баксано-Чегемский; 5 – Чегемо-Черекский.
А – поселения горного суслика с частыми эпизоотиями чумы; Б – с редкими эпизоотиями чумы; В – эпизоотий не выявлено

мах чумного микроба за весь период наблюдения за очагом, с 1971 по 2010 год, взятые из официальных форм отчетности Кабардино-Балкарской противочумной станции.

Для выяснения вопроса о площадях, числе и конфигурациях поселений горного суслика силами специально сформированных зоологических групп Кабардино-Балкарской противочумной станции и Ставропольского научно-исследовательского противочумного института в 2010 г. были произведены работы по картографированию поселений горного суслика в Кубано-Малкинском ландшафтно-эпизоотологическом районе Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы.

Результаты и обсуждение

За время наблюдения за Центрально-Кавказским природным очагом чумы (1971–2010 гг.) было выделено 5552 штамма чумного микроба. Из них в западной части очага, расположенной на территории Карачаево-Черкесской Республики (КЧР), изолированы 3189 (57,4 %) культур возбудителя чумы. В восточной части, которая находится в Кабардино-Балкарской Республике (КБР), – 2363 (42,6 %). Естественной границей частей природного очага является р. Малка (рис. 1).

Эпизоотическая активность природного очага, выражаемая количеством выделенных штаммов, в разные периоды наблюдения имеет определенные особенности. На фоне общей тенденции снижения

эпизоотической активности (рис. 2) представляется возможным выделить три периода: первый – 1971–1981, второй – 1982–2000 гг., третий – 2001–2010 гг.

Первый период характеризуется отсутствием факторов природного и антропогенного характера, которые могли бы существенно повлиять на паразитарную систему природного очага, изменив при этом особенности его функционирования.

Второй период обнаружил тенденцию к снижению эпизоотической активности природного очага, в связи с проведением крупномасштабных мероприятий по регулированию численности основных носителей и переносчиков чумы в рамках Программы

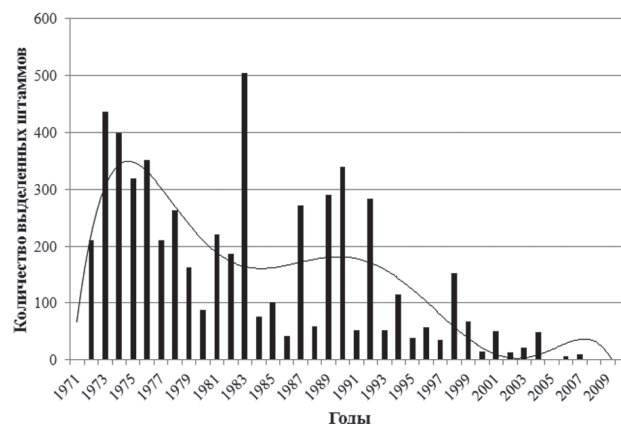


Рис. 2. Количество штаммов чумного микроба, выделенных в Центрально-Кавказском высокогорном природном очаге чумы в 1971–2009 гг.

позападного оздоровления Центрально-Кавказского природного очага чумы в 1982–1990 гг.

Третий период ознаменовался мощным воздействием факторов природного и антропогенного характера. Снижение финансирования эпизоотологического обследования в этот период существенно не повлияло на число выделенных штаммов, т.к. большая часть штаммов (79,2 %) выделена на участках, расположенных в 7 (21,2 %) из 33 первичных секторов, охватывающих территорию Центрально-Кавказского высокогорного природного очага. Именно эти секторы обследовали с прежней интенсивностью.

В первый период выделено 2664 штамма чумного микроба или 48 % от числа штаммов, изолированных в очаге за весь период наблюдения, во второй – 1869 (33,7 %), в третий – 1009 (18,3 %). Ежегодно в первый период выделяли в среднем $266,2 \pm 34,61$, во второй период – $144,16 \pm 30,64$ и в третий – $14,9 \pm 6,12$ штаммов чумного микроба.

Различия между первым и вторым периодами, а также вторым и третьим статистически значимы: $t = 2,64$; $P \geq 0,2$ и $t = 4,137$; $P \leq 0,001$ соответственно.

Из природных факторов первостепенное значение имеет глобальное изменение климата. В начале XXI века на Центральном Кавказе произошли не характерные для данного региона погодные катаклизмы, повлекшие за собой реакцию на сложившееся ранее биотическое равновесие. Так, неустойчивая погода весны, аномально жаркое засушливое лето 2000 г. отрицательно сказались на размножении сусликов и их наживке перед залеганием, в чем основную роль сыграла скудная кормовая база. При этом особенно пострадали сеголетки, значительная часть которых залегла в спячку недостаточно наживованными. В итоге снизились и средняя численность носителей по очагу с 24 до 18 экз./га, и эпизоотическая активность очага. В 2000 г. выделено 14 штаммов чумного микроба на пяти эпизоотических участках вместо 60 штаммов с 13 участков в 1999 г.

В 2002 г., напротив, наряду с очень холодным периодом весны, наступило небывало дождливое лето, вызвавшее наводнение и затопление многих поселений сусликов, что крайне осложнило расселение сеголеток. В результате на большей части субальпийских участков очага была нарушена сложившаяся структура поселений зверьков. Эпизоотическая ситуация 2002 г. была сравнима с 2000 г.: с пяти зараженных участков были изолированы всего 13 штаммов чумного микроба, а средняя численность носителя по очагу снизилась до 16 экз./га.

Следующим экстремальным годом стал 2005, когда на популяции суслика вновь воздействовала аномальная летняя жара, повлекшая раннее выгорание растительности, особенно в горной степи, что в очередной раз вызвало бескормицу перед залеганием зверьков. И, наконец, в 2008 г. – холодная и продолжительная зима, с промерзанием почвы на глубину одного метра и более. Эта ситуация повлекла за собой гибель части зимующих зверьков, особенно мо-

лодых сусликов, глубина залегания гнезд которых зачастую находится выше линии промерзания почвы.

Антропогенный фактор состоит в снижении нагрузки на пастбища в пределах Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы. На примере горных пастбищ, расположенных на территории Кабардино-Балкарской Республики, показано, что с 1990 по 2006 год произошло сокращение количества голов выпасаемого скота в пять раз. При этом общая площадь пастбищ уменьшилась в 2,5 раза, и нагрузка на горные пастбища сократилась более чем в 2,5 раза. Данное обстоятельство инициировало восстановление многолетней растительности. Эфемерные травы заменились злаково-разнотравной растительностью (тимфеевка степная, ежа сборная, кострец пестрый, ячмень фиолетовый и др.), обильно произрастающими сорняками, а в отдельных местах подлеском (сосна, береза).

Изменения в растительном покрове резко сказались на пространственном распределении, численности и популяционной организации основного носителя. Известно, что горный суслик в связи с особенностями биокommunikации (в первую очередь, необходимость зрительных контактов) может обитать только в биотопах с низким и разреженным травостоем. Преобладание высокотравной растительности вынуждает зверьков покидать такие участки, что в конечном итоге привело к исчезновению большого числа поселений носителя.

При картографировании поселений горного суслика в Кубано-Малкинском ландшафтно-эпизоотологическом районе установлено снижение площадей, заселенных сусликами, с 15000 до 4000 га. Фактически ландшафтно-эпизоотологический район представлен несколькими небольшими поселениями на плато Бичесын и по долинам рек Хасаут и Кичи-Балык.

Таким образом, анализ функционирования Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы в многолетнем аспекте показал наличие трех периодов эпизоотической активности, из которых третий (2001–2010 гг.) характеризуется мощным воздействием на паразитарную систему очага факторов природного и антропогенного порядка, в результате чего произошло и продолжается снижение эпизоотической активности.

Длительность депрессивного состояния природного очага чумы в значительной мере определяется сроками восстановления площадей, пригодных для жизнедеятельности популяций горных сусликов. При составлении прогнозов, разных сроков действия, эпизоотической активности Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы целесообразно, по нашему мнению, учитывать важную роль антропогенного фактора. Сегодня нагрузка на пастбища от выпаса сельскохозяйственных животных остается на низком уровне и не имеет предпосылок к увеличению в ближайшее время. Продолжается зарастание мест, в прошлом пригодных для заселения сусликами, многолетней растительностью. С учетом изло-

женного, краткосрочный и среднесрочный прогнозы эпизоотической активности Центрально-Кавказского высокогорного природного очага чумы предполагают редкие неинтенсивные эпизоотии, возможно регистрирующиеся только по фактам обнаружения горных сусликов с антителами в крови к фракции I чумного микроба.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акиев А.К., Варшавский С.Н., Голубев П.Д. Основные задачи по изучению факторов природной очаговости чумы на Центральном Кавказе. Пробл. особо опасных инф. 1974; 2(36):5–8.
2. Дятлов А.И., Антоненко А.Д., Грижебовский Г.М., Лабунец Н.Ф. Природная очаговость чумы на Кавказе. Ставрополь; 2001. 345 с.
3. Попов Н.В., Удовиков А.И., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Яковлев К.А., Гаджирезаева А.В., Безсмертный В.Е., Кутырев В.В. Современные аспекты прогнозирования эпизоотической активности природных очагов чумы России и стран СНГ. Пробл. особо опасных инф. 2006; 1(91):24–4.
4. Попов Н.В., Безсмертный В.Е., Новиков Н.Л., Удовиков А.И., Кузнецов А.А., Попов В.П., Шилова Л.Д., Кутырев В.В. Прогноз эпизоотической ситуации природных очагов Российской Федерации на 2008 г. Пробл. особо опасных инф. 2008; 1(95):13–5.
5. Попов Н.В., Безсмертный В.Е., Топорков В.П., Иванова С.М., Попов В.П., Удовиков А.И., Шилова Л.Д., Кутырев В.В. Прогноз эпизоотической активности природных очагов чумы Российской Федерации на 2009 г. Пробл. особо опасных инф. 2009; 1(99):11–7.
6. Попов Н.В., Безсмертный В.Е., Топорков В.П., Иванова С.М., Удовиков А.И., Кузнецов А.А., Князева Т.В., Шилова Л.Д., Кутырев В.В. Прогноз эпизоотической активности природных очагов чумы Российской Федерации на 2010 г. Пробл. особо опасных инф. 2010; 1(103):24–9.
7. Попов Н.В., Безсмертный В.Е., Матросов А.Н., Немченко Л.С., Вержуцкий Д.Б., Малецкая О.В. и др. Эпизоотическая активность природных очагов Российской Федерации в 2010 г. и прогноз на 2011 г. Пробл. особо опасных инф. 2011; 1(107):31–7.

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

1. Akiyev A.K., Varshavsky S.N., Golubev P.D. [Primary objectives in studies of factors that predetermine plague natural focality in the territory of Central Caucasus]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 1974; 2(36):5–8.
2. Dyatlov A.I., Antonenko A.D., Grizhebovsky G.M., Labunets N.F. [Plague Natural Focality in Caucasus Region]. Stavropol; 2001. 345 p.
3. Popov N.V., Udobikov A.I., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Yakovlev K.A., Gadzhirezaeva A.V., Bezsmertny V.E., Kutyrev V.V. [Contemporary aspects of predicting epizootic activity of plague natural foci in Russia and CIS Countries]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2006; 1(91):24–4.
4. Popov N.V., Bezsmertny V.E., Novikov N.L., Udobikov A.I., Kuznetsov A.A., Popov V.P., Shilova L.D., Kutyrev V.V. [Prognostication of epizootic activity of plague natural foci in the Russian Federation for 2008]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2008; 1(95):13–5.
5. Popov N.V., Bezsmertny V.E., Toporkov V.P., Ivanova S.M., Popov V.P., Udobikov A.I., Shilova L.D., Kutyrev V.V. [Prognostication of epizootic activity of plague natural foci in the Russian Federation for 2009]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2009; 1(99):11–7.
6. Popov N.V., Bezsmertny V.E., Toporkov V.P., Ivanova S.M., Udobikov A.I., Kuznetsov A.A., Knyazeva T.V., Shilova L.D., Kutyrev V.V. [Prognosis of epizootic activity of natural plague foci in the Russian Federation for the year of 2010]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; 1(103):24–9.
7. Popov N.V., Bezsmertny V.E., Matrosov A.N., Nemchenko L.S., Verzhutsky D.B., Maletskaya O.V. et al. [Epizootic activity of plague natural foci in the Russian Federation in 2010 and prognosis for 2011]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2011; 1(107):31–7.

Authors:

Kulichenko A.N., Evchenko Yu.M., Grigor'ev M.P., Lyapustina L.V., Churikova N.V. Stavropol Research Anti-Plague Institute. Sovetskaya St., 13–15, Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru
Mozloev G.A. Kabardino-Balkarian Plague Control Station. Nalchik, Kabardino-Balkar Republic, Russia. E-mail: kbpcs@kbsunet.ru

Об авторов:

Куличенко А.Н., Евченко Ю.М., Григорьев М.П., Ляпустина Л.В., Чурикова Н.В. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru
Мозлоев Г.А. Кабардино-Балкарская противочумная станция. Россия, Кабардино-Балкарская Республика, Нальчик. E-mail: kbpcs@kbsunet.ru

Поступила 21.06.11.

О.В.Мельникова, Е.А.Вершинин, В.М.Корзун, Е.И.Андаев, Е.А.Сидорова

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ОЧАГА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА В ОКРЕСТНОСТЯХ ИРКУТСКА

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»,
Иркутск

В число основных факторов, определяющих напряженность очага клещевого энцефалита (КЭ), входят численность основного переносчика (в данном очаге – это таежный клещ *Ixodes persulcatus*) и его вирусофорность. Приведены результаты пятилетнего мониторинга очага клещевого энцефалита, расположенного в пригородах Иркутска. Обнаружены колебания численности и зараженности основного переносчика вируса КЭ как по участкам, так и по годам. Закономерной связи этих показателей с заболеваемостью людей КЭ не отмечено. Однако ежегодно регистрируемая заболеваемость населения свидетельствует об активности и напряженности очага. Предложен ряд мер для профилактики данного заболевания. Необходимы дальнейшие наблюдения по всем параметрам, определяющим активность данных очагов.

Ключевые слова: *Ixodes persulcatus*, численность, вирусофорность, заболеваемость.

O.V.Mel'nikova, E.A.Vershinin, V.M.Korzun, E.I.Andaev, E.A.Sidorova

The Current State of Natural Foci of Tick-Borne Encephalitis near Irkutsk City

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

Among main factors that influence intensity of tick-borne encephalitis foci one can distinguish the numbers of core vector (here, taiga tick *Ixodes persulcatus*) and the percentage of infected ticks. This paper shows the results of five-year monitoring of the tick-borne encephalitis focus, which is situated near Irkutsk city. Detected are the variations in numbers and infestation of the core vector of tick-borne encephalitis, both spatial and temporal. Cause-effect connection between these factors and human TBE morbidity is not found. However, morbidity rates of the Irkutsk population, observed on the annual basis, bear evidence of high activity and intensity of the foci. In this regard, a number of preventive measures is put forward, but further observations concerning all the parameters that influence foci activity are required.

Key words: *Ixodes persulcatus*, numbers, abundance of infected ticks, morbidity.

Город Иркутск расположен на территории, эндемичной по клещевому энцефалиту (КЭ). В число основных факторов, определяющих напряженность очага КЭ, входят численность основного переносчика (в данном очаге – это таежный клещ *Ixodes persulcatus*) и его вирусофорность. В работе приведены результаты пятилетнего мониторинга очага клещевого энцефалита, захватывающего рекреационную зону, прилегающую к Байкальскому тракту.

Материалы и методы

Таежных клещей собирали с растительности на стандартный флаг вдоль обочин лесных дорог, троп и просек в течение пяти лет (2005–2009 гг.) подекадно, с конца апреля по середину июля на трех учетных участках Байкальского тракта, расположенных на 23, 43 и 47 км от Иркутска. Работы проводились в подтаежных (подгорных) лиственнично-сосновых травяно-брусничных злаково-разнотравных лесах [1].

Участки отличаются друг от друга по удаленности от областного центра, антропогенному воздействию (в т.ч. посещаемости их населением) и составу растительных сообществ. Ближний к городу участок, подвергшийся в большей степени антропогенному прессу, находится на ранних этапах сукцессионного процесса (преобладание средне- и высоковозраст-

ных березняков). На 43 и 47 км шире представлены коренные таежные биотопы. На каждом из участков имеется зона организованного отдыха населения (на 23 и 43 км – санатории, на 47 км – Музей деревянного зодчества под открытым небом), что определяет актуальность мониторинга очага КЭ на данной конкретной территории.

Всего собрано 7935 экз. имаго *I. persulcatus*; затрачено 157,2 флаго-часа.¹

На вирусофорность клещей исследовали индивидуально иммуноферментным методом (ИФМ), используя тест-систему ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ (Томск-Москва) в соответствии с прилагаемой инструкцией. Оптическую плотность проб измеряли с помощью прибора «Мультикан® Ассент» фирмы Thermo Labsystems. Всего за период 2006–2009 гг. исследовано 5355 голодных имаго *I. persulcatus*.

При статистической обработке результатов сравнивали выборочную разность долей по методу Фи (φ) [7].

Сведения по заболеваемости получены в Управлении Роспотребнадзора по Иркутской области.

¹В сборе клещей в разные годы, кроме авторов работы, принимали участие сотрудники лаборатории природно-очаговых инфекций и зоолого-паразитологического отдела Иркутского противочумного института Сибири и Дальнего Востока: Бахум С.В., Борисова Т.И., Вержуцкий Д.Б., Вершинин П.Е., Зимарева Г.В., Козлова Ю.А., Никитин А.Я., Петрова Е.Т., Пивень Н.Н., Трушина Ю.Н.

Результаты и обсуждение

Поскольку численность переносчика считается одной из основополагающих характеристик природного очага инфекции, мы проанализировали этот показатель для таежного клеща на стационарных участках обследования.

Численность *I. persulcatus* на исследуемых участках различалась, на 23 км была ниже, чем на 43 и 47 в среднем в 2 и более раза в течение всех лет наблюдений. Средняя численность клещей за весь период наблюдений на 43 и 47 км расходилась незначительно (63,8 и 57,9 экз. на флаго-час соответственно), но по годам имела отличия. На 43 км она колебалась достаточно сильно: минимальную среднесезонную численность переносчика на этом участке отмечали в 2006 г. (44,3 экз. на флаго-час), максимальную – в 2005 (131,5 экз. на флаго-час). На 47 км диапазон колебаний был не так велик: минимум наблюдался в 2008 г. (48,4 экз. на флаго-час), максимум – в 2005 (94,3 экз. на флаго-час).

В течение сезона максимальное количество клещей раньше появлялось на ближнем к городу участке и имело там два пика (вторая декада мая и третья декада июня), затем – на более отдаленных (третья декада мая на 47 км, 1 декада июня на 43 км) (рис. 1). Пик заболеваемости КЭ по Иркутску приходится на 2 декаду июня, отставая на декаду от периода наибольшей активности клещей.

Средняя вирусоформность основного переносчика КЭ на Байкальском тракте за годы наблюдений (2006–2009 гг.) составила $(1,26 \pm 0,15) \%$. Зараженность клещей варьировала как по годам, так и по участкам сбора. Минимальной она была в 2008 г. на 47 км – $(0,20 \pm 0,20) \%$, максимальной – в 2007 г. на 43 км – $(3,68 \pm 0,96) \%$. При этом на 47 км минимум вирусоформности переносчика совпал с минимумом его численности, но на 43 км в 2007 г. численность *I. persulcatus* была средней. Количество положительных находок на 43 км Байкальского трак-

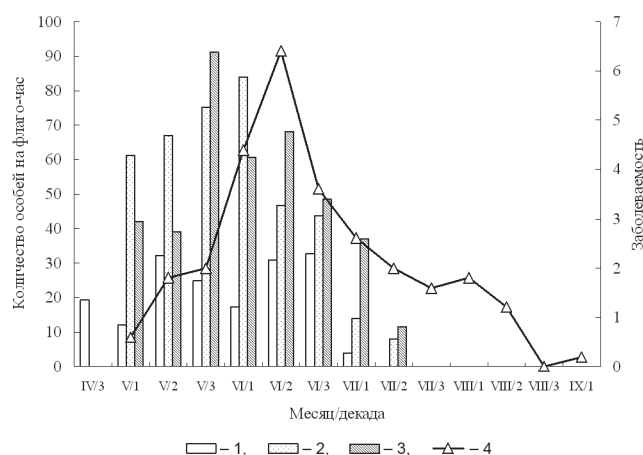


Рис. 1. Сезонные изменения численности таежного клеща на разных участках Байкальского тракта и среднего числа заболевших КЭ по Иркутску (2005–2009 гг.):

1, 2, 3 – численность на 23, 43 и 47 км соответственно;
4 – заболеваемость на 100 тыс. населения

та статистически достоверно ($P < 0,05$) превышало таковое с участка 23 км.

Давно замечено, что зараженность клещей сильно изменяется по годам. Даже в местах, где зараженность клещей достигает высоких показателей, в некоторые годы вирус обнаружить не удастся. По мнению Р.Л.Наумова и В.П.Гутовой [6], это свидетельствует о глубоких депрессиях численности, свойственных популяциям вируса клещевого энцефалита (ВКЭ).

За годы исследований процент клещей с антигеном ВКЭ (АГ ВКЭ) в целом на трех участках колебался от $0,59 \pm 0,21$ (2008 г.) до $2,29 \pm 0,54$ (2007 г.). При сопоставлении средней вирусоформности по участкам в разные годы оказалось, что на 23 км статистически значимых отличий по годам не было; на 43 км положительных на ВКЭ клещей в 2007 г. было достоверно больше, чем в 2006 ($P < 0,05$), 2008 ($P < 0,01$) и 2009 гг. ($P < 0,05$); на 47 км в 2006 и 2007 гг. зараженных клещей было значительно больше по сравнению с 2008 и 2009 гг. ($P < 0,001$ во всех случаях).

В течение сезона доля клещей с АГ вируса была наибольшей в конце апреля ($2,00 \pm 1,40$), а также во вторую и третью декаду мая ($2,89 \pm 0,63$ и $1,73 \pm 0,30$ соответственно). В клещах, собранных в конце июня и июле, АГ ВКЭ обнаружить не удалось. Доля клещей с высоким содержанием АГ ВКЭ ($P/N > 3,0$) варьировала от нуля (2006 г.) до 87,5 % (2008 г.). В отловах клещи по полу распределились практически поровну (50,4 % самцов и 49,6 % самок), но среди «положительных» на АГ ВКЭ преобладание самок было очевидным – $(67,03 \pm 6,0) \%$ против $(32,97 \pm 8,58) \%$.

О связи численности клещей с их зараженностью сведения в литературе весьма противоречивы. Ю.В.Ковалевский и соавт. [3] полагают, что колебания зараженности клещей ВКЭ слабо связаны с изменением их численности. А.А.Сморозинцев и А.В.Дубов считают, что увеличение численности прокормителей и переносчиков способствует усилению циркуляции вируса в очаге и увеличению инфицированности клещей [7]. Вирусоформность имаго *I. persulcatus* на протяжении 6 лет в ряде районов Хабаровского края и Сахалинской области исследовала Р.Н.Воробьева с соавт. [2]. Она показала, что при невысокой численности клещей наблюдалась небольшая вирусоформность. Повышение зараженности клещей совпадало с увеличением численности их имагинальной фазы в том же году. По нашим наблюдениям 20-летней давности, направленность изменения численности и вирусоформности клещей не всегда совпадала.

На диаграмме (рис. 2) хорошо видно, что численность клещей в 2005 г. на 43 и 47 км была очень высокой, затем резко упала и в 2006–2009 гг. сохранялась примерно на одном уровне, не превышая 70 экз./флаго-час даже на самых обильных участках. При этом на каждом из исследуемых участков численность переносчика менялась по-своему: подъем к 2007 г. и плавное уменьшение к 2009 г. на 23 км; резкое снижение от 2005 к 2006 году и очень плавный подъем к 2009 г. на 43 км; понижение с 2005 по 2008

год с небольшим увеличением в 2009 г. на 47 км. При сравнении численности с вирусофорностью (рис. 2) вычленили какие-либо связи не удалось. Ни разу не превысив 1 % в год, последний показатель на 23 км был самым низким в 2007 г. при самой высокой численности на этом участке. В то же время, при весьма средней численности на 43 и 47 км, вирусофорность в том же 2007 г. на этих участках была самой высокой за годы исследований.

Считается, что повышение численности отдельных компонентов паразитарной системы КЭ влияет на уровень заболеваемости. В частности, установлена прямая средней степени корреляция между показателями заболеваемости КЭ и среднесезонной численностью клещей *I. persulcatus* на западе Красноярского края [4]. Динамика заболеваемости населения КЭ в Карелии в большей степени согласуется с динамикой численности имаго таежного клеща, чем с его вирусофорностью. Резкий рост заболеваемости КЭ в Европе в конце XX века привлек к себе внимание исследователей, которые рассматривают самые разнообразные причинно-следственные связи. Например, анализ с помощью геоинформационных систем (ГИС) показал, что размах колебаний численности иксодид больше зависит от климата и растительного покрова, чем от факторов, связанных с хозяевами [13]. В то же время влияние климатических изменений на заболеваемость трансмиссивными инфекциями в настоящее время очень дискуссионно [5, 11, 14]. Некоторые исследователи большую роль в распространении природно-очаговых инфекций отводят человеческому фактору, в частности – путешествиям с домашними животными, смене места жительства, социальной активности и занятиям на досуге [10]. Рост заболеваемости КЭ в Италии имеет

тесную связь с интенсивным лесонасаждением, изменением состава растительных сообществ, благоприятствующих росту численности мелких млекопитающих и косуль [14]. В Шотландии численность клещей была положительно связана с численностью оленей и отрицательно – с высотой над уровнем моря [11]. В Швеции выявлена положительная корреляция между количеством случаев КЭ у людей и численностью лисы при отрицательной корреляции с численностью зайцев и куропаток [12].

За представленный промежуток времени заболеваемость по Иркутску колебалась в пределах от 4,3 до 5,6 на 100 тыс. населения. На территории, через которую проходит Байкальский тракт, за 2005–2009 гг. КЭ заразилось 33 человека, из них лихорадочной формой – 20 (60,6 %), менингеальной – 10 (30,3 %) и очаговой – 3 (9,1 %), что в процентном соотношении примерно соответствовало общей картине заболеваемости по Иркутску.

При сопоставлении численности основного переносчика по Байкальскому тракту и заболеваемости по Иркутску (рис. 2) прослеживается полное совпадение динамики этих двух параметров на ближайшем к городу участке (23 км Байкальского тракта): за высокой численностью и самой высокой за пять лет заболеваемостью в 2005 г. последовало падение этих двух показателей в 2006 г., достаточно резкий подъем в 2007 г. и постепенное падение в последующие два года. Уменьшение численности клещей одновременно с падением заболеваемости отмечается в 2006 г. и по отдаленным участкам, но в 2007–2009 гг. картина несколько различается. Подъем численности на 43 км в 2007 г. совпадает с подъемом заболеваемости, но в последующие два года численность клещей на этом участке продолжает расти, а заболеваемость снижается. На 47 км наименьшее количество клещей на флаго-час наблюдалось в 2008 г., а в 2009 оно выросло, в то время как заболеваемость продолжала уменьшаться.

Самый большой процент клещей, зараженных ВКЭ, был выявлен в 2007 г. и совпал с подъемом заболеваемости (рис. 2). Но по участкам изменение вирусофорности и динамика заболеваемости выглядели по-разному: если на 43 и 47 км эти показатели менялись в одном направлении, то на 23 км наблюдалась противоположная тенденция. Так же, как и в прежние годы, полного соответствия по годам вирусофорности и численности клещей с заболеваемостью не наблюдалось.

Таким образом, по результатам пятилетнего мониторинга очагов КЭ в пригородной зоне Иркутска отмечена тенденция совпадения динамики численности основного переносчика – таежного клеща – и заболеваемости населения. Не удалось обнаружить корреляций между заболеваемостью людей КЭ, процентом зараженных клещей и долей клещей с высоким содержанием АГ ВКЭ. Известно, что истинные эпидемиологические закономерности могут быть выявлены лишь при синтезе результатов исследований

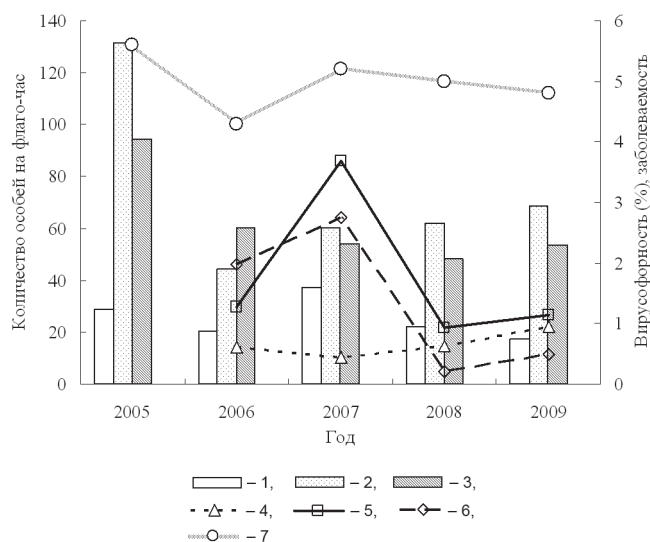


Рис. 2. Изменение численности и вирусофорности таежного клеща на разных участках Байкальского тракта и заболеваемости клещевым энцефалитом населения Иркутска по годам:

23 км: 1 – численность, 4 – вирусофорность;
43 км: 2 – численность, 5 – вирусофорность;
47 км: 3 – численность, 6 – вирусофорность.
7 – заболеваемость на 100 тыс. населения

на всех уровнях организации эпидемического процесса [9]. Недостаточное количество материала по прокормителям преимагинальных стадий *I. persulcatus* не позволило нам в данной работе включить его в анализ. Тем не менее, многолетняя работа на стационарных участках и накопленные данные по численности и вирусофорности основного переносчика, а также ежегодно регистрируемой заболеваемости населения, позволяют сделать вывод об активности и напряженности исследуемых очагов. В целях профилактики инфекций, переносимых клещами, следует вести постоянную санитарно-просветительную работу как среди садоводов, так и среди местного сельского населения: развивать пропаганду индивидуальной профилактики, применения защитной одежды и специальных акарицидных и репеллентных средств; вывешивать баннеры, предупреждающие об опасности присасывания клещей, а также адреса и телефоны пунктов профилактики КЭ и оказания экстренной помощи в случае присасывания. В связи с расположением на исследуемых участках баз отдыха и санаториев необходима ежегодная акарицидная обработка их территорий. Многолетний мониторинг природных очагов на постоянных стационарах необходим для оценки динамики лоймопотенциала как важнейшего показателя, обуславливающего их эпидемическое проявление.

Благодарность. Авторы выражают признательность А.Я.Никитину – ведущему научному сотруднику зоолого-паразитологического отдела за ценные советы по статистической обработке материала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атлас: Иркутская область (экологические условия развития). М., Иркутск; 2004. 90 с.
2. Воробьева Р.Н., Верета Л.А., Волков В.И., Ковалева Е.И., Кацко В.И., Долгих А.М. и др. Зараженность вирусом клещевого энцефалита клещей *Ixodes persulcatus* в некоторых очагах Дальневосточного региона по материалам 1970–1975 гг. Природно-очаговые инф. Дальнего Востока. 1976; 5:24–8.
3. Ковалевский Ю.В., Коренберг Э.И., Лев М.И., Кашина Н.В., Пчелкина А.А. Факторы, определяющие возможность заражения клещевым энцефалитом. Сообщение 2. Вирусофорность переносчика в среднетаежных лесах Хабаровского края. Мед. паразитол. и паразитарн. бол. 1988; 3:22–7.
4. Козарь Е.В., Хазова Т.Г. Результаты мониторинга состояния природных очагов клещевых инфекций в лесостепной западной зоне Красноярского края. Сибирь-Восток. 2006; 5:12–5.
5. Коренберг Э.И. Современные черты природной очаговости клещевого энцефалита: новые или хорошо забытые старые? Мед. паразитол. и паразитарн. бол. 2008; 3:3–8.
6. Наумов Р.Л., Гутова В.П. Географическая и годовая изменчивость зараженности иксодовых клещей вирусом клещевого энцефалита. Мед. паразитол. и паразитарн. бол. 1977; 3:346–55.
7. Плохинский Н.А. Биометрия. Новосибирск: изд-во Сибирского отделения АН СССР; 1961. 362 с.
8. Смородинцев А.А., Дубов А.В. Клещевой энцефалит и его вакцинопрофилактика. Л.: Медицина; 1986. 231 с.
9. Черкасский Б.Л. Эпидемический процесс как система. Сообщение 1. Структура эпидемического процесса. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1985; 3:45–51.
10. Beugnet F, Marié J.L. Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe. Vet. Parasitol. 2009; 163(4):298–305.
11. Gilbert L. Altitudinal patterns of tick and host abundance: a potential role for climate change in regulating tick-borne diseases. Oecologia. 2010; 162(1):217–25.
12. Haemig P.D., Lithner S., Sjøstedt De Luna S., Lundkvist A., Waldenström J., Hansson L. et al. Red fox and tick-borne encephalitis (TBE) in humans: can predators influence public health? Scand. J. Infect. Dis. 2008; 40(6–7):527–32.
13. Randolph S.E. Ticks and tick-borne disease systems in space and from space. Adv. Parasitol. 2000; 47:217–43.
14. Rizolli A., Haufler H.C., Tagliapietra V., Neteler M., Rosà R. Forest structure and roe deer abundance predict tick-borne encephalitis risk in Italy. PLoS One. 2009; 4(2):E4336.

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

1. [Atlas: the Irkutsk Region (Environmental Conditions of Development)]. M., Irkutsk; 2004. 90 p.
2. Vorob'eva R.N., Vereta L.A., Volkov V.I., Kovaleva E.I., Katsko V.I., Dolgikh A.M. et al. [Tick-borne encephalitis virus infection rate of *Ixodes persulcatus* ticks in some natural foci of the Far East region, following the data of 1970–1975]. Prirodnoochag. Inf. Daln. Vost. 1976; 5:24–8.
3. Kovalevsky Yu.V., Korenberg E.I., Lev M.I., Kashina N.V., Pchelkina A.A. [Factors that predetermine the possibility of infecting with tick-borne encephalitis. Paper 2. Percentage of infected vectors in the territory of the mid-taiga woods of the Khabarovsk region]. Med. Parazit. Parazitarn. Bol. 1988; 3:22–7.
4. Kozar' E.V., Khazova T.G. [Results of the monitoring over the state of tick-borne infections' natural foci in the forest steppe west territory of the Krasnoyarsk region]. Sibir'-Vostok. 2006; 5:12–5.
5. Korenberg E.I. [Current parameters of natural focality of tick-borne encephalitis: new ones or blast from the past?]. Med. Parazit. Parazitarn. Bol. 2008; 3:3–8.
6. Naumov R.L., Gutova V.P. [Geographical and annual variability of *Ixodes* ticks' infestation with tick-borne encephalitis]. Med. Parazit. Parazitarn. Bol. 1977; 3:346–55.
7. Plokhinsky N.A. [Biometry]. Novosibirsk: Izd. Sibirsk. Otdel. USSR SA; 1961. 362 p.
8. Smorodintsev A.A., Dubov A.V. [Tick-Borne Encephalitis and Its Vaccine Prophylaxis]. L.: Meditsina; 1986. 231 p.
9. Cherkassky B.L. [Epidemic process viewed as a system. Paper 1. Structure of epidemic process]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 1985; 3:45–51.

Authors:

Mel'nikova O.V., Vershinin E.A., Korzun V.M., Andaev E.I., Sidorova E.A. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. Trilissera St., 78, Irkutsk, 664047, Russia. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Об авторах:

Мельникова О.В., Вершинин Е.А., Корзун В.М., Андаев Е.И., Сидорова Е.А. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и ДВ. 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Поступила 20.10.10.

Э.А.Москвитина¹, М.В.Забашта¹, Н.Л.Пичурина¹, И.В.Орехов¹, Ю.М.Ломов¹, В.И.Адаменко¹,
Д.А.Феронов¹, А.В.Забашта¹, Л.М.Веркина¹, Е.В.Ковалев², Г.В.Айдинов³, М.М.Швагер³,
И.В.Дворцова³, К.С.Гайбарян³, М.В.Говорухина³, Ю.Н.Мортикова¹

ЛИХОРАДКА ЗАПАДНОГО НИЛА В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ: ЭКОЛОГО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВСПЫШКИ 2010 ГОДА

¹ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт,
²Управление Роспотребнадзора по Ростовской области, ³ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии
в Ростовской области», Ростов-на Дону

Целью работы является характеристика вспышки лихорадки Западного Нила в Ростовской области в 2010 г. с оценкой эколого-эпидемиологических особенностей. С 15 июля по 22 сентября выявлено 64 (1,480_{0/0000}) больных, у которых установлен трансмиссивный механизм передачи возбудителя. Пик заболеваемости совпал с массовым выплодом *Culicidae*, нарастанием численности комаров рода *Culex* и повторным ростом *Aedes*. Для вспышки характерен разлитой тип эпидемического процесса, высокий процент больных среди городских жителей, инфицированных в загородной зоне. Антиген вируса ЗН выявлен в ИФА в пробах от комаров *An. maculipennis* и *Cx. pipiens*, диких и синантропных птиц, клещей *Rh. rossicus*, мыши домовая и лесная, что указывает на выявление основных звеньев в циркуляции возбудителя и формирование природного очага лихорадки Западного Нила.

Ключевые слова: экологические условия, лихорадка Западного Нила, вспышка, эпидемиологический анализ.

E.A.Moskvitina, M.V.Zabashita, N.L.Pichurina, I.V.Orekhov, Yu.M.Lomov, V.I.Adamenko, D.A.Feronov,
A.V.Zabashita, L.M.Verkina, E.V.Kovalev, G.V.Aidinov, M.M.Shvager, I.V.Dvortsova, K.S.Gaibaryan,
M.V.Govorukhina, Yu.N.Mortikova

West Nile Fever in the Rostov Region: Ecological and Epidemiological Peculiarities of the Outbreak in 2010

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rospotrebnadzor Administration in the Rostov Region,
Centre of Hygiene and Epidemiology in the Rostov Region, Rostov-on-Don

This paper describes the outbreak of West Nile fever in the Rostov Region in 2010 and evaluates its ecological and epidemiological peculiarities. From 15th of July till 22nd of September 2010, detected were the 64 cases (1,480_{0/0000}) of the disease, which were characterized by vector-borne mechanism of transmission. Peak of morbidity coincided with mass breeding of *Culicidae*, increase in the number of *Culex* mosquitoes, and reoccurring growth of *Aedes* mosquito population. Diffuse type of the epidemiological process, higher rates of the cases among urbanites, infected in the country-side area, were the characteristic features of that outbreak. West Nile virus antigen was detected by means of IFA in samples taken from *An. maculipennis* and *Cx. pipiens* mosquitoes, wild and synanthropic birds, *Rh. rossicus* ticks, house and wood mice, which facilitates identification of the core factors for the agent circulation and West Nile fever natural focus formation.

Key words: environmental conditions, West Nile fever, outbreak, epidemiological analysis.

За последние десятилетия в мире, в том числе и в России, отмечены крупные вспышки лихорадки Западного Нила (ЛЗН), которая в соответствии с ММСП (2005 г.) может представлять региональные проблемы в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Ареал вируса Западного Нила (ВЗН) в России и за рубежом (в Африке, Европе, Америке, Азии и Австралии) занимает огромные территории в пределах экваториального, тропического и умеренного (южная часть) климатических поясов [4].

В результате масштабных экспедиционных исследований с использованием оригинального метода эколого-эпидемиологического зондирования выявлены потенциально опасные территории в отношении ВЗН и других арбовирусов на территории Российской Федерации. При этом наиболее угрожаемыми в отношении ЛЗН являются территории юга страны [5]. Начиная с 1996 г. произошло обострение эпидемиологической

ситуации по этой арбовирусной лихорадке с регистрацией вспышек в Румынии, Франции, Чехии, Италии, Израиле. В 1999 г. эпидемия ЛЗН возникла в США (Нью-Йорк), распространившись в последующие годы с птицами сначала по атлантическому миграционному руслу во Флориду, затем по путям миграции птиц — на остальную часть США, южную Канаду, Центральную и Южную Америку [14, 15, 18].

Как отмечают Д.К.Львов и соавт. [7], возникновение крупной вспышки ЛЗН в Волгоградской области и на сопредельных территориях (1999 г.) явилось вполне закономерным. К настоящему времени зарегистрировано более 1500 больных в Астраханской, Волгоградской, Ростовской, Воронежской, Ульяновской, Челябинской, Новосибирской, Томской областях, Краснодарском крае и Республике Калмыкии, в том числе заносы в Республику Татарстан и Москву. Установлена циркуляция ВЗН на территории Поволжья, в Пензенской,

Пермской и Саратовской областях, Татарстане, а также в Ставропольском, Алтайском, Приморском, Красноярском, Хабаровском краях и Омской области [3, 7, 10, 11]. В Ростовской области с 2000 г. отмечены спорадические случаи ЛЗН, в 2010 г. – вспышка этой арбовирусной инфекции.

Целью работы является характеристика вспышки лихорадки Западного Нила в Ростовской области в 2010 г. с оценкой эколого-эпидемиологических особенностей.

Материалы и методы

Использованы материалы для оперативно-эпидемиологического анализа вспышки 2010 г. Сведения систематизированы с учетом специально разработанной в РостНИПЧИ анкеты для сбора данных у перенесших ЛЗН, включающей данные из карт эпидемиологического обследования очагов больных и историй болезни. Проведена обработка анкет 64 больных ЛЗН с подтвержденным диагнозом. Эпидемиологический анализ заболеваемости ЛЗН осуществляли с использованием общепринятых методов, а также показателя «плотность инфекции» (число больных/площадь территории $\times 1000$) [8, 13]. Систематизированы данные эпизоотологических обследований в Ростовской области на стационарах многолетнего наблюдения, в Таганрогском заливе, дельте и пойме рек Дон и Маныч, оз. Маныч-Гудило и в Ростове-на-Дону (2000–2010 гг.). Маршрутный учет птиц, отлов комаров «на себе» (экземпляров/на один учет) осуществляли в соответствии с методическими документами, определение видового состава птиц – с учетом определителя В.Е.Флинта и соавт. [14], комаров – А.Е.Гуцевича и соавт. [2].

На антиген вируса Западного Нила исследованы птицы – 4430 экз. (2866 проб), кровососущие комары – 28688 экз. (1414), клещи – 10516 экз. (1203), млекопитающие – 2016 экз. (681). Использованы фондовые материалы энтомологических обследований ФГУЗ «Центра гигиены и эпидемиологии в Ростовской области», метеорологические данные по среднемесячным температурам воздуха с апреля по октябрь за 2000–2010 гг., предоставленные ГУ «Ростовский Центр гидрометеорологии и мониторинга окружающей среды». Для выявления антигена вируса ЗН и антител к нему применен иммуноферментный анализ с использованием соответствующих тест-систем производства научно-исследовательского института вирусологии им. Д.И.Ивановского. Подготовку проб и исследования проводили в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Статистическая обработка проводилась с использованием программ Excel 7.0.

Результаты и обсуждение

Ростовская область расположена на юге физико-географической страны – Русской равнины, в пределах Нижне-Донской области. По геоморфологиче-

ским и долготно-климатическим особенностям выделены две провинции: Доно-Донецкая (правобережная часть Дона) и Доно-Сало-Манычская (левобережная) с разнообразными типами (зональные: степной, сухостепной, полупустынный; интразональные: луговой, степной, лесной, водный), подтипами, вариантами и основными видами ландшафтов, растительности, почв и природных условий. Продолжительность периода с температурами выше 10 °С – от 165 дней на севере до 180 и более – на юге, сумма эффективных температур в году достигает 3000 °С и более, т.е. укладывается в границы распространения передаваемых членистоногими (комарами и клещами) арбовирусов и указывает на климатические условия, благоприятные для формирования природных очагов [6].

Через Ростовскую область проходит Восточно-Европейский пролетный путь птиц, являющихся основными носителями и транспортерами возбудителя ЛЗН и других арбовирусных инфекций. Основные направления миграции авифауны внутри области соответствуют ориентации долины р. Дон, от дельты до Цимлянского водохранилища, сети водохранилищ Западного Маныча (Веселовское, Пролетарское) и оз. Маныч-Гудило, через которые птицы попадают в низовья Волги и на северное побережье Каспийского моря. При пролете они используют околотовные биотопы для отдыха, пополнения жировых резервов и линьки. Большинство видов зимует на морских побережьях и внутренних водоемах Африки и Азии (Израиль, Иран, Турция), эндемичных по ЛЗН [6]. В результате орнитологического мониторинга учтено 165 видов птиц, в том числе 120 гнездящихся и 79 околотовных. Также установлено, что наиболее массовые виды на гнездовании и в период миграции составляют птицы водно-околотовного комплекса (большой баклан, чомга, цапли, чайки, крачки, утки, гуси, кулики), потенциальные носители вируса ЗН. Определены зоны риска при ЛЗН – это территории, прилегающие к основным водным артериям Ростовской области: Таганрогский залив, дельта и поймы рек Дон и Маныч с сетью водохранилищ (Веселовское, Пролетарское), оз. Маныч-Гудило. При исследовании авифауны выявлен антиген вируса ЗН в пробах от большого баклана (дельта Дона, 2001 г.), речной крачки (Веселовское водохранилище, 2003 г.) и серой вороны (дельта Дона, 2006 г.).

При изучении и оценке экологических особенностей лихорадки Западного Нила в период, предшествующий вспышке, выявлено 18 видов кровососущих комаров (*Diptera, Culicidae*), в том числе 11 потенциальных переносчиков вируса ЗН (*Aedes cantans*, *Ae. caspius*, *Ae. excrucians*, *Ae. vexans*, *Ae. flavescens*, *Ae. cinereus*, *Culex modestus*, *Cx. pipiens*, *Anopheles maculipennis*, *An. claviger*, *Coquillettidia richiardii*). В циркуляцию вируса ЗН включались *Ae. vexans* (2001, 2002, 2003 гг.), *An. claviger* (2002 г.), *Ae. caspius* (2003 г.) и *Ae. cinereus* (2007 г.), клещи *Hyalomma marginatum marginatum* и *Rhipicephalus rossicus*, а также мышевидные грызуны – обыкновен-

ная полевка (2005 г.). Кроме того, установлено наличие иммунной прослойки среди 2875 обследуемых (2000–2004; 2007–2008 гг.) в 22 административных районах и 4 городах с выявлением положительно реагирующих от $(0,89 \pm 0,89)$ до $(10,71 \pm 4,40)$ %.

Приведенные данные свидетельствуют об установленных экологических связях вируса ЗН с птицами, комарами, клещами и мелкими млекопитающими, что способствовало его циркуляции на территории области и возможности формирования природного очага с эпидемическими проявлениями ЛЗН различной интенсивности.

С 2000 по 2010 год выявлено 134 больных ЛЗН в 12 административных районах и 10 городах Ростовской области, Доно-Донецкой и Доно-Саломаньчской провинциях со степным видом ландшафта, в том числе водным интразональным, в дельте и поймах рек Дон, Маныч, Северский Донец и Веселовского водохранилища и биотопах, определяющих благоприятные экологические условия для основных составляющих в цепи циркуляции вируса ЗН – птиц и комаров.

Наиболее высокие относительные показатели заболеваемости отмечены в Сальске – $4,945_{0/0000}$ (2006 г.), Ростове-на-Дону – $4,100_{0/0000}$ (2010 г.) и Сальском районе – $3,810_{0/0000}$ (2005 г.). Наибольшее число больных ЛЗН – 89 человек (66,4 %) – выявлено в Ростове-на-Дону, что подтверждает одну из эпидемиологических особенностей этой лихорадки – преобладание городских жителей в общей структуре заболевших.

С 15 июля по 22 сентября 2010 г. в Ростовской области имела место вспышка ЛЗН – 64 ($1,480_{0/0000}$) больных, одним (1,56 %) летальным исходом, в том числе одним больным, проживающим в Краснодарском крае. Анализ динамики заболеваемости ЛЗН (по декадам) во время вспышки свидетельствует о подъеме и пике в I и II декадах августа и подтверждает ранее полученные данные о летне-осенней сезонности болезни (рисунок).

Следует отметить, что пик заболеваемости совпал с временем массового выплода комаров и повышенной активностью их нападения на человека. При изучении сезонной динамики среднесезонной численности имаго комаров в Ростове-на-Дону (2000–2010 гг.) установлено, что в августе происходит нарастание численности комаров рода *Culex* и повторный рост активности кровососущих рода *Aedes*. Это подтверждает ранее полученные данные по интенсивности нападения *Cx. pipiens* на людей в

мае–июне, с максимумом в августе [1].

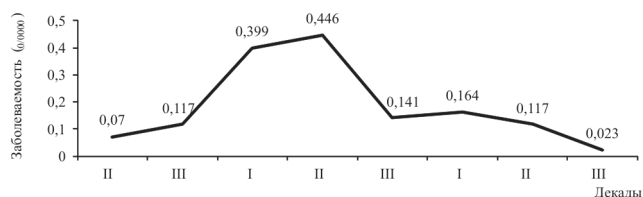
При анализе среднемесячных температур воздуха (2000–2010 гг.) установлено, что температуры в июне ($24,1^{\circ}\text{C}$) и августе ($27,5^{\circ}\text{C}$) 2010 г. превышали значения их за предшествующие годы. Это, в свою очередь, могло способствовать увеличению числа генераций переносчиков. При росте температуры воздуха (не выше 35°C) и воды физиологические реакции в организме комара протекают быстрее (переваривание крови, развитие и откладка яиц, развитие личинки), что способствует увеличению генераций [1].

В 2010 г. выявлены отличия показателей сезонного хода численности кровососущих комаров от среднесезонных. Так, появление первых комаров рода *Aedes* в Ростове-на-Дону отмечено раньше на 10–14 дней в мае, по сравнению с 2009 г., а для комаров рода *Culex* (*Cx. pipiens* и *Cx. modestus*) эта тенденция выявлена с 2006 г. Высокие показатели среднемесячной численности комаров рода *Aedes* (*Ae. caspius*, *Ae. vexans* и *Ae. cinereus*) отмечены в мае – $(30,6 \pm 12,3)$ экз. и июле – $(23,3 \pm 10,3)$ экз. при среднемесячных температурах воздуха $18,1$ и $26,6^{\circ}\text{C}$, в августе показатель составил $(12,2 \pm 5,8)$ экз. при $27,5^{\circ}\text{C}$. Численность комаров рода *Culex*, в основном за счет *Cx. pipiens* – основного переносчика вируса ЗН – достигла максимума в июле, соответствуя среднесезонным показателям августа – $(7,4 \pm 3,2)$ экз., и продолжала оставаться на высоком уровне в августе – $(6,2 \pm 2,6)$ экз., что обеспечило реализацию трансмиссивного механизма передачи возбудителя инфекции.

Больные ЛЗН выявлены в девяти городах: Миллерово, Донецк, Каменск-Шахтинский, Шахты, Новошахтинск, Ростов-на-Дону, Батайск, Таганрог и Сальск и семи административных районах: Чертковский, Обливский, Миллеровский, Белокалитвенский, Неклиновский, Азовский и Аксайский, что указывает на разлитой характер эпидемического процесса. У пяти больных из Ростова-на-Дону (2), Таганрога (1), Донецка (1) и Обливского района (1) в анамнезе установлено инфицирование за пределами Ростовской области – в Краснодарском крае, на Украине, в Волгограде и Волгоградской области. Наиболее высокие показатели заболеваемости установлены в Ростове-на-Дону – $4,100_{0/0000}$, а также в Аксайском, Азовском и Белокалитвенском районах – $3,485_{0/0000}$, $3,375_{0/0000}$ и $3,217_{0/0000}$ соответственно.

Наибольший удельный вес больных ЛЗН – 67,2 % (43 человека) выявлен в Ростове-на-Дону. При анализе территориального распределения больных установлено, что самые высокие показатели плотности инфекции выявлены в городах – от 6,317 (Шахты) до 123,400 (Ростов-на-Дону). В административных районах, где выявлены единичные больные, этот показатель варьировал от 0,314 (Миллеровский район) до 2,564 (Аксайский район).

При анализе сезонности установлена регистрация больных с июля по сентябрь с наибольшим их числом в августе – 42 больных (66,7 %), причем в



Динамика заболеваемости лихорадкой Западного Нила (по декадам)

первую и вторую декаду месяца зарегистрировано 36 (85,7 % от выявленных в августе). В июле инфицирование отмечено у 8 (12,7 %) больных, в сентябре – у 13 (20,6 %).

При оценке заболеваемости по возрастным группам отмечено, что больные зарегистрированы в возрасте от 9 до 80 лет с наиболее высокими показателями в возрастных группах 50–59 лет – 2,571_{0/0000} и 40–49 лет – 2,350_{0/0000}, в остальных группах они варьировали от 0,171_{0/0000} до 1,886_{0/0000}. Среди больных ЛЗН, выявленных в Ростове-на-Дону, установлены наиболее высокие показатели в возрастных группах 60 лет и старше – 1,240_{0/0000} и 50–59 лет – 0,858_{0/0000}. Среди больных ЛЗН было 38 (59,4 %) мужчин и 25 (39,6 %) женщин.

При распределении больных ЛЗН по профессиональному составу выявлено, что среди подвергшихся инфицированию вирусом ЗН были лица различных профессий. Учитывая, что у большинства больных в эпиданамнезе было пребывание на отдыхе за пределами города (купание, рыбная ловля, отдых на садовых и дачных участках), заболевание, как правило, не связано с профессиональной деятельностью. Так, в Ростове-на-Дону и Ростовской области рабочие, служащие, не работающие и пенсионеры составили наибольший удельный вес среди больных – 88,4 и 85,7 % соответственно.

За период вспышки выявлено 63 очага, в том числе с одним случаем – 62 (98,4 %), с двумя – 1 (1,6 %), где больные находились в одинаковых условиях по риску инфицирования.

При систематизации данных по механизму передачи возбудителя инфекции выявлено, что в 90,5 % (57 человек) случаев заболевшие отмечали укусы комаров на территории населенных пунктов и за его пределами, что указывает на реализацию трансмиссивного механизма передачи возбудителя ЛЗН. Подтверждением этому является выявление антигена вируса ЗН в одной пробе, сформированной из собранных комаров *An. maculipennis*, и 13,3 % проб от *Cx. pipiens*, отловленных в Ростове-на-Дону в июле–августе 2010 г. У шести больных, при отсутствии в эпиданамнезе укусов комаров, установлены условия и места возможного инфицирования.

При анализе возможных мест инфицирования с учетом территориальной привязки у 63 больных выявлено, что 30 человек были инфицированы по месту жительства (в Ростове-на-Дону – 17, в Азовском и Аксайском районах – по три, в городах Миллерово, Новошахтинске, Каменске-Шахтинском, Сальске, в Белокалитвенском, Неклиновском и Миллеровском районах – по одному). У 28 больных, в том числе у 24, зарегистрированных в Ростове-на-Дону, возможные места инфицирования связаны с пребыванием и отдыхом за пределами места жительства, в Ростовской области: в Азовском (9 случаев), Аксайском (10), Мясниковском, Неклиновском, Сальском, Зерноградском, Усть-Донецком, Верхнедонском районах, в окрестностях Батайска и рекреацион-

ной зоне отдыха Ростова-на-Дону. Пять больных накануне заболевания пребывали в Волгограде, Волгоградской области, в Анапе и Крыловском районе Краснодарского края, на Украине, в Одесской области. У одного больного место возможного инфицирования не выявлено.

Среди больных ЛЗН 52 человека проживали в городах и 11 – в сельской местности. По данным анкетирования, 60,3 % больных среди городских и сельских жителей до заболевания находились на отдыхе у водоемов, на дачных участках, на рыбалке, где, вероятно, произошло их инфицирование возбудителем ЛЗН.

Диагноз у больных подтвержден в ИФА с выявлением IgM (титры – 1:800 – 1:12800) и (или) IgG (1:100 – 1:400). При этом больные поступали, в основном, с предварительным диагнозом ОРВИ – 38 больных, с аллергическим дерматитом – 12, менингитами, менингоэнцефалитом, острым энцефалитом, энцефалопатией – 9, лихорадкой неясной этиологии – 4, острым бронхитом – 2 и в единичных случаях с острым гастроэнтеритом, пневмонией и болезнью Содоку.

По данным А.Е.Платонова и соавт. [9], при генотипировании РНК вируса ЗН, обнаруженного в крови больных в период вспышки, штаммы отнесены ко II генотипу, ранее циркулирующему в Ростовской области.

Таким образом, в результате эпидемиологического анализа вспышки ЛЗН в 2010 г. в Ростовской области установлено, что происходит расширение нозоареала, в том числе на север. Использование показателя «плотность инфекции» подтвердило одну из особенностей ЛЗН – преобладание городских жителей в структуре заболеваемости. Основной механизм передачи возбудителя ЛЗН – трансмиссивный, реализуемый через укусы кровососущих комаров. Антиген вируса ЗН выявлен в пробах от комаров *An. maculipennis* и *Cx. pipiens*. В связи с повышенными температурами в 2010 г., по сравнению с предшествующим периодом, выявлены изменения сезонного хода численности кровососущих комаров. ЛЗН имела выраженную летне-осеннюю сезонность с пиком заболеваемости в первой и второй декаде августа. В результате длительного отсутствия дождей для откладки яиц комары могут использовать различные искусственные водоемы (емкости и баки для воды на дачных участках, колодцы и т.п.). Возможно, что с этим связан высокий процент больных, которые подверглись риску инфицирования за пределами города, на дачных участках.

Риску заражения подвержены лица различных возрастных групп, но более всего – люди среднего и старшего возраста, в основном городские жители различных профессиональных групп (рабочие, служащие, пенсионеры), ведущие активный образ жизни (отдых, рыбалка и др.).

Выделены территории с высоким и повышенным рисками инфицирования, где показатели заболевае-

мости были $> 3,000_{0/0000}$ (Ростов-на-Дону, Аксайский, Азовский и Белокалитвенский районы) и $2,646_{0/0000}$ – $2,944_{0/0000}$ (Миллерово, Миллеровский и Чертковский районы) соответственно. Наличие территорий риска по эпидпроявлениям подтверждено результатами эпизоотологического обследования, проведенного в 2010 г. Выявлен антиген вируса ЗН в пробах от озерной и сизой чаек (Мясниковский район), грача (Багаевский и Веселовский районы), обыкновенного скворца (Ростов-на-Дону), комаров *An. maculipennis* и *Cx. pipiens* (Ростов-на-Дону), клещей *Rh. rossicus*, мыши домовая (Аксайский район) и мыши лесной (Веселовский район).

Результаты исследований указывают на выявление основных звеньев в циркуляции возбудителя: птицы – переносчики – человек и птицы – переносчики – мелкие млекопитающие, а также свидетельствуют о формировании природного очага лихорадки Западного Нила в Ростовской области, что является неблагоприятным прогностическим признаком.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Виноградова Е.Б. Комары рода *Culex pipiens* в России (таксономия, распространение, экология, физиология, генетика, практическое значение и контроль). Труды Зоологического ин-та РАН. 1997; 271:308.
2. Гуцевич А.В., Мончадский А.С., Штакельберг А.А. Комары (Семейство *Culicidae*). Фауна СССР. Насекомые двукрылые. Л.: Наука; 1970. 384 с.
3. Забашта М.В., Москвитина Э.А., Ломов Ю.М., Миноранский В.А., Пичурин Н.Л., Орехов И.В. и др. Эколого-эпидемиологические аспекты лихорадки Западного Нила в Ростовской области. Пробл. особо опасных инф. 2006; 2(92):25–32.
4. Колобухина Л.В., Львов Д.К. Лихорадка Западного Нила. В кн.: Руководство по медицинской вирусологии. М.; 2008. С. 514–22.
5. Львов Д.К., Дерябин П.Г., Аристова В.А., Бутенко А.М., Галкина И.В., Громашевский В.Л. и др. Атлас распространения возбудителей природно-очаговых вирусных инфекций на территории Российской Федерации. М.; 2001. 193 с.
6. Львов Д.К., Ильичев В.Д. Миграции птиц и перенос возбудителей инфекции (эколого-географические связи птиц с возбудителями инфекции). М.; 1979. С. 54–8.
7. Львов Д.К., Савченко С.Т., Алексеев В.В., Липницкий А.В., Пашанина Т.П. Эпидемиологическая ситуация и прогноз заболеваемости лихорадкой Западного Нила на территории Российской Федерации. Пробл. особо опасных инф. 2008; 2(95):10–2.
8. Облапенко Г.П., Вершинский Б.В. Пространственный аспект эпидемического процесса. Тр. ин-та. им. Пастера. 1976; 45:40–8.
9. Платонов А.Е., Карань Л.С., Шопенская Т.А., Федорова М.В., Колясникова Н.М., Русакова Н.М. и др. Генотипирование штаммов вируса лихорадки Западного Нила, циркулирующих на юге России, как метод эпидемиологического расследования: принципы и результаты. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2011; 2:29–37.
10. Путинцева Е.В., Липницкий А.В., Алексеев В.В., Смелянский В.П., Антонов В.А. и др. Распространение лихорадки Западного Нила в мире и Российской Федерации в 2010 году. Пробл. особо опасных инф. 2011; 1(107):38–41.
11. Путинцева Е.В., Смелянский В.П., Антонов В.А., Липницкий А.В., Алексеев В.В. Прогноз эпидемиологической ситуации по лихорадке Западного Нила на территории Российской Федерации на 2010 год. Пробл. особо опасных инф. 2010; 2(104):14–7.
12. Флинт В.Е., Мосалов А.А., Лебедева Е.А., Букреев С.А., Галушин В.М., Зубакин В.А. и др. Птицы Европейской России. Полевой определитель. М.; 2001. 224 с.
13. Черкасский Б.Л. Руководство по общей эпидемиологии. М.; 2001. С. 101–35.
14. Assessing capacity for surveillance, preservation and control of West Nile virus infection in United States, 1999 and 2004. Morb. Mortal. Wkly Rep. 2006; 17(6):150–3.
15. Deardorff E., Estrada-Franco J., Brault A.C., Navarro-Lopez R., Campomanes-Cortes A., Paz-Ramirez P. et al. Introductions of West Nile virus strains in Mexico. Emerg. Infect. Dis. 2006; 12(2):314–8.
16. Komar N., Clark G.G. West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. Rev. Panam. Salud Publica. 2006; 19(2):112–7.

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

1. Vinogradova E.B. [Mosquitoes *Culex pipiens* in Russia (taxonomy, dissemination, ecology, physiology, genetics, practical importance, and control/surveillance)]. Trudy Zool. Inst. RAS. 1997; 271:308.
2. Gutsevich A.V., Monchadsky A.S., Shinkel'berg A.A. [Mosquitoes (Culicidae Family). Fauna of the USSR. Diptera]. L.: Nauka; 1970. 384 p.
3. Zabashita M.V., Moskvitina E.A., Lomov Yu.M., Minoransky V.A., Pichurina N.L., Orekhov I.V. et al. [Ecological and epidemiological aspects of West Nile fever in the Rostov region]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2006; 2(92):25–32.
4. Kolobukhina L.V., L'vov D.K. [West Nile fever]. In: [Guidelines for Medical Virology]. M.; 2008. P. 514–22.
5. L'vov D.K., Deryabin P.G., Aristova V.A., Butenko A.M., Galkina I.V., Gromashevsky V.L. et al. [Atlas of Dissemination of the Natural Focus Viral Infection Agents in the Territory of the Russian Federation]. M.; 2001. 193 p.
6. L'vov D.K., Il'ichev V.D. [Bird Migration and Infectious Agent Transfer (ecological and geographical connections of birds and infectious agents)]. M.; 1979. P. 54–8.
7. L'vov D.K., Savchenko S.T., Alekseev V.V., Lipnitsky A.V., Pashanina T.P. [Epidemiological situation and prognosis for the West Nile fever morbidity in the territory of the Russian Federation]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2008; 95:10–2.
8. Oblapenko G.P., Verzhinsky B.V. [Spatial Aspect of Epidemiological Process]. Trudy Inst. Im. Pastera. 1976; 45:40–8.
9. Platonov A.E., Karan' L.S., Shopen'skaya T.A., Fedorova M.V., Kolyasnikova N.M., Rusakova N.M., et al. [Genetic typing of the West Nile fever strains, circulating in the South of Russia, as a means of epidemiological investigation: principles and results]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2011; 2:29–37.
10. Putintseva E.V., Lipnitsky A.V., Alekseev V.V., Smelyansky V.P., Antonov V.A. et al. [Dissemination of the West Nile Fever in the Russian Federation and in the World in 2010]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2011; 1(107):38–41.
11. Putintseva E.V., Smelyanskiy V.P., Antonov V.A., Lipnitskiy A.V., Alekseev V.V. [Prognosis of Epidemiologic Situation of West Nile Fever in the Territory of the Russian Federation for 2010]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; 104:14–7.
12. Flint V.E., Mosalov A.A., Lebedeva E.A., Bukreev S.A., Galushin V.M., Zubakin V.A. et al. [Birds of European Russia]. Polevoy Opredelitel'. M.; 2001. 224 p.
13. Cherkassky B.L. [Guidelines for General Epidemiology]. M.; 2001. P. 101–35.

Authors:

Moskvitina E.A., Zabashita M.V., Pichurina N.L., Orekhov I.V., Lomov Yu.M., Adamenko V.I., Feronov D.A., Zabashita A.V., Verkina L.M., Mortikova Yu.N. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. M.Gor'kogo St., 117/40, Rostov-on-Don, 344002, Russia. E-mail: plague@aaanet.ru
Kovalev E.V. Rospotrebnadzor Administration in the Rostov Region. Rostov-on-Don, Russia.
Aidinov G.V., Shvager M.M., Dvortsova I.V., Gaibaryan K.S., Govorukhina M.V. Centre of Hygiene and Epidemiology in the Rostov Region. Rostov-on-Don, Russia.

Об авторах:

Москвитина Э.А., Забашта М.В., Пичурин Н.Л., Орехов И.В., Ломов Ю.М., Адаменко В.И., Феров Д.А., Забашта А.В., Веркина Л.М., Мортикова Ю.Н. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru
Ковалев Е.В. Управление Роспотребнадзора по Ростовской области. Ростов-на-Дону.
Айдинов Г.В., Швагер М.М., Дворцова И.В., Гайбарян К.С., Говорухина М.В. Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области. Ростов-на-Дону.

Поступила 08.07.11.

И.В.Грачева, Т.В.Валова, Г.В.Григорьева

ТРАДИЦИОННЫЕ И НОВЫЕ ЗАЩИТНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ КОНСЕРВАЦИИ БАКТЕРИЙ

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

Представлены литературные данные об эффективности консервации бактерий при температурах от -20 до -196 °C в защитных средах, содержащих рекомендованные руководствами криопротекторы – глицерин, диметилсульфоксид, а также углеводы, вещества белковой природы. Главное внимание уделено публикациям, посвященным результатам длительного хранения бактерий при субнулевых температурах, оптимизации защитных сред для патогенных бактерий и использованию соединений с потенциальной криозащитной активностью. Сделан вывод о необходимости апробации рекомендуемых сред для поддерживаемых видов бактерий и используемой температуры хранения. Одним из направлений совершенствования технологий низкотемпературной консервации является поиск природных протекторов, обеспечивающих выживание бактерий в стрессовых условиях, включая низкие температуры, и возможность включения их в состав криозащитных сред. Приведены результаты успешного использования глицин-бетаина, полисахаридов арктических микроорганизмов для низкотемпературной консервации бактерий.

Ключевые слова: низкотемпературная консервация, бактерии, криопротекторы, защитные среды.

I.V.Gracheva, T.V.Valova, G.V.Grigor'eva

Traditional and Modern Protective Media for the Low-Temperature Bacteria Preservation

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Presented are the literature data on the efficiency of bacteria preservation at temperatures ranging from -20 to -196 °C in the protective media containing such cryoprotectors as glycerol, dimethyl sulfoxide, carbo-hydrates, substances of protein origin specified by regulatory guidelines. Most of the focus is on the publications reporting the results of the long-term bacteria preservation at sub-zero temperatures, optimization of the protective media for pathogenic bacteria, and usage of the compounds with potential cryoprotective activity. Noted is the necessity for approbation of the specified protective media for the conserved bacteria species at the applied preserving temperatures. One of the approaches to the enhancement of the low-temperature preservation techniques is a search for natural protectors, which can provide for surviving of bacteria in the unfavorable conditions, including low temperatures, and a search for possibility to integrate these natural protectors into the cryoprotective media. Displayed are the results of effective application of glycerol-betaine, and polysaccharides of Arctic microorganisms for the low-temperature bacteria preservation.

Key words: low-temperature preservation, bacteria, cryoprotectors, protective media.

Вступление микробиологии в бактериологический период развития поставило перед исследователями задачу сохранения выделенных культур микроорганизмов. Было разработано много способов длительной консервации, одним из которых является низкотемпературная консервация – замораживание и хранение бактерий при субнулевых температурах. При низкотемпературной консервации клетки подвергаются воздействию не только низких температур в диапазоне от -20 до -196 °C, но и комплекса стрессовых физико-химических факторов, возникающих вследствие фазовых переходов воды, таких как образование кристаллов льда, высокие концентрации внутри- и внеклеточных растворов, изменение pH среды, осмотические, концентрационные градиенты и другие [3, 6]. Согласно существующим сегодня представлениям основными причинами гибели клеток при замораживании-оттаивании являются повреждение мембранных структур кристаллами внутриклеточного льда и вторичные повреждения высокими концентрациями внутри- и внеклеточных растворов

(рисунок). Вклад каждого из факторов в развитие криоповреждений зависит от типа клетки и скорости охлаждения клеточных суспензий. Использование для консервации специальных сред с криопротекторами позволяет снизить количество криоповреждений и обеспечить сохранение максимального количества живых, структурно и функционально неповрежденных клеток. Большинство гипотез защитного действия традиционных криопротекторов основаны на свойствах последних уменьшать количество льда, изменять размеры и структуру кристаллов, понижать температуру замерзания растворов [3, 17].

Целью данной работы является рассмотрение положительного и отрицательного опыта применения защитных сред разного состава для низкотемпературной консервации бактерий. Главное внимание уделено публикациям, посвященным результатам длительного хранения бактерий при субнулевых температурах, оптимизации защитных сред для патогенных бактерий и использованию соединений с потенциальной криозащитной активностью.



Механизмы криповреждения интактных клеток [18]

Традиционные защитные среды для низкотемпературной консервации бактерий. Начало активного использования защитных сред для хранения микроорганизмов при субнулевых температурах связано с публикацией в 1949 г. C.Polge, A.U.Smith, A.S.Parkes работы о защитной роли глицерина в сохранении эукариотических клеток после замораживания. Много соединений изучено на способность защищать клетки от повреждений низкими температурами. Накопленный материал позволяет рекомендовать среды, эффективные для консервации бактерий. Современные руководства по консервации бактерий предлагают несколько вариантов защитных сред, включающих в качестве криопротекторов глицерин или диметилсульфоксид [10, 26]. Однако спектр применяемых криопротекторов значительно шире [17].

Для низкотемпературной консервации бактерий чаще всего используют глицерин в концентрациях 5–25 % в составе водных растворов, жидких питательных сред, в сочетании с другими криозащитными веществами [17]. Лучшей средой для консервации патогенных бактерий, имеющих медицинское значение, по сообщению R.K.A.Feltham *et al.* является бульон Oxoid с 10 % глицерина [14]. Выживаемость *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus aureus* после криоконсервации в 10–15 % растворах глицерина при использовании оптимальных программ замораживания составляет 67–100 % [1, 6, 8, 20]. Результаты криохранения *E. coli* с рекомбинантными плазмидами в течение 11 лет в 10 % глицерине, опубликованные G.L.Koenig, показывают, во-первых, отсутствие достоверного снижения количества живых

клеток в процессе хранения, во-вторых, сохранение в популяциях большинства штаммов структурно неповрежденных плазмид у 100 % тестированных клонов [20]. Наличие в популяциях некоторых штаммов бесплазмидных клеток G.L.Koenig связывает с ненадлежащей подготовкой культур для хранения, которая должна включать обязательную селекцию клонов с высоким уровнем устойчивости к маркерным антибиотикам плазмид.

Глицерин обеспечивает длительное сохранение бактерий при более высоких температурах в диапазоне от –20 до –80 °C. Например, количество живых клеток *Haemophilus influenzae* после года хранения в питательном бульоне с 25 % глицерина при –70 °C составляло 68 % [9]. Включение в защитную среду дополнительно обезжиренного восстановленного молока, глюкозы, дрожжевого экстракта позволило сохранить 86 % клеток за тот же период наблюдения. По сообщению M.Votava *et al.* оптимальной средой хранения *Haemophilus spp.* при –70 °C является триптиказо-соевый бульон с 10 % глицерина и 40 % лошадиной сыворотки [27]. Штаммы *Campylobacter jejuni* сохраняют жизнеспособность в течение года хранения в бульоне с 15 % глицерина при –85 °C после 6 циклов замораживания-оттаивания [16]. Вирулентные свойства *Flavobacterium psychrophilum* сохранялись практически на исходном уровне после двух лет хранения в бульоне с 10 % глицерина при –80 °C [22].

Диметилсульфоксид (ДМСО) – второй по частоте использования компонент защитных сред, более токсичен для бактериальных клеток, чем глицерин, и требует особых условий работы [3, 17]. Используется

в концентрациях не выше 5–10 % в составе водных растворов, жидких питательных сред [10]. Для *Mycobacterium phlei* 10 % ДМСО был лучшей средой для криоконсервации – обеспечивал выживание 100 % клеток [5]. Для *Streptomyces ruber* ДМСО менее эффективен, чем глицерин – выживаемость сразу после криоконсервации составляла 92 и 100 % соответственно. M.N.Cilmour *et al.* отмечают низкие защитные свойства ДМСО для грамотрицательных анаэробных бактерий [15].

Из группы углеводов для хранения бактерий при субнулевых температурах используют глюкозу, сахарозу, лактозу, трегалозу в концентрациях 5–15 % [17]. Считается, что углеводы обладают менее выраженными криозащитными свойствами, чем глицерин или ДМСО, поэтому их рекомендуют применять в сочетании с другими протекторами. Однако защитное действие сахарозы сопоставимо с таковым глицерина и ДМСО для криоконсервации *P. putida*, *E. coli* и *B. thuringiensis* [1, 6]. Наши исследования показали одинаковую эффективность сред с лактозой и глицерином для хранения *V. cholerae* при –70 °С. Среда Файбича с 10 % сахарозы успешно использована для криоконсервации *Y. pestis* [2]. При низкотемпературном хранении *H. influenzae* сахароза (10 %) и лактоза (6 %) менее эффективны, чем глицерин [9].

Гемолизированная кровь, сыворотки крови животных изучены на способность защищать бактериальные клетки от повреждений при замораживании. Согласно исследованиям R.Gorman *et al.* дефибрированная гемолизированная кровь лошади более эффективная среда хранения *C. jejuni* при –85 °С, чем коммерческая криосистема, содержащая гипертонический криоконсервирующий раствор, после 9 месяцев хранения в котором живые клетки не обнаружены [16]. Защитное действие крови было ниже, чем питательного бульона с 15 % глицерина. Напротив, для *Streptococcus pneumoniae* гемолизированная кровь более предпочтительная среда хранения при –70 °С, чем глицериновый бульон [25].

При разработке безотмывочных технологий консервации бактерий, используемых в пищевой и медицинской промышленности, в качестве протективных сред успешно применяют питательные среды для культивирования, защитные свойства которых обусловлены их компонентами – пептоном, триптоном, дрожжевым экстрактом. Выживаемость промышленных штаммов бактерий родов *Streptococcus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium* сразу после криоконсервации в питательных средах составила 51–100 % [4, 7]. После криоконсервации штаммы *Bifidobacterium adolescentis* сохраняли основные производственные показатели [4]. Отмечено лишь обратимое повышение у культур первой генерации чувствительности к антибиотикам, кислотному стрессу, увеличение продолжительности логарифмической фазы. По мнению авторов, изменения связаны с нарушением целостности и избирательной проницаемости цитоплазматической мембраны в результате нелетальных криопов-

реждений и активным протеканием в клетках репаративных процессов. После 15–20 лет криохранения производственных штаммов в питательных средах не отмечено достоверного снижения количества живых клеток, их продуктивной активности и дополнительного изменения признаков [7].

Защитные свойства питательных сред, а также сред с восстановленным молоком менее выражены при хранении бактерий в диапазоне температур от –20 до –80 °С [9]. Например, после года хранения *H. influenzae* в бульоне при –70 °С количество живых клеток снизилось до 20 %, в бульоне с 25 % глицерина выживало 100 % клеток [10]. Вместе с тем недавние исследования, проведенные сотрудниками нескольких лабораторий США, выявили определенные преимущества использования восстановленного молока для хранения бактерий при субнулевых температурах [13]. Основным методом консервации патогенных бактерий было хранение при –80 °С в питательных средах с 15 % глицерина или 10 % восстановленного молока. Из-за перебоев в электроснабжении в Новом Орлеане после ураганов Катрина и Рита размороженные образцы вынужденно хранились при температуре 28–30 °С. Через месяц наибольшее количество штаммов было восстановлено именно из сред с восстановленным молоком. Позднее проведены эксперименты, которые подтвердили, что включение в защитные среды восстановленного молока увеличивает период сохранения клетками *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella enterica* жизнеспособности после размораживания и хранения при температурах 25–30 °С. Живые клетки таких видов, как *C. jejuni*, *S. pyogenes*, не были обнаружены в образцах с глицерином уже после 5 дней хранения, в то время как их концентрация в пробах с молоком составила не менее 10⁶ КОЕ/мл через 49 дней хранения в вышеуказанных условиях.

Новые защитные среды для низкотемпературной консервации бактерий. Несмотря на успешное применение для консервации бактерий защитных сред с рассмотренными выше криопротекторами, проводятся исследования, направленные на поиск новых природных нетоксичных для клеток соединений, включая естественные протекторы, обеспечивающие выживание микроорганизмов в стрессовых условиях.

К группе таких веществ относится глицин-бетаин. Первоначально он был идентифицирован как органический осмопротектор, участвующий в поддержании объемного гомеостаза клеток в средах с высокими концентрациями осмотически активных веществ, а позднее у него выявлены криозащитные свойства. В отличие от глицерина и ДМСО глицин-бетаин не токсичен для бактериальных клеток. Считают, что он предотвращает холодовую агрегацию белков, поддерживает оптимальную текучесть мембран при низких температурах, обеспечивая их полноценное функционирование при физиологически не оптимальных температурах [11].

Экспериментальных данных о защитной роли глицин-бетаина при низкотемпературной консервации еще недостаточно. В работе D.Cleland *et al.* представлены результаты изучения протективного действия 6 % водных растворов глицин-бетаина на галофильные археобактерии при криоконсервации, согласно которым он так же эффективен, как и 10 % растворы глицерина [12]. К сожалению, в работе не представлены результаты по криоконсервации бактерий, имеющих медицинское значение. Однако среды с глицин-бетаином более эффективно защищали *Neisseria gonorrhoeae* и *S. pneumoniae* при сублимации – высушивании из замороженного состояния, чем традиционные среды с обезжиренным молоком, трегалозой и декстраном.

Защитное действие глицин-бетаина подтверждено исследованиями V.M.Sheehan *et al.* [23]. Выживаемость клеток *Lactobacillus salivarius* с гибридной плазмидой, содержащей гены транспортной системы глицин-бетаина *L. monocytogenes betL*, после хранения при –20 и –70 °С выше, чем у бесплазмидного штамма. Повышенную устойчивость клеток к замораживанию связывают с накоплением в клетках глицин-бетаина.

В работе С.Н.Филипповой и соавт. на наличие криозащитных свойств для бактерий изучен 4н-гексилрезорцин – химический аналог бактериального фактора d_1 , выполняющий в клетках функцию аутоиндуктора анабиоза [5]. При накоплении до порогового значения в среде роста фактора d_1 , например, в стационарной фазе, происходит понижение функциональной активности клеток, переход вегетирующих клеток в состояние метаболического покоя, характеризующееся повышенной устойчивостью к стрессовым факторам. Исследования показали, что в концентрациях, не оказывающих значительного токсического действия на клетки, 4н-гексилрезорцин не обладает выраженными защитными свойствами для бактерий.

В последние годы большое внимание уделяется изучению механизмов устойчивости к низким температурам и замораживанию психрофильных микроорганизмов и мезофильных, часть жизненного цикла которых может проходить при низких температурах [11, 18, 19, 21]. Знание механизмов устойчивости может стать основой для совершенствования методов низкотемпературной консервации живых организмов. Большой потенциал для низкотемпературной консервации могут иметь белки холодовой акклиматизации, криопротективные липополисахариды, белки-антифризы, вещества, контролирующее образование и рост кристаллов льда, которые выявлены у психрофильных микроорганизмов, населяющих экологические ниши Арктики и Антарктики [11, 18]. Сегодня некоторые из них используются в экспериментальных исследованиях с хорошими результатами. Защитные свойства полисахарида (P-21653), выделенного из арктической бактерии *Pseudoalteromonas arctica*, были выше, чем глице-

рина при замораживании клеток *E.coli* до –70 °С [19]. После трех циклов замораживания-оттаивания в присутствии 0,1, 0,5, 1 % P-21653 жизнеспособность сохранили соответственно 83, 91, 98 % клеток *E. coli*, а в 20 % глицерине только 43 %. Собственный экзополисахарид арктической бактерии *Colwellia psychrerythraea* лучше защищал клетки от гибели при замораживании до –80 °С, чем глицерин [21]. Исследования S.Shimodori показали, что защитное действие низкомолекулярного белка, выделенного из раковины креветки *Metapenaeus eusis*, приблизительно в 100 раз выше, чем глицерина, ДМСО при замораживании *Vibrio cholerae* до –20 °С [24].

В заключение хочется отметить, что рекомендованные составы криозащитных сред должны быть апробированы, а при необходимости оптимизированы для поддерживаемых видов бактерий и выбранной температуры хранения. Несмотря на то, что ведущей тенденцией в современной криобиологии является отход от эмпирических принципов исследования, подбор защитных сред для бактерий проводят опытным путем. Выбор защитной среды должен основываться на высоком уровне выживаемости клеток после консервации и в течение последующего хранения, стабильности фенотипических свойств и генетической организации. Проводимые исследования должны учитывать накопленный опыт и современные представления о механизмах, лежащих в основе криоповреждений и криозащиты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Высеканцев И.П., Крашенинникова Т.К., Олехнович Е.В., Степанюк Л.В. Консервирование бактерий *Pseudomonas putida* при низких температурах. Микробиология. 1992; 77(5):1098–9.
2. Кадетов В.В., Терентьев А.Н., Высеканцев И.П., Анисимов Б.И., Морозова Л.Н., Милотин А.В. Методические аспекты биологической безопасности при консервировании биологического материала для микробиологических исследований. Клин. лаб. диагн. 1999; 8:22–4.
3. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. Криопротекторы. Киев: Наукова думка; 1978. 204 с.
4. Сидоренко А.В., Новик Г.И., Высеканцев И.П. Криоконсервация бактерий рода *Bifidobacterium* в стерильных питательных средах в качестве криопротекторов. Микробиология. 2009; 78(5):33–40.
5. Филиппова С.Н., Сургучева Н.А., Кузнецов В.Д., Эль-Регистан Г.И., Гальченко В.Ф. Оптимизация защитных сред для хранения актиномицетов в жидком азоте. Микробиология. 2007; 76(4):573–6.
6. Цуцаева А.А., Попов В.Г., Сытник К.М., Бражникова А.М., Иткин Ю.А., Манульский В.Д. и др. Криобиология и биотехнология. Киев: Наукова думка; 1987. 214 с.
7. Цуцаева А.А., Ананьина А.Е., Бальбердина Л.М., Степанюк Л.В., Павленко Н.В. Опыт долгосрочного хранения промышленных штаммов микроорганизмов. Микробиология. 2008; 77(5):696–700.
8. Цуцаева А.А., Сафонова Т.С., Микулинский И.И., Воробьева И.И., Иткин Ю.А. Влияние низких температур (–196 °С) и криопротекторов на некоторые виды бактерий. Микробиология. 1978; XLVII(3):446–9.
9. Aulet de Saab O.C., de Castillo M.C., de Ruiz Holgado A.P., de Nader O.M. Comparative study of preservation and storage of *Haemophilus influenzae*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2001; 96(4):583–6.
10. Cabri guidelines. Laboratory procedures for microorganisms. Protective suspension media for freezing or (freeze)-drying. [Cited 25 Oct 2011]. Available from: <http://www.cabri.org/guidelines/microorganisms/M300Ap3.html>
11. Chattopadhyay M.K. Bacterial cryoprotectants. Resonance. 2002; 11:59–63.
12. Cleland D., Krader P., McCree C., Tang J., Emerson D. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. J. Microbiol.

Methods. 2004; 58(1):31–8.

13. Cody W.L., Wilson J.M., Hendrixson D.R., McIer K.S., Hagman K.E., Ott C.M. et al. Skim milk enhances the preservation of thawed –80 °C bacterial stocks. J. Microbiol. Methods. 2008; 75(1):135–8.

14. Feltham R.K.A., Power A.K., Pell P.A., Sneath P.H.A. A simple method for the storage of bacteria at –70 °C. J. Appl. Bacteriol. 1978; 44:313–6.

15. Gilmour M.N., Turner G., Berman R.G., Krenzer A.K. Compact liquid nitrogen storage system yielding high recoveries of gram-negative anaerobes. Appl. Environ. Microbiol. 1978; 35(1):84–8.

16. Gorman R., Adley C.C. An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of –20 °C and –85 °C for long-term preservation of *Campylobacter jejuni*. Lett. Appl. Microbiol. 2004; 38:306–10.

17. Hubalec Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. Cryobiology. 2003; 46(3):205–29.

18. Kawahara H. Cryoprotectants and ice-binding proteins. In: Margesin R. et al., editors. Psychrophiles: from biodiversity to biotechnology. Springer Berlin Heidelberg; 2008. P. 229–46.

19. Kim S.J., Yim J.H. Cryoprotective properties of exopolysaccharide (P-21653) produced by the antarctic bacterium, *Pseudoalteromonas arctica* KOPRI 21653. J. Microbiol. 2007; 45(6):510–4.

20. Koenig G.L. Viability of and plasmid retention in frozen recombinant *Escherichia coli* over time: a ten-year prospective study. Appl. Environ. Microbiol. 2003; 11:6605–9.

21. Marx J.G., Carpenter S.D., Deming J.W. Production of cryoprotectant extracellular polysaccharide substances (EPS) by the marine psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea* strain 34H under extreme conditions. Can. J. Microbiol. 2009; 55(1):63–72.

22. Michel C., Garcia C. Virulence stability in *Flavobacterium psychrophilum* after storage and preservation according to different procedures. Vet. Res. 2003; 34:127–32.

23. Sheehan V.M., Sleator R.D., Fitzgerald G.F., Hill C. Heterologous expression of betL, a betaine uptake system, enhances the stress tolerance of *Lactobacillus salivarius* UCC118. Appl. Environ. Microbiol. 2006; 72(3):2170–7.

24. Shimodori S., Moriya T., Kohashi O., Faming D., Amako K. Extraction from prawn shells of substances cryoprotective for *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol. 1989; 55:2726–8.

25. Siberry G., Brahmadathan K.N., Pandian R., Lalitha M.K., Steinhoff M.C., John T.J. Comparison of different culture media and storage temperatures for the long-term preservation of *Streptococcus pneumoniae* in the tropics. Bull. World Health Organisation. 2001;

79(1):43–7.

26. Tindall B.J. Vacuum-drying and cryopreservation of prokaryotes. Methods Mol. Biol. 2007; 368:73–97.

27. Votava M., Stritecká M. Preservation of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* at –70 degrees C. Cryobiology. 2001; 43(1):85–7.

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

1. Vysekantsev I.P., Krashenninikova T.K., Olekhovich E.V., Stepanyuk L.V. [Preservation of the bacteria *Pseudomonas putida* at low temperatures]. Mikrobiologia. 1992; 77(5):1098–9.

2. Kadetov V.V., Terent'ev A.N., Vysekantsev I.P., Anisimov B.I., Morozova L.N., Milyutin A.V. [Methodological aspects of biosafety of work on preservation of biological materials for microbiological investigations]. Klin. Lab. Diagnost. 1999; 8:22–4.

3. Pushkar' N.S., Shrago M.I., Belous A.M., Kalugin Yu.V. [Cryoprotectors]. Kiev: Naukova Dumka; 1978. 204 p.

4. Sidorenko A.V., Novik G.I., Vysekantsev I.P. [Cryopreservation of bacteria *Bifidobacterium* in sterile nutrient media as cryoprotectors]. Mikrobiologia. 2009; 78(5):33–40.

5. Filippova S.N., Surgucheva N.A., Kuznetsov V.D., El'-Registan G.I., Gal'chenko V.F. [Optimization of protective media for actinomycete storage in liquid nitrogen]. Mikrobiologia. 2007; 76(4):573–6.

6. Tsutsaeva A.A., Popov V.G., Sytnik K.M., Brazhnikov A.M., Itkin Yu.A., Manul'sky V.D., et al. [Cryobiology and Biotechnology]. Kiev: Naukova Dumka; 1987. 214 p.

7. Tsutsaeva A.A., Anan'ina A.E., Balyberdina L.M., Stepanyuk L.V., Pavlenko N.V. [Experience in the long-term preservation of microorganisms' production strains]. Mikrobiologia. 2008; 77(5):696–700.

8. Tsutsaeva A.A., Safonova T.S., Mikulinsky I.I., Vorob'eva I.I., Itkin Yu. A. [Effect of low temperatures (–196 °C) and cryoprotectors on a number of bacteria species]. Mikrobiologia. 1987; XLVII(3):446–9.

Authors:

Gracheva I.V., Valova T.V., Grigor'eva G.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Грачева И.В., Валова Т.В., Григорьева Г.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 30.01.11.

Е.В.Пименов¹, В.А.Оборин², А.Г.Ивонин¹**ОЦЕНКА АДГЕЗИВНЫХ СВОЙСТВ СПОР ВАКЦИННЫХ ШТАММОВ *BACILLUS ANTHRACIS* НА ЭРИТРОЦИТАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ С ПОМОЩЬЮ ФОТОКОЛОРИМЕТРИИ**¹Лаборатория сравнительной кардиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар;²ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет», Киров

В статье приведены результаты изучения адгезии спор вакцинных штаммов сибирезвездного микроба к эритроцитам человека и животных с помощью фотоколориметрического метода. Установлены различия в адгезивной способности спор *B. anthracis* штаммов № 55 ВНИИВВиМ, СТИ-1 и II вакцины Ценковского. Выявлено, что уровень адгезии спор *B. anthracis* № 55 ВНИИВВиМ к эритроцитам млекопитающих зависит от чувствительности вида к инфицированию возбудителем сибирской язвы.

Ключевые слова: сибирская язва, споры, вакцинные штаммы, адгезия, эритроциты.

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

Evaluation of the Adhesive Properties of Spores of *Bacillus anthracis* Vaccine Strains to the Mammalian Erythrocytes Using Photocolorimetry Technique

Laboratory of comparative cardiology of Komi Scientific Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar; Vaytka State University, Kirov

Displayed are the results of studies concerning adhesion of spores of *Bacillus anthracis* vaccine strains to the erythrocytes of humans and other mammals using photocolorimetry technique. Determined are the differences in adhesive capacity of spores of *B. anthracis* vaccine strains № 55 VNIIVVM, STI-I and II Tsenkovsky. Discovered is the fact that the level of adhesive activity of *B. anthracis* № 55 VNIIVVM spores to the mammalian erythrocytes depends upon the sensitivity of the species to the anthrax agent.

Key words: *Bacillus anthracis*, spores, vaccine strains, adhesion, erythrocytes.

Адгезия представляет собой сложный многокомпонентный процесс, обеспечивающий колонизацию микроорганизмами любых плотных субстратов, включая ткани человека и животных [4, 11, 14]. Изучению адгезивной активности микроорганизмов бактериальной природы в последние годы уделяется пристальное внимание, однако об адгезивных свойствах споровых форм бактерий, в том числе возбудителя сибирской язвы, имеются лишь единичные сообщения [7]. Следовательно, изучение адгезивности спор *B. anthracis* является актуальной задачей.

На сегодняшний день для исследования адгезии бактерий на клетках организма хозяина предложены методы *in vitro* и *in vivo* [4]. Однако методы *in vivo* с использованием лабораторных животных являются достаточно трудоемкими, дорогостоящими и непригодными для изучения большого количества штаммов, кроме того, исключают возможность работы с клетками человеческого происхождения [12]. В связи с этим при определении адгезивности бактерий наиболее часто применяются методы *in vitro* с использованием в качестве клеток-мишеней эритроцитов [1, 5]. Считается, что гликофорин мембраны эритроцитов идентичен гликокаликсу эпителиальных клеток, на котором расположены рецепторы для адгезинов микроорганизмов. Данное сходство и простота получения эритроцитов в необходимых количествах делает их универсальной моделью для изучения адгезивных свойств бактерий [12].

Для регистрации адгезии микроорганизмов к

эритроцитам применяется световая микроскопия [8], реакция гемагглютинации (РГА) [13], реже – электронная микроскопия [1]. Однако все эти методы не лишены определенных недостатков: для одних таковыми являются субъективность и недостаточная информативность, для других – трудоемкость и технические сложности.

Авторами статьи разработан метод изучения адгезии бактерий на эритроцитах *in vitro* при помощи фотоколориметрии, характеризующийся простотой исполнения, высокой чувствительностью и информативностью [10]. В данной статье приводятся результаты оценки адгезивной активности спор вакцинных штаммов сибирезвездного микроба фотоколориметрическим методом.

Материалы и методы

В исследованиях использовали штамм *B. anthracis* № 55 ВНИИВВиМ, предоставленный ООО «Агровет» (Москва), а также штаммы *B. anthracis* СТИ-1 и II вакцины Ценковского, полученные в ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны РФ» (Киров). Эксперименты проводили с суспензиями бактериальных спор, соответствующими 1,0 ед. оптической плотности (ОП) при длине волны проходящего света 540 нм.

Субстратом адгезии служили эритроциты человека 0 (I) Rh+ группы крови, а также лабораторных и сельскохозяйственных животных (белой крысы, морской свинки, кролика, коровы, свиньи). В каче-

стве антикоагулянтов при взятии крови применяли 3,8 % раствор лимонно-кислого натрия (1:10) или гепарин (3 ЕД/1,0 мл). Эритроциты трижды отмывали десятикратным объемом 0,9 % раствора хлорида натрия путем центрифугирования при 1000 об./мин в течение 5 мин и ресуспендировали в этом же растворе. Конечная концентрация эритроцитов в суспензии составляла $1,0 \cdot 10^{12}/л$.

При проведении эксперимента в пробирках смешивали по 1,0 мл суспензии эритроцитов и по 2,5 мл суспензии спор. В качестве контроля использовали пробы, содержащие: 2,5 мл суспензии спор и 1,0 мл 0,9 % раствора хлорида натрия; 1,0 мл суспензии эритроцитов и 2,5 мл 0,9 % раствора хлорида натрия. Пробы инкубировали на вращающейся платформе при $(37 \pm 1)^\circ C$ в течение 30 мин, после чего эритроциты осаждали путем центрифугирования при 1000 об./мин в течение 1,5 мин. Затем из проб отбирали надосадочную жидкость в объеме 2,0 мл и на фотоэлектроколориметре КФК-2 определяли величину ее ОП.

Фиксирующую активность эритроцитов в отношении спор вакцинных штаммов сибиреязвенного микроба оценивали по формуле:

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

где ПА – показатель адгезии, $D_{к1}$ – ОП надосадочной жидкости в 1-й контрольной пробе, $D_{к2}$ – ОП надосадочной жидкости во 2-й контрольной пробе, $D_{оп}$ – ОП надосадочной жидкости в опытной пробе.

В каждой серии опытов выполняли по пять независимых определений, статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы для обработки медицинской информации «Biostat версии 4.03».

Результаты и обсуждение

В настоящее время для специфической профилактики сибирской язвы в нашей стране разработаны живые вакцины на основе споровых форм штаммов *B. anthracis* № 55 ВНИИВВиМ, СТИ-1 и II вакцины Ценковского [6, 9]. Вакцина из штамма № 55 ВНИИВВиМ применяется в ветеринарии, а из СТИ-1 используется для специфической профилактики сибирской язвы у людей. Штамм II вакцины Ценковского не нашел практического применения в профилактике заболевания ввиду достаточно высокой остаточной вирулентности.

Известно, что эффективность живых вакцин, используемых для профилактики бактериальных инфекций, во многом зависит от способности микробных клеток приживаться и размножаться в организме хозяина [3]. В свою очередь, приживание бактерий обусловлено их способностью к адгезии на клетках-мишенях макроорганизма [4]. Исходя из этого, на первом этапе исследований оценивали связывание спор вакцинных штаммов сибиреязвенного микроба с эритроцитами человека (табл. 1).

Таблица 1

Уровень адгезии спор вакцинных штаммов *B. anthracis* на эритроцитах человека 0 (I) Rh+ группы крови ($M \pm m$, $n=5$)

Штаммы <i>B. anthracis</i>	ПА, %
№ 55 ВНИИВВиМ	46,31 $\pm$ 2,77
СТИ-1	43,29 $\pm$ 3,52
II вакцина Ценковского	57,63 $\pm$ 3,14*

*Различия с другими штаммами *B. anthracis* достоверны ($P < 0,05$) по критерию Стьюдента.

Анализ данных табл. 1 свидетельствует о том, что споры вакцинных штаммов сибиреязвенного микроба проявляли выраженную адгезивную активность в отношении эритроцитов человека. При этом ПА для штамма *B. anthracis* II вакцины Ценковского был достоверно выше ($P < 0,05$), чем для штаммов *B. anthracis* СТИ-1 и *B. anthracis* № 55 ВНИИВВиМ, что свидетельствовало о вариативности адгезивных свойств у вакцинных штаммов сибиреязвенного микроба.

В следующей серии экспериментов нами была проведена сравнительная оценка адгезивной активности спор *B. anthracis* № 55 ВНИИВВиМ в отношении эритроцитов различных видов млекопитающих (табл. 2).

Как показали результаты эксперимента, степень прикрепления спор *B. anthracis* № 55 ВНИИВВиМ к эритроцитам зависела от видовой принадлежности последних. Споры данного штамма проявляли достаточно высокий уровень адгезии на эритроцитах человека, кролика, морской свинки и коровы (ПА в пределах 39–47 %) и очень низкий – на эритроцитах белой крысы и свиньи (ПА около 4 %). Виды млекопитающих, эритроциты которых подвергались исследованию, были условно разделены нами на две группы (табл. 2). Для видов, относящихся ко 2-й группе, значения ПА были достоверно ниже ($P < 0,05$), чем для 1-й группы.

При сопоставлении результатов эксперимента с данными литературы по эпидемиологии сибирской язвы [2, 9] была установлена следующая закономерность: споры *B. anthracis* № 55 ВНИИВВиМ обладали выраженными адгезивными свойствами в отноше-

Таблица 2

Уровень адгезии спор *B. anthracis* № 55 ВНИИВВиМ к эритроцитам ряда млекопитающих по чувствительности к инфицированию возбудителем сибирской язвы

Группа	Вид млекопитающих	Количество обследованных	ПА, % ($M \pm m$)	Чувствительность к инфицированию [2, 9]
1-я	Человек	5	46,69 $\pm$ 2,77	Высокая
	Кролик	5	46,24 $\pm$ 3,18	Высокая
	Морская свинка	6	41,21 $\pm$ 2,16	Высокая
	Корова	5	39,18 $\pm$ 2,24	Высокая
2-я	Белая крыса	6	4,52 $\pm$ 1,08*	Низкая
	Свинья	5	4,23 $\pm$ 0,31*	Низкая

*Различия с 1-й группой достоверны ($P < 0,05$) по критерию Стьюдента.

нии эритроцитов млекопитающих, чувствительных к инфицированию возбудителем (человек, корова, морская свинка, кролик), и очень незначительной адгезивной активностью в отношении эритроцитов животных, резистентных к инфицированию сибиреязвенным микробом (белая крыса, свинья). Это позволило предположить, что в чувствительности млекопитающих к инфицированию возбудителем сибирской язвы определенную роль играет способность эритроцитов связывать на своей поверхности бактериальные споры.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что споры штаммов *B. anthracis* № 55 ВНИИВВиМ, СТИ-1 и II вакцины Ценковского обладают способностью к адгезии на эритроцитах человека. Установлено, что степень проявления спорами сибиреязвенных бацилл адгезивной активности зависит как от штаммовых особенностей микроба, так и от видовой принадлежности эритроцитов. Сопоставление результатов оценки адгезии с данными литературы по чувствительности человека и животных к заражению возбудителем сибирской язвы позволило выдвинуть предположение о том, что способность эритроцитов фиксировать на своей поверхности споры *B. anthracis*, возможно, играет определенную роль в чувствительности того или иного вида млекопитающих к инфицированию данным микробом.

Работа выполнена в рамках программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» на 2011 год. Авторы выражают благодарность Президиуму РАН за возможность проведения данных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анянueva Н.В., Ганина В.И., Ленченко Е.М., Ванина Н.Н. Оценка методов исследования взаимодействия бактерий с клетками животных. Докл. Российской акад. сельскохозяйств. наук. 2007; 3:53–5.
2. Бургасов П.Н., редактор. Патоморфогенез сибирской язвы. М.: Медицина; 2002. 240 с.
3. Гинзбург Н.Н., редактор. Сибирская язва. М.: Медицина; 1975. 160 с.
4. Езепчук Ю.В. Патогенность как функция биомолекул. М.: Медицина; 1985. 240 с.
5. Зайцева Е.А., Сомов Г.П. Влияние температуры на адгезивные свойства листерий. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2006; 3:20–3.
6. Коротич А.С., Погребняк Л.И. Сибирская язва. Киев: Урожай; 1976. 160 с.
7. Курилова А.А., Проскура В.А., Майская В.Д. Неоднородность штаммов *Bacillus anthracis* по способности к адгезии. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2004; 3:81–3.
8. Макаренко И.Д., Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н., Елякова Л.А., Звягинцева Т.Н., Потанов В.А. и др. Изучение возможности снижения адгезивной активности *Corinebacterium diphtheriae* биополимерами природного происхождения. Антибиотики и химиотерапия 1999; 44:50–3.

9. Онищенко Г.Г., редактор. Сибирская язва: актуальные проблемы разработки и внедрения медицинских средств защиты. М.: Медицина; 2010. 424 с.
10. Романов В.Е., Ивонин А.Г., Бондаренко А.Л., Оборин В.А., Нехорошикина Е.Л. Способ определения бактериофиксирующей активности эритроцитов. Патент № 2360969.
11. Сидоренко С.В. Инфекционный процесс как «диалог» между хозяином и паразитом. Клин. микробиол. антимикроб. химиотерапия. 2001; 3(4):301–15.
12. Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М., Бардых И.Х., Винокур Н.И. Адгезивные и некоторые другие свойства *Vibrio cholerae* TCP⁺ CTX⁺, изолированных на объектах внешней среды Ростовской области в 2002 году. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2004; 6:3–6.
13. Харсеева Г.Г., Москаленко Е.П., Алутина Э.Л., Бреддо А.М. Влияние полиоксидония на адгезивные свойства *Corinebacterium diphtheriae*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2009; 2:11–5.
14. Labbate M., Zhu H., Thung L., Bandara R., Larsen M., Willcox M. et al. Quorum-sensing regulation of adhesion in *Serratia marcescens* MG1 is surface dependent. J. Bact. 2007; 189:2702–11.

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

1. Anan'eva N.V., Ganina V.I., Lenchenko E.M., Vanina N.N. [Evaluation of methods of examination of interactions between bacteria and animal cells]. Report of the Russian Academy of Agricultural Sciences. 2007; 3:53–5.
2. Burgasov P.N., editor. [Pathological morphogenesis of Anthrax]. M.: Meditsina; 2002. 240 p.
3. Ginzburg N.N., editor. [Anthrax]. M.: Meditsina; 1975. 160 p.
4. Ezepechuk Yu.V. [Pathogenicity as a Function of Biomolecules]. M.: Meditsina; 1985. 240 p.
5. Zaitseva E.A., Somov G.P. [Action of temperature on the adhesive properties of Listeria]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2006; 3:20–3.
6. Korotich A.S., Pogrebnyak L.I. [Anthrax]. Kiev: Urozhai; 1976. 160 p.
7. Kurilova A.A., Proskurina V.A., Maikaya V.D. [Inhomogeneity of *Bacillus anthracis* strains as related to their adhesive capacity]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2004; 3:81–3.
8. Makarenko I.D., Zaporozhets T.S., Besednova N.N., Elyakova L.A., Zvyagintseva T.N., Potapov V.A. et al. [Analysis of the possibility to decrease adhesive activity of *Corinebacterium diphtheriae* using naturally occurring biopolymers]. Antibiotiki. Khimioterapiya. 1999; 44:50–3.
9. Onishchenko G.G., editor. [Anthrax: Topical Issues of Development and Implementation of the Medical Protection Means]. M.: Meditsina; 2010. 424 p.
10. Romanov V.E., Ivonin A.G., Bondarenko A.L., Oborin V.A., Nekhoroshkina E.L. [Method of identification of the bacteria-binding activity of erythrocytes]. Patent № 2360969.
11. Sidorenko S.V. [Infection as a “dialogue” between host and parasite]. Klin. Mikrobiol. Antimikrob. Khimioterapiya. 2001; 3(4):301–15.
12. Telesmanich N.R., Lomov Yu.M., Bardykh I.Kh., Vinokur N.I. [Adhesive and some other properties of *Vibrio cholerae* TCP⁺ CTX⁺, isolated from the environmental objects in the territory of the Rostov region in 2002]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2004; 6:3–6.
13. Kharseeva G.G., Moskalenko E.P., Alutina E.L., Brevdo A.M. [Effect of the polyoxidonium on the adhesive properties of *Corinebacterium diphtheriae*]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2009; 2:11–5.

Authors:

Pimenov E.V., Ivonin A.G. Laboratory of comparative cardiology of Komi Scientific Centre of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences. Kommunisticheskaya St., 24, Syktyvkar, 167982, Russia. E-mail: alexivonin@mail.ru
Oborin V.A. Vyatka State University. Moskovskaya St., 36, Kirov, 610000, Russia.

Об авторах:

Пименов Е.В., Ивонин А.Г. Лаборатория сравнительной кардиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук. 167982, Сыктывкар, ул. Коммунистическая, д. 24. E-mail: alexivonin@mail.ru
Оборин В.А. Вятский государственный университет. 610000, Киров, ул. Московская, 36.

Поступила 11.03.11.

Е.В.Чаусов¹, В.А.Терновой¹, Е.В.Протопопова¹, С.Н.Коновалова¹, Ю.В.Кононова¹, Н.Л.Тупота¹,
Н.С.Москвитина², В.Н.Романенко², Н.В.Иванова², Н.П.Большакова², Г.Н.Леонова³, В.Б.Локтев¹

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОЛНОГО ГЕНОМА ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА СИБИРСКОГО СУБТИПА НА ПРИМЕРЕ СОВРЕМЕННОГО ИЗОЛЯТА КОЛАРОВО-2008

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

²Томский Государственный Университет, Томск; ³НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, Владивосток

Определена полная последовательность генома штамма Коларово-2008 сибирского подтипа вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), изолированного из клеща в пригороде Томска. Анализ нуклеотидной последовательности показал, что уровень генетических отличий внутри сибирского подтипа ВКЭ может достигать 10 % по нуклеотидной последовательности и 7 % по аминокислотной последовательности для отдельных вирусных генов. Наиболее высокий уровень изменчивости имеет 3'-НТО генома сибирского генотипа ВКЭ, для которой уровень гомологии колеблется от 65 до 97 %. Самый высокий уровень гомологии штамм Коларово-2008 имеет со штаммом Vasilchenko, выделенным в Новосибирске в 1969 г. Уровень отличий между двумя томскими штаммами существенно выше, общее количество аминокислотных замен между томскими штаммами Zausaev и Коларово-2008 достигает 124, а уровень гомологии 3'-НТО составляет всего 79 %. Обнаруженная генетическая изменчивость сибирского субтипа ВКЭ имеет принципиальное значение для дальнейшего совершенствования генетической диагностики клещевого энцефалита.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита, штамм Коларово-2008, нуклеотидная последовательность, вирусный геном, флавивирусы

E.V.Chausov, V.A.Ternovoy, E.V.Protopopova, S.N.Kononova, Yu.V.Kononova, N.L.Tupota, N.S.Moskvitina,
V.N.Romanenko, N.V.Ivanova, N.P.Bol'shakova, G.N.Leonova, V.B.Loktev

Molecular Genetic Analysis of the Complete Genome of Tick-Borne Encephalitis Virus (Siberia Subtype): Modern Kolarovo-2008 Isolate

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tovo; Tomsk State University, the Department of Ecology and Vertebrate Zoology; RAMS Siberian Branch Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Vladivostok

Determined is the complete genome sequence of Kolarovo-2008 strain (Siberia subtype) of Tick-borne encephalitis virus (TBEV), isolated from a tick in the suburbs of the Tomsk city. Nucleotide sequence analysis testifies of the fact that the level of genetic differences within the Siberian subtype of TBEV amounts to 10 % of the nucleotide sequence and to 7 % of amino-acid sequence for certain virus genes. 3'-HTO of the genome of Siberian subtype has the highest rate of variability and the homology level ranging from 65 to 97 %. Kolarovo-2008 and Vasilchenko (isolated in Novosibirsk in 1969) strains have the highest level of genome homology. The level of dissimilarity between the two Tomsk strains is substantially higher: the total number of amino-acid substitutions in Tomsk Zausaev and Kolarovo-2008 strains equals to 124, and 3'-HTO level of homology is 79 %. Identified genetic variability of the Siberian subtype of TBEV is of a great importance for further development and enhancement of tick-borne encephalitis virus diagnostics.

Key words: tick-borne encephalitis virus, Kolarovo-2008 strain, nucleotide sequence, virus genome, flaviviruses.

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ) относится к роду *Flavivirus* семейства *Flaviviridae*. Он был открыт в 1937 г. на Дальнем Востоке. ВКЭ является прототипным представителем одноименного серокомплекса. В данный серокомплекс обычно включают различные штаммы вирусов клещевого энцефалита, Омской геморрагической лихорадки, Лангат, Повассан, Киассанурской лесной болезни, Шотландского энцефаломиелиита овец. Основным переносчиком ВКЭ являются клещи *Ixodes persulcatus* и *Ixodes ricinus*, но также возможно заражение людей через употребление молока от инфицированных животных [8]. Вирусы клещевого энцефалита широко распространены в северной части Евро-Азиатского континента, где ежегодно регистрируется до 14000 случаев заболевания. Заболеваемость клещевым энцефалитом ре-

гистрируется более чем в 25 европейских и 7 азиатских странах [4]. К настоящему времени известны 3 субтипа ВКЭ: дальневосточный, сибирский и западноевропейский [6]. Среди них географически наиболее широко распространен сибирский генотип, который доминирует в Сибири, Центральной Азии, на Урале и в европейской части Российской Федерации [1, 2]. На сегодняшний день в базе данных GenBank из более чем 30 опубликованных полноразмерных последовательностей геномов штаммов ВКЭ к сибирскому субтипу однозначно можно отнести только штаммы Vasilchenko, Zausaev и ЕК-328. Штаммы 178-79 и 886-84 занимают переходное положение между дальневосточным и сибирским субтипами ВКЭ, однако возможное их отнесение к сибирскому субтипу во многом спорно. Сибирский субтип ВКЭ вызывает

лихорадочные, менингеальные, менингоэнцефалитические и очаговые формы заболевания. При тяжелых формах заболевания развиваются параличи и парезы, преимущественно верхнего плечевого пояса и дыхательной мускулатуры. Уровень летальности может достигать 2–8 %. Этот субтип ВКЭ способен вызывать хронический клещевой энцефалит у человека [3, 9]. Уровень встречаемости хронических форм в Западной Сибири составляет 1–1,7 % от всех случаев ВКЭ [10]. Известна только одна нуклеотидная последовательность штамма Zausaev ВКЭ, который был выделен из мозга пациента, погибшего от хронического клещевого энцефалита и укушенного клещом в Томске [9].

Нами также был выделен штамм ВКЭ Коларово-2008 из иксодового клеща, отловленного в южном пригороде Томска в окрестностях одноименного поселка. По результатам предварительного генотипирования по нуклеотидным последовательностям фрагмента гена белка Е и 5'-нетранслируемой области (5'-НТО), данный штамм был отнесен к сибирскому субтипу ВКЭ. Для получения новых данных о генетическом разнообразии штаммов сибирского субтипа мы решили провести его полноразмерное секвенирование и анализ генома в сравнении с известными штаммами сибирского, западноевропейского и дальневосточного субтипов.

Материалы и методы

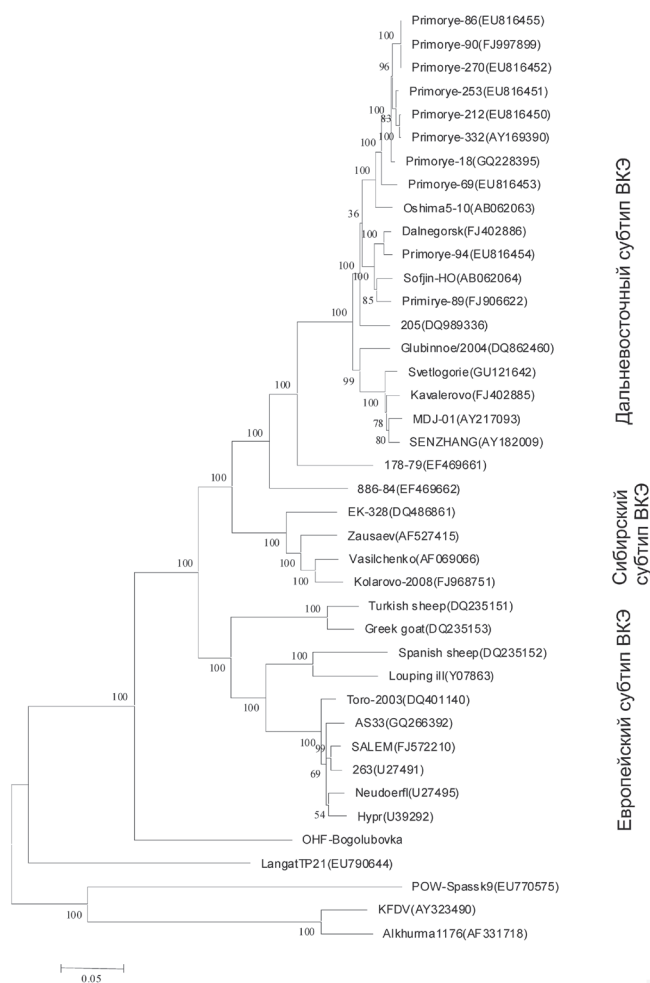
Штамм ВКЭ Коларово-2008 был выделен из иксодового клеща *Ixodes pavlovskyi*, отловленного на флаг в мае 2008 г. в южном пригороде Томска, около пос. Коларово. Штамм был трижды пассирован на культуре клеток почки эмбриона свиньи. Было проведено выделение вирусной РНК с использованием набора РИБО-золь-А (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия), построение кДНК с использованием набора РЕВЕРТА-Л (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия), амплификация перекрывающихся фрагментов генома с использованием авторского набора праймеров и определение последовательностей полученных ампликонов при помощи секвенатора ABI 3130XL. Полученная последовательность была депонирована в базу данных GenBank под номером FJ968751.

Полные нуклеотидные последовательности геномов штаммов ВКЭ и родственных флавивирусов были взяты из базы данных GenBank (рисунок). Множественное сравнение последовательностей и филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA 4 [11]. Для реконструкции вторичной структуры РНК использовали программу MFold v.3.2 (<http://www.bioinfo.rpi.edu>). Реконструкцию вторичной структуры белков осуществляли с помощью программ PSIPRED v.2.6 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html>) и nnPredict (<http://www.cmpchem.ucsf.edu/~nomi/nnpredict.html>). Для определения сайтов О- и N-гликозилирования в белках ис-

пользовали программы NetOGlyc 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) и NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), а для поиска трансмембранных доменов в белках программу TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>).

Результаты и обсуждение

Длина полного генома штамма Коларово-2008 ВКЭ составила 10928 н.о. Уровни гомологии нуклеотидных последовательностей и выведенной аминокислотной последовательности штамма Коларово-2008 в сравнении с прототипными штаммами флавивирусов даны в табл. 1. Уровень гомологии внутри сибирского генотипа колеблется от 90 до 100 % для полной нуклеотидной последовательности и от 93 до 100 % для аминокислотной последовательности в сравнении с Коларово-2008. Дальневосточный и европейский субтипы отличаются от сибирского генотипа весьма существенно, а уровень отличий достигает 17 % по нуклеотидной последовательности и



Филогенетическое дерево вируса клещевого энцефалита, построенное на основе известных полноразмерных нуклеотидных последовательностей ВКЭ, построенное по методу объединения ближайших соседей. Приведены оригинальные названия штаммов ВКЭ, депонированных в GenBank

Таблица 1

Уровни гомологии (%) нуклеотидной/выведенной аминокислотной последовательностей штамма Коларово-2008 в сравнении с прототипными штаммами флавивирусов

Штамм	Участки генома													
	5'-НТО	C-CTHD	preM	E	NS1	NS2a	NS2b	NS3	NS4a	2K	NS4b	NS5	3'-НТО	Всего
Zausaev	96	95/93	96/97	94/97	94/98	93/96	95/99	94/95	94/98	95/100	94/97	93/94	79	93/95
Vasilchenko	96	96/95	97/97	96/97	96/99	92/95	97/100	95/96	97/97	95/100	95/97	95/96	97	95/96
EK-328	-	93/94	91/95	92/96	93/98	90/96	93/98	93/96	91/98	94/95	91/95	91/94	65	90/93
178-79	-	88/86	85/94	85/95	86/96	82/88	83/96	86/93	83/92	89/100	84/94	84/92	64	83/90
886-84	-	88/88	86/94	87/96	86/96	81/87	86/96	86/94	85/95	86/100	84/95	85/92	79	84/91
ДВ-субтип	85-90	83-86/ 83-90	85-86/ 92-95	85/95-96	85-87/ 94-96	80-81/ 83-85	85-87/ 95-97	84-86/94	84-86/ 92-95	85-89/ 100	81-82/ 92-93	84-85/ 90-91	68-84	83-85/ 89-92
Западно-европейский субтип	89-90	84-86/83	83-85/ 93-94	84/94	83-84/ 93-94	80-81/ 84-86	82-83/ 92-94	84/92	84-87/ 94-96	79-82/ 100	80-82/ 90-92	84-85/91	65-75	82-83/ 89-90
Spanish sheep encephalitis	-	82/81	83/91	83/92	84/92	78/82	82/93	82/92	82/94	86/100	80/88	83/90	-	77/85
Turkish sheep encephalitis	-	83/84	79/89	81/92	82/93	81/84	86/94	83/91	82/94	84/95	79/90	83/90	-	77/85
Greek goat encephalitis	-	83/83	79/89	81/92	83/93	78/83	85/95	83/92	83/94	86/100	78/88	84/91	-	77/86
Louping ill	84	85/83	83/93	82/90	82/90	80/82	80/90	83/92	83/92	84/100	80/89	82/88	80	82/88
OHF	85	82/81	75/83	80/91	79/89	72/76	78/88	81/91	76/84	82/100	77/88	80/88	63	78/86
Langat	75	75/76	71/74	75/86	74/82	64/68	72/79	74/83	71/84	78/91	71/80	76/84	68	73/80
POW	63	60/52	62/62	70/77	68/75	57/55	63/69	70/78	64/71	56/56	67/70	72/81	58	67/72

11 % по аминокислотной.

При сравнении вторичных структур 5'-НТО и вирусных белков (С (C-CTHD), prM (M), E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) штамма Коларово-2008 со штаммами сибирского генотипа (Vasilchenko, Zausaev, EK-328) значительных отклонений не выявлено. Уровень гомологии и количество обнаруженных нуклеотидных и аминокислотных

замен были распределены по всему геному ВКЭ достаточно равномерно. Однако обращает на себя внимание, что вариабельность 3'-НТО генома была существенно выше. Уровень отличий достигал 21 % для штамма Zausaev и 35 % для EK-328. Столь существенная вариабельность этого района обнаружена также для европейского и дальневосточного субтипов ВКЭ. Эта вариабельность также характерна для

Таблица 2

Аминокислотные последовательности сайтов протеолиза C/CTHD, CTHD/prM NS4B/NS5 ВКЭ

Штамм	Сайт C/CTHD	Сайт CTHD/prM	Сайт NS4B/NS5
Коларово-2008	REKRR/STTDW	GVTLA/ATVRK	SGSRR/GGAEG
Vasilchenko	RGKKR/STTDW	GVTLA/ATVRK	SGSRR/GGAEG
Zausaev	RGKKR/STTDW	GVAFA/ATVRR	SGSRR/GGSEG
EK-328	RGKKR/STTDW	GATLA/ATVRK	SGSRR/GGSEG
178-79	RGKRR/SATDW	GVTLA/ATVRK	SGSRR/GGSDG
886-84	RGKRR/SVTDW	GVTLA/ATVRK	SGSRR/GGSDG
ДВ-субтип	RGKRR/SAADW RGKRR/SAVDW RGKRR/SAVNW	GVTLA/ATVRK GMTFA/ATVRK	SGSRR/GGSEG
Европейский субтип	RGKRR/SATDW	GMTLA/ATVRK	SGGRR/GGSEG AGGRR/GGSEG
Spanish sheep	RGKRR/SVTDW	GMTLA/ATVRK	SGGRR/GGSEG
Turkish sheep	RGKRR/SATDW	GVVLA/ATVRK	SGSRR/GGSEG
Greek goat	RGKRR/SATDW	GVVLA/ATVRK	SGSRR/GGSEG
Louping ill	RGKRR/SVTNW	GMTLA/ATVRK	SGGRR/GGSDG
OHF	RGKRR/STTDW	SIALA/ATVRK	SGTRR/GGSEG
Langat	RGSRR/TTIDW	GMCLT/ATVRR	TGTRR/GGSEG
POW	RGRRR/SGVDW	TMAMA/TTIHR	QGARR/GGAEG

других исследованных флавивирусов.

Штамм Коларово-2008 имеет 99–131 аминокислотных замен в отличие от других известных последовательностей полипротеинов ВКЭ сибирского субтипа. Большое количество аминокислотных замен говорит о существенном генетическом разнообразии сибирского субтипа, что делает крайне сложным сравнение биологических свойств вирусов данного генотипа с конкретными мутациями в геноме этих вирусов. Из известных канонических последовательностей для ВКЭ нам удалось обнаружить в сайте протеолиза C/CTHD у штамма Коларово-2008 замену $G_{92} \rightarrow E$. В сайте протеолиза вирусного полипротеина NS4B/NS5 у штаммов Коларово-2008 и Vasilchenko, по сравнению со штаммами Zausaev, EK-328, 178-79, 886-84 и штаммами дальневосточного субтипа, присутствует замена $S_{2516} \rightarrow A$ (табл. 2). Остальные сайты протеолиза у штамма Коларово-2008 не модифицированы. Мутации в двух сайтах процессинга вирусного полипротеина (C/CTHD и NS4B/NS5) могут влиять на скорость репликации и патогенность вируса.

Проведенный анализ вторичных структур вирусных белков, расположения трансмембранных доменов и потенциальных сайтов гликозилирования не показал значительных различий штамма Коларово-2008 от остальных штаммов сибирского субтипа. Вторичная структура РНК 5'-НТО, важного элемента репликации вируса [7], у штамма Коларово-2008 имеет обычный вид для сибирского субтипа ВКЭ [5].

Филогенетический анализ полногеномных последовательностей показывает, что штамм Коларово-2008 внутри ветви сибирского генотипа группируется со штаммом Vasilchenko (рисунок). Ранее штамм Коларово-2008 был отнесен нами к сибирскому субтипу ВКЭ на основе анализа небольшого фрагмента 5'-НТО [5]. Полногеномный анализ полностью подтвердил справедливость использованного ранее подхода и показал принципиальную возможность использования нуклеотидной последовательности 5'-НТО для генотипирования ВКЭ. Коларово-2008 является типичным представителем сибирского субтипа, группируясь в филогенетическом древе со штаммами Vasilchenko, Zausaev и EK-328, обособленно от штаммов 178-79 и 886-84 (рисунок). Штаммы 178-79 и 886-84 ВКЭ были изолированы в районе озера Байкал, что предполагает существенное географическое удаление биотопов, где циркулируют данные штаммы ВКЭ от южных районов Западной Сибири. Штаммы 178-79 и 886-84 располагаются на филогенетическом древе отдельно от ветви сибирского генотипа и имеют гомологию со штаммом Коларово-2008 на уровне 83–84 % в нуклеотидной и 90–91 % в аминокислотной последовательностях. Примерно такие же уровни гомологии со штаммом Коларово-2008 свойственны для штаммов дальневосточного и европейского субтипов, что свидетельствует о том, что отнесение штаммов 178-79 и 886-84 к сибирскому субтипу некорректно. Судя по уровням гомологии

и расположению ветвей в филогенетическом древе, эти штаммы представляют собой отдельные субтипы ВКЭ и вопрос о выделении нового субтипа ВКЭ представляется вполне обоснованным.

Самый высокий уровень гомологии (95 % в нуклеотидной и 96 в аминокислотной последовательностях) штамм Коларово-2008 имеет со штаммом Vasilchenko, выделенным в Новосибирске в 1969 г. Уровень отличий двух Томских штаммов существенно выше и общее количество аминокислотных мутаций между штаммом Zausaev и Коларово-2008 достигает 124, а уровень гомологии 3'-НТО всего 79 %. Это не позволяет связать обнаруженные отличия в геноме этих штаммов ВКЭ с возможностью вызывать хронический клещевой энцефалит, что характерно для штамма Zausaev. Высокий уровень генетических отличий штаммов ВКЭ, изолированных в Томске, показывает, что генетическое разнообразие ВКЭ внутри сибирского субтипа весьма значительно даже в пределах одного города и его пригородов. Это хорошо согласуется с ранее известными данными по генетическому разнообразию между различными генотипами ВКЭ [1, 2, 5].

Таким образом, в настоящее время опубликованы 4 полноразмерных нуклеотидных последовательности геномов сибирского субтипа ВКЭ, три из которых изолированы на юге Западной Сибири. Анализ последовательности полных геномов сибирского субтипа ВКЭ показывает, что его генетическая вариативность весьма широка. Она может достигать 10 % для нуклеотидной и 7 для аминокислотной последовательностей отдельных вирусных генов. Это позволяет предположить, что сибирский субтип ВКЭ имеет большой потенциал для генетической изменчивости, и появление новых геновариантов сибирского субтипа ВКЭ весьма вероятно. На наш взгляд, именно исследование генетической изменчивости, особенностей генетической организации вируса клещевого энцефалита может и должно стать базой для дальнейшего совершенствования методов профилактики, лечения и генетической диагностики клещевого энцефалита.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Злобин В.И., Верхолина М.М., Демина Т.В., Джигоев Ю.П., Адельшин Р.В., Козлова И.В. и др. Молекулярная эпидемиология клещевого энцефалита. *Вопр. вирусол.* 2007; (6):4–13.
2. Локтев В.Б., Терновой В.А., Немцов С.В. Молекулярно-генетическая характеристика вируса клещевого энцефалита. *Вопр. вирусол.* 2007; 52(5):10–6.
3. Погодина В.В., Фролова М.П., Ерман Б.А. Хронический клещевой энцефалит. Новосибирск.: Наука, 1986. 78 с.
4. Charrel R.N., Attoui H., Butenko A.M., Clegg J.C., Deubel V., Frolova T.V. et al. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004; 10(12):1040–55.
5. Chausov E.V., Ternovoi V.A., Protopenova E.V., Kononova J.V., Kononova S.N., Pershikova N.L. et al. Variability of the Tick-Borne Encephalitis Virus Genome in the 5' Noncoding Region Derived from Ticks Ixodes persulcatus and Ixodes pavlovskyi in Western Siberia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010; 10(4):365–75.
6. Ecker M., Allison S.L., Meixner T., Heinz F.X. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J. Gen. Virol.* 1999; 80:179–85.
7. Filomatori C.V., Lodeiro M.F., Alvarez D.E., Samsa M.M., Pietrasanta L., Gamarnik A.V. A 5' RNA element promotes dengue virus synthesis on a circular genome. *Genes Dev.* 2006; 20:2238–49.

8. Gritsun T.S., Lashkevich V.A., Gould E.A. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res.* 2003; 57:129–46.
9. Gritsun T.S., Frolova T.V., Zhankov A.I., Armesto M., Turner S.L., Frolova M.P. *et al.* Characterization of a Siberian Virus Isolated from a Patient with Progressive Chronic Tick-Borne Encephalitis. *J. Virol.* 2003; 77:25–36.
10. Poponnikova T.V. Specific clinical and epidemiological features of tick-borne encephalitis in Western Siberia. *Int. J. Med. Microbiol.* 2006; 296(SI):59–62.
11. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 2007; 24:1596–9.

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

1. Zlobin V.I., Verkhovina M.M., Demina T.V., Dzhioev Yu.P., Adel'shin R.V., Kozlova I.V. *et al.* [Molecular epidemiology of tick-borne encephalitis virus]. *Vopr. Virusol.* 2007; (6):4–13.
2. Loktev V.B., Ternovoy V.A., Netesov S.V. [Molecular genetic characterization of tick-borne encephalitis virus]. *Vopr. Virusol.* 2007; 52(5):10–6.
3. Pogodina V.V., Frolova M.P., Erman B.A. [Chronic Tick-Borne Encephalitis]. Novosibirsk: Nauka, 1986. 78 p.

Authors:

Chausov E.V., Ternovoy V.A., Protopopova E.V., Kononova S.N., Kononova Yu.V., Tupota N.L., Loktev V.B. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia.

Moskvitina N.S., Romanenko V.N., Ivanova N.V., Bol'shakova N.P. Tomsk State University, the Department of Ecology and Vertebrate Zoology. Tomsk, Russia

Leonova G.N. RAMS Siberian Branch Research Institute of Epidemiology and Microbiology. Vladivostok, Russia.

Об авторах:

Чайсов Е.В., Терновой В.А., Протопопова Е.В., Коновалова С.Н., Кононова Ю.В., Тупота Н.Л., Локтев В.Б. ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл, п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Москвитина Н.С., Романенко В.Н., Иванова Н.В., Большакова Н.П. Томский государственный университет. 634050, Томск, пр. Ленина 36. E-mail: zoo_tsu@mail.ru

Леонова Г.Н. НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН. 690028, г. Владивосток, ул. Сельская 1. E-mail: alinaleon@mail.primorye.ru

Поступила 20.07.11.

А.В.Шашкова, А.А.Горяев, С.П.Заднова, Я.М.Краснов, Н.И.Смирнова, В.В.Кутырев

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERA* O1, ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИХ БИОВАРА И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ШТАММОВ ЭЛЬТОР ВИБРИОНОВ НА ТИПИЧНЫЕ И ИЗМЕНЕННЫЕ

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

Разработана мультилокусная ПЦР тест система, позволяющая идентифицировать штаммы *Vibrio cholerae* O1 серогруппы при выделении чистой культуры на основе выявления гена *rfbO*, определять их биовар – классический или эльтор при тестировании соответственно генов *cas3* и *rtxC* и одновременно проводить дифференциацию эльтор вибрионов на типичные токсигенные штаммы, содержащие в геноме ген *ctxB^{Eltor}*, и генетически измененные варианты, имеющие *ctxB^{Class}*. Эффективность и специфичность тест-системы экспериментально доказана при анализе 64 природных штаммов *V.cholerae* разных серогрупп и биоваров и 13 штаммов энтеробактерий и других видов рода *Vibrio*. Принадлежность изученных штаммов *V. cholerae* биовара эльтор к типичным или измененным вариантам подтверждена секвенированием гена *ctxB*.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, мультилокусная ПЦР тест-система, идентификация и дифференциация, генетически измененные варианты.

A.V.Shashkova, A.A.Goryaev, S.P.Zadnova, Ya.M.Krasnov, N.I.Smirnova, V.V.Kutyrev

Construction of the PCR Test-System for the Detection of *Vibrio cholerae* O1 Toxigenic Strains, for Indication of Their Biovar and for Differentiation between Typical and Altered El Tor-*Vibrio* Strains

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Worked out is the multilocus PCR test-system which makes it possible to identify *Vibrio cholerae* O1 strains on the basis of *rfb* gene detection, to determine their biovar – either Classical or El Tor by testing *cas3* or *rtxC* genes respectively, and at the same time to differentiate them into typical (which carry *ctxB^{Eltor}* gene) and genetically altered (which carry *ctxB^{Class}* gene) variants. Efficacy and specificity of the test-system is demonstrated by the analysis of 64 natural *V. cholerae* strains of various serogroups and biovars, and 13 strains of enterobacteria and other species of *Vibrio* genus. Relation of the studied *V. cholerae* El Tor isolates to the typical or altered vibrio variants is proved out by *ctxB* gene sequencing.

Key words: *Vibrio cholerae*, multilocus PCR test-system, identification and differentiation, genetically altered vibrio variants.

Холера – особо опасное инфекционное заболевание с диарейным синдромом, возбудителем которого являются токсигенные штаммы *Vibrio cholerae*. Несмотря на то, что существуют более 200 различных серогрупп холерных вибрионов, эпидемии и пандемии холеры способны вызывать только токсигенные штаммы *V. cholerae* O1 серогруппы классического и эльтор биоваров, а также *V.cholerae* O139 серогруппы. Холерные вибрионы классического биовара считаются возбудителями первых шести пандемий азиатской холеры (1817–1923 гг.). Возбудителем 7-й пандемии холеры, начавшейся в 1961 г. и продолжающейся до сих пор, являются штаммы *V. cholerae* биовара эльтор. Токсигенные штаммы *V.cholerae* O139 серогруппы вызывают спорадические случаи холеры. Холерные вибрионы классического и эльтор биоваров отличаются по ряду фенотипических и генетических свойств [1, 4, 11]. Одним из основных генетических отличий холерных классических и эльтор вибрионов является различие нуклеотидных последовательностей гена *ctxB* из оперона *ctxAB*, кодирующего биосинтез холерного токсина (ХТ). Разная нуклеотидная последовательность генов *ctxB* классического и эльтор вибрионов определяет неодинаковую аминокислотную последовательность В-субъединиц их токсинов, вследствие чего различают ХТ классического (или 1-го) типа, продуцируемый класси-

ческими вибрионами, и ХТ эльтор (или 2-го) типа, характерный для вибрионов эльтор [15].

Несмотря на широкое распространение типичного возбудителя 7-й пандемии холеры на ее первом этапе (1960–1990 гг.), в последние годы в процессе эволюции возникли и заняли доминирующее положение новые варианты *V. cholerae* биовара эльтор с повышенной вирулентностью, получившие обозначение генетически измененных вариантов. Геном типичных токсигенных штаммов эльтор вибрионов содержит ген *ctxB^{Eltor}*, тогда как у измененных вариантов присутствует ген *ctxB^{Class}* [5, 8, 13]. Продукция измененными вариантами *V. cholerae* O1 биовара эльтор ХТ классического типа приводит к повышению их вирулентности по сравнению с типичными штаммами. Именно с холерными вибрионами, относящимися по всем фенотипическим признакам к биовару эльтор, но несущими классический аллель гена *ctxB*, связана в настоящее время эпидемия холеры на Гаити [9].

Для генной диагностики холеры разработано значительное количество ПЦР тест-систем, позволяющих не только выявлять токсигенные штаммы холерного вибриона, но и определять их серогруппу, биовар и эпидемическую значимость. Для детекции ДНК вирулентных штаммов *V. cholerae* на основе амплификации фрагмента *ctxA* гена, кодирующего биосинтез А-субъединицы холерного токсина,

используется сертифицированная «ГенХол – тест-система» (ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов). Ростовским НИПЧИ совместно с НИИ микробиологии Минобороны России разработана тест-система для выявления ДНК *Vibrio cholerae* (*ctxA*⁺ *tcpA*⁺) методом полимеразной цепной реакции. Для выявления холерного вибриона O1 серогруппы, определения биовара и эпидемической значимости используются мультиплексные тест-системы «Ген *V. cholerae* Мульти-ЭФ» (ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов), «АмплиСенс *V. cholerae*-FRT» (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии, Москва) и т.д. [2, 3, 6, 7]. Однако все известные ПЦР тест-системы предназначены для выявления типичных штаммов холерного вибриона и не позволяют идентифицировать измененные варианты с повышенной вирулентностью.

Таким образом, в связи с возникновением высоковирулентных измененных вариантов *V. cholerae* биовара эльтор, продуцирующих ХТ классического типа, и опасностью их завоза на территорию Российской Федерации и граничащих с ней стран, актуальна разработка мультилокусной ПЦР тест-системы для быстрой и достоверной идентификации штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы, определения их биовара и дифференциации токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара эльтор на типичные изоляты и измененные варианты.

Материалы и методы

В работе использованы 49 клинических штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп, 15 штаммов *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп, 4 вида энтеробактерий и 9 штаммов бактерий близкородственных видов, полученных из Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб». Для культивирования бактерий применяли бульон и агар LB (pH 7,2), а также бульон АК1 (pH 8,4).

Подготовку проб осуществляли согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». Выделение ДНК проводили методом нуклеосорбции на силикагеле с использованием гуанидинизотиоцианата.

Амплификацию ДНК проводили с использованием программируемого термостата «Терцик» (ДНК-технология, Россия).

Анализ и оценку результатов осуществляли путем сравнения полученных в ПЦР ампликонов с аналогичными фрагментами типичных токсигенных штаммов *V. cholerae* классического и эльтор биоваров методом электрофореза в агарозном геле.

Секвенирование гена *ctxB* проводили на приборе «CEQ8000» (Beckman Coulter, США). Для сравнения использовали нуклеотидные последовательности генов штаммов *V. cholerae* N16961 биовара эльтор и *V. cholerae* O395 классического биовара, представленных в GenBank. Анализ последовательностей ДНК

осуществляли с использованием программ «Genetic Analysis System Software Version 9.0» и «Mega4».

Результаты и обсуждение

При конструировании мультилокусной ПЦР тест-системы были использованы как применяемые ранее праймеры, так и разработанные впервые. С целью определения принадлежности выявленного штамма *V. cholerae* к O1 серогруппе были выбраны праймеры на локус *rfbO*, кодирующий синтез O1 антигена [12]. Для дифференциации типичных изолятов и генетически измененных вариантов *V. cholerae* биовара эльтор использовали аллельспецифичные праймеры на ген *ctxB* [14]. Как известно, ген *ctxB* входит в состав оперона *ctxAB*, кодирующего продукцию холерного токсина, и выявление гена *ctxB* также указывает на токсигенность изучаемого штамма. Дифференциацию биоваров проводили с помощью праймеров на ген *rtxC*, который определяется только в штаммах *V. cholerae* эльтор биовара [10], и на ген *cas3*, кодирующий хеликазу и присутствующий у холерных вибрионов классического биовара.

В ходе работы было экспериментально установлено соотношение всех компонентов реакционной смеси, а также подобрано сочетание праймеров, позволяющее получать четкие и легко интерпретируемые результаты ПЦР анализа. Для проведения анализа использовали ПЦР параллельно в двух реакционных смесях. Первая смесь содержала праймеры к генам классических вибрионов, вторая – эльтор. В качестве контрольных штаммов использовали типичные токсигенные штаммы классического и эльтор биоваров соответственно – *V. cholerae* 569B (*rfbO*⁺, *cas3*⁺, *ctxB*^{Class+} и *rtxC*⁺, *ctxB*^{Eltor+}) и *V. cholerae* M818 (*rfbO*⁺, *rtxC*⁺, *ctxB*^{Eltor+} и *cas3*⁺, *ctxB*^{Class+}).

Специфичность разработанной тест-системы была подтверждена на основе использования штаммов близкородственных видов – *V. mimicus*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginoliticus*, *V. albensis*, а также энтеробактерий – *E. coli*, *S. enteritidis*, *Sh. flexneri*, *A. hydrophila*. При проведении ПЦР тестирования указанных штаммов был получен отрицательный результат (отсутствие ампликонов). При анализе штаммов *V. cholerae* O139 и неO1/неO139 серогрупп отсутствовали фрагменты, соответствующие локусу *rfbO* (638 п.н.). Полученные данные подтверждают специфичность разработанной тест-системы в отношении штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы.

Для определения эффективности сконструированной тест-системы исследовали 47 клинических штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы, выделенных в разные годы на территории России и сопредельных государств. Данные по определению специфичности и эффективности сконструированной тест-системы с использованием некоторых штаммов энтеробактерий и видов рода *Vibrio* приведены в таблице и на рис. 1. У всех исследованных штаммов присутствовал ампликон размером 638 п.н., соответствующий локусу

Специфичность и эффективность сконструированной мультилокусной ПЦР-тест-системы

Вид	Серогруппа и биовар	Штамм	Место выделения	Год выделения	Реакционная смесь № 1			Реакционная смесь № 2		
					<i>rfbO1</i>	<i>cas3</i>	<i>ctxB^{Class}</i>	<i>rfbO1</i>	<i>rtxC</i>	<i>ctxB^{Eltor}</i>
<i>E. coli</i>	-	M17	н/и	н/и	-	-	-	-	-	-
<i>S. enteritidis</i>	-	BO3	н/и	н/и	-	-	-	-	-	-
<i>V. mimicus</i>	-	ATCC 33653	Институт Пастера	н/и	-	-	-	-	-	-
<i>V. vulnificus</i>	-	ATCC27562	Калифорнийский унив.	н/и	-	-	-	-	+	-
<i>V. parahaemoliticus</i>	-	745	Новороссийск	н/и	-	-	-	-	-	-
<i>V. albensis</i>	-	37263	Ставрополь	н/и	-	-	-	-	+	-
<i>V. cholerae</i>	O37	1322-69	Коллекция Саказаки	н/и	-	-	+	-	-	-
<i>V. cholerae</i>	O20	10332-62	Коллекция Саказаки	н/и	-	-	-	-	-	-
<i>V. cholerae</i>	O62	KM3	Узбекистан	1971	-	-	+	-	+	-
<i>V. cholerae</i>	O41	14520	Астрахань	1976	-	+	-	-	-	-
<i>V. cholerae</i>	O42	13030	Астрахань	1976	-	-	-	-	+	-
<i>V. cholerae</i>	O9	P-16140	Узбекистан	1990	-	-	+	-	+	-
<i>V. cholerae</i>	O139	M028	Индия	1993	-	-	-	-	+	+
<i>V. cholerae</i>	O139	55	Франция	1994	-	-	-	-	+	+
<i>V. cholerae</i>	O1 классический	M8	Волгоград	1942	+	+	+	+	-	-
<i>V. cholerae</i>	O1 классический	569B	Индия	1950	+	+	+	+	-	-
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	M295	Туркменистан	1965	+	-	-	+	+	+
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	M818	Саратов	1970	+	-	-	+	+	+
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	M1013	Башкирия	1972	+	-	-	+	+	+
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	P13762	Узбекистан	1988	+	-	+	+	+	-
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	M 1259	Пермь	1990	+	-	-	+	+	+
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	P15384	Украина	1991	+	-	+	+	+	-
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	M1264	Краснодар	1993	+	-	+	+	+	-
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	M1293	Дагестан	1994	+	-	+	+	+	-
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	P17644	Ачинск	1997	+	-	+	+	+	-
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	M1344	Казань	2001	+	-	+	+	+	-
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	M1429	Башкирия	2004	+	-	+	+	+	-
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	M1430	Тверь	2005	+	-	+	+	+	-
<i>V. cholerae</i>	O1 эльтор	P18899	Мурманск	2006	+	-	+	+	+	-

rfbO1 и свидетельствующий о принадлежности этих штаммов к O1 серогруппе. При этом было показано, что 5 из этих 47 изолятов относятся к токсигенным штаммам классического биовара, так как у них происходила амплификация фрагментов ДНК размером 415 и 189 п.н. в первой реакционной смеси, что указывает на присутствие в их геноме соответственно биовароспецифического гена *cas3*, а также гена *ctxB^{Class}*, связанного с продукцией ХТ классического типа (рис. 1, дорожки 11–14).

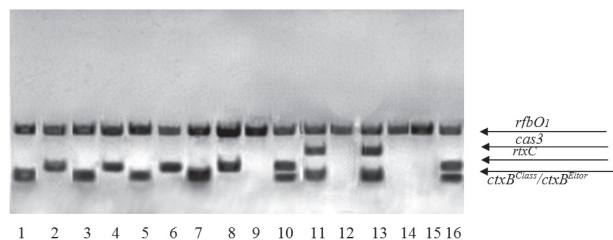


Рис. 1. Электрофореграмма типичных изолятов и измененных вариантов *V. cholerae*, полученная с использованием разработанной мультилокусной ПЦР тест-системы:

Измененные варианты эльтор вибрионов: 1, 2 – *V. cholerae* M1266, 3, 4 – M1293, 5, 6 – *V. cholerae* M1349, 7, 8 – *V. cholerae* M1430; типичные штаммы эльтор вибрионов: 9, 10 – *V. cholerae* M1013, 15, 16 – *V. cholerae* M818; типичные штаммы классических вибрионов: 11, 12 – *V. cholerae* J89, 13, 14 – *V. cholerae* 569B.

Нечетные числа – ампликоны, полученные в первой реакционной смеси, содержащей праймеры к генам классических вибрионов; четные – ампликоны, полученные во второй реакционной смеси, содержащей праймеры к генам эльтор вибрионов

У 42 штаммов *V. cholerae* при ПЦР-анализе наблюдалась иная картина. В их геноме присутствовал биовароспецифический ген *rtxC*, выявляемый с помощью второй реакционной смеси, поскольку во всех случаях формировался ампликон размером 265 п.н. (*rtxC*), что указывает на их принадлежность к холерным вибрионам биовара эльтор. При этом 20 штаммов относились к типичным токсигенным штаммам *V. cholerae* O1 биовара эльтор, так как для них было характерно наличие ампликона размером 189 п.н. во второй реакционной смеси, что указывает на наличие в их геноме гена *ctxB^{Eltor}* (рис. 1, дорожки 9–10, 15–16). В то же время у 22 изолятов обнаружено присутствие в геноме гена *ctxB^{Class}* классического типа (*ctxB^{Class}*), о чем свидетельствует образование ампликона к гену *ctxB^{Class}* в первой реакционной смеси (рис. 1, дорожки 1–8).

Для подтверждения полученных с помощью сконструированной мультилокусной ПЦР тест-системы результатов был секвенирован ген *ctxB* некоторых штаммов. В результате проведенного анализа в последовательности гена *ctxB* у 13 взятых для анализа изолятов обнаружены две нуклеотидные замены тимина (Т) на цитозин (С) в положениях 115 и 203, что указывает на присутствие в их геноме гена *ctxB^{Class}* классического типа (*ctxB^{Class}*), рис. 2. Данные секвенирования полностью подтвердили результаты, полученные с использованием разработанной муль-

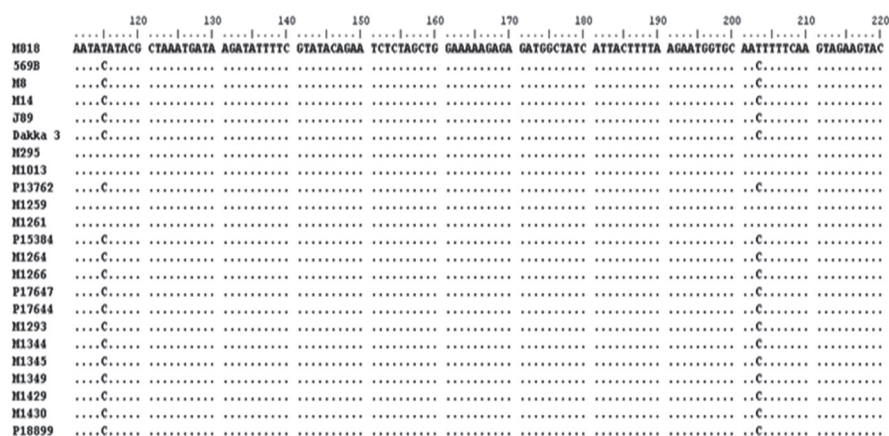


Рис. 2. Фрагменты секвенированной последовательности гена *ctxB*. Точками отмечены одинаковые нуклеотиды

тилокусной ПЦР тест-системы, указав на принадлежность выявленных 13 штаммов холерного вибриона биовара эльтор к измененным вариантам.

Таким образом, полученные данные свидетельствует о том, что исследование природных штаммов холерных вибрионов с помощью сконструированной мультилокусной ПЦР тест-системы позволяет не только идентифицировать штаммы *V. cholerae* O1 серогруппы, определять их биовар и токсигенность, но и дифференцировать штаммы *V. cholerae* биовара эльтор на типичные изоляты и измененные варианты, несущие в геноме ген *ctxB* классического типа.

На созданную мультилокусную ПЦР тест-систему подана заявка на получение патента на изобретение (№ 2011109469 от 14.03.2011 г.).

Работа выполнена по государственному контракту № 70-Д от 25.07.2011 г. в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бароян О.В. Холера Эль-Тор. М.: Медицина; 1971. 254 с.
2. Заднова С.П., Ливанова Л.Ф., Крепостнова И.М., Захарова Т.Л., Осина А.В., Смирнова Н.И. Комплексная гено- и иммунодиагностическая тест-система для идентификации холерных вибрионов O1 и O139 серогруппы и оценки их вирулентности. Патент РФ № 2404257.
3. Осина Н.А., Бугоркова Т.В., Коннова С.С., Куклев В.Е., Кутырев В.В. Способ детекции и определения биотипа, серогруппы и токсигенности возбудителя холеры и набор для его осуществления. Патент РФ 2360972.
4. Смирнова Н.И., Кириллина О.А., Чельдышова Н.Б., Кутырев В.В. Дифференциация штаммов *Vibrio cholerae* eltor по их эпидемиологической значимости с помощью новых диагностических холерных бактериофагов эльтор ctx- и ctx+ и полимеразной цепной реакции. Журн. эпидемиол., микробиол. и иммунобиол. 2001; 6:11–6.
5. Смирнова Н.И., Кутырев В.В. Эволюция генома возбудителя холеры. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2004; 4:3–13.
6. Смирнова Н.И., Чельдышова Н.Б., Горяев А.А., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Эволюция генома *Vibrio cholerae*: пути формирования атипичных штаммов. Пробл. особо опасных инф. 2008; 3(97):3–12.
7. Яцышина С.Б., Осина Н.А., Астахова Т.С., Ильичев Ю.А., Куличенко А.Н., Хайтович А.Б., Шипулин Г.А. Разработка тест-систем на основе мультиплексной ПЦР для обнаружения эпидемически значимых холерных вибрионов. URL: <http://www.interlabservice.ru/consulting/index.php?id=1961> (дата обращения 15.03.2011 г.).
8. Bhattacharya T., Chatterjee S., Maiti D. et al. Molecular analysis of the *rstR* and *orfU* genes of the CTX prophages integrated in the small chromosomes of environmental *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strains. Environ. Microbiol. 2006; 8:526–34.
9. Chin C.-S., Sorenson J., Harris J.B. et al. The origin of the Haitian cholera outbreak strain. N. Engl. J. Med. 2010; 364:33–42.
10. Chow K.H., Ng T.K., Yuen K.Y., Yam W.C. Detection of RTX toxin gene in *Vibrio cholerae* by PCR. J. Clin. Microbiol. 2001; 39:2594–7.
11. Faruque S.M., Albert M.J., Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998; 62:1301–14.
12. Goel A.K., Ponnariappan S., Kamboj D.V., Singh L. Single multiplex polymerase chain reaction for environmental surveillance of toxigenic-pathogenic O1 and non-O1 *Vibrio cholerae*. Folia Microbiol. (Praha). 2007; 52:81–5.
13. Kumar P., Jain M., Goel A. K., Bhadauria S., Sharma S. K., Kamboj D. V. et al. A large cholera outbreak due to a new cholera toxin variant of the *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype in Orissa, Eastern India. J. Med. Microbiol. 2009; 58:234–8.
14. Morita M., Ohnishi M., Arakawa E., Bhuiyan N.A., Nusrin S., Alam M. et al. Development and validation of a mismatch amplification mutation PCR assay to monitor the dissemination of an emerging variant of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. Microbiol. Immunol. 2008; 52:314–7.
15. Olsvik Q., Wahlberg J., Petterson B., Uhlen M., Popovic T., Wachsmuth I.K. et al. Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholerae* O1 strains. J. Clin. Microbiol. 1993; 31:22–35.

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

1. Baroyan O.V. [El Tor Cholera]. M.: Meditsina; 1971. 254 p.
2. Zadnova S.P., Livanova L.F., Krepostnova I.M., Zakharova T.L., Osina A.V., Smirnova N.I. [Complex geno- and immunodiagnostic test-system for *Vibrio cholerae* O1 and O139 serotypes identification and evaluation of their virulence]. RF Patent 2404257.
3. Osina N.A., Bugorkova T.V., Konnova S.S., Kuklev V.E., Kutyrev V.V. [Method of detection and identification of the cholera agent biotype, serogroup and toxigenicity, and the kit for its application]. RF Patent 2360972.
4. Smirnova N.I., Kirillina O.A., Cheldyshova N.B., Kutyrev V.V. [Differentiation of *Vibrio cholerae* El Tor Strains on the basis of their epidemic value using the new diagnostic ctx- and ctx+ El Tor cholera bacteriophages and polymerase chain reaction]. Zh. Epidemiol. Mikrobiol. Immunobiol. 2001; 6:11–6.
5. Smirnova N.I., Kutyrev V.V. [Evolution of the cholera agent genome]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 2004; 4:3–13.
6. Smirnova N.I., Cheldyshova N.B., Goryaev A.A., Lozovsky Yu.V., Kutyrev V.V. [*Vibrio cholerae* genome evolution: ways of atypical strains formation]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2008; 97:3–12.
7. Yatsyshina S.B., Osina N.A., Astakhova T.S., Il'ichev Yu. A., Kulichenko A.N., Khaitovich A.B., Shipulin G.A. [Development of the test-systems on the basis of multiplex PCR for the detection of *Vibrio cholerae* with epidemic potential]. Available from: <http://www.interlabservice.ru/consulting/index.php?id=1961> [cited 15 Mar 2011].

Authors:

Shashkova A.V., Goryaev A.A., Zadnova S.P., Krasnov Ya.M., Smirnova N.I., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Шашкова А.В., Горяев А.А., Заднова С.П., Краснов Я.М., Смирнова Н.И., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 05.04.11.

Н.А.Шишкова, Т.Б.Кравченко, Л.И.Маринин, А.Н.Мокриевич

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ПОЧВЫ СКОТОМОГИЛЬНИКА

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

Использование современных генно-инженерных методов позволяет не только провести идентификацию сибиреязвенных штаммов, выделенных из почвы, но и осуществить сравнительные молекулярно-генетические исследования этих штаммов. Проведено лабораторное исследование 80 проб земли, взятых из старого скотомогильника, с использованием микробиологических и генетических методов. Эпидемиологическую значимость выделенных штаммов оценивали по результатам ПЦР с видоспецифическими праймерами и по данным многолокусного VNTR-анализа. Выделено шесть штаммов, три из которых отнесены к *B. anthracis*, а остальные – к близкородственным бациллам. Показана принципиальная возможность использования данной комплексной методики для типизации сибиреязвенных штаммов и их дифференциации от близкородственных микроорганизмов.

Ключевые слова: почва, скотомогильники, *B. anthracis*, VNTR-анализ.

N.A.Shishkova, T.B.Kravchenko, L.I.Marinin, A.N.Mokrievich

Identification of *Bacillus anthracis* Isolated from Soil of the Animal Burial Site

State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

The usage of modern gene engineering methods makes it possible not only to identify anthrax strains isolated from soil, but also to hold out comparative molecular genetic assays with these strains. Carried out was the laboratory research of 80 soil samples isolated from the old animal burial site using microbiological and genetic techniques. Epidemiological significance of the isolated strains was evaluated on the basis of the results of PCR with species-specific primers and multi-locus VNTR-analysis data. Extracted were the six strains, three of which were classified as *B. anthracis*, and the rest – as closely related bacillus. Demonstrated was the possibility to use this particular complex method for anthrax strains typing and their differentiation from closely related microorganisms.

Key words: soil, animal burial sites, *B. anthracis*, VNTR-analysis.

Основным резервуаром возбудителя сибирской язвы и основным фактором, поддерживающим непрерывность эпизоотического процесса в очагах, является почва, которую можно считать вторым, после инфицированных животных, источником этого заболевания, поскольку доказана возможность заражения животных и людей непосредственно от почвы. В Российской Федерации насчитывается около 35 тыс. стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов с почвенными очагами, в которых учтено 7940 сибиреязвенных скотомогильников. На протяжении последних пяти лет на территории РФ зарегистрировано 43 случая заболевания людей сибирской язвой, из них 3 – с летальным исходом. К сожалению, на многих территориях до настоящего времени не налажен должный учет скотомогильников и контроль за их санитарным состоянием. Поэтому остается актуальной проблема выявления и мониторинга возникших в прошлом захоронений животных, погибших от сибирской язвы.

Выделенные из почвы сибиреязвенные штаммы часто имеют атипичные признаки, что затрудняет их идентификацию. Проведение ПЦР с соответствующими видоспецифическими праймерами дает возможность не только идентифицировать выделенные из почвы сибиреязвенные штаммы и оценить их эпидемиологическую опасность, но и провести сравнительные молекулярно-генетические исследования. Использование метода мультилокусного определения

вариабельного числа tandemных повторов (VNTR) позволяет обнаружить значительное внутривидовое разнообразие возбудителя сибирской язвы, считавшегося ранее мономорфным.

Целью работы являлась оценка возможности использования, наряду с классическими микробиологическими методами, современных генетических подходов с применением ПЦР с видоспецифическими праймерами [8] и многолокусного VNTR-анализа [7] для типизации и дифференциации штаммов, выделенных из почвы старого скотомогильника.

Материалы и методы

Работа проведена на 18 штаммах из Коллекции микроорганизмов ФГУН ГНЦ ПМБ: *B. anthracis* 71/12 (2-я вакцина Ценковского); СТИ-1; СТИ-RIF4; 1 Коломна; 81/1; 10; 32 (603); 193 Куба II; Dakar; *B. subtilis* 168; *B. subtilis* var. niger; *B. thuringiensis* 1373; *B. megaterium* 1433; *B. brevis* 1409; *B. cereus* 217 (*anthracoides*); *B. cereus* 164; *B. cereus* 504; *B. polymixa*.

Исследованы пробы почвы, взятые из старого скотомогильника (захоронению более 70 лет), находящегося в Тверской области. Исследуемый участок разделили на квадраты и отобрали в целом 80 проб земли. Диагностические исследования проб почвы проводились в соответствии с методическими указаниями по лабораторной диагностике и обнару-

жению возбудителя сибирской язвы [1]. Выделение штаммов проводили на высокочувствительной плотной питательной среде по Лурия-Бертани (LA) [3] с полимиксином В. Из почвы было выделено шесть изолятов, которые получили обозначения П-1, П-4о, П-4, П-4ш, П-4с и П-14. Штаммы культивировали при температуре 37 °С в жидкой и на плотной питательных средах.

Пробоподготовку и выделение ДНК проводили в соответствии с методическими указаниями «Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I–IV групп при работе методом ПЦР» [2]. Праймеры для определения величин *vrr*-фрагментов синтезированы на фирме Amersham. Прямые праймеры были мечены Su^{TM5} амидитом (Pharmacia, США). Видоспецифические праймеры для *B. anthracis* были синтезированы фирмой «Литех» (Москва). ПЦР проводили с использованием набора Ready-to-go-Beads (Amersham Pharmacia Biotech, США) на термоциклере Терцик (Москва). Для определения размеров ПЦР-ампликонов с видоспецифическими праймерами использовали стандартный способ оценки по показателю электрофоретической подвижности в геле агарозы (1,2 %) с последующим окрашиванием бромистым этидием или в полиакриламидном геле (6 %) с последующим окрашиванием серебром в сравнении с маркером молекулярных масс 100 bp. Определение нуклеотидных последовательностей и размеров фрагментов осуществляли на автоматическом секвенаторе ALFexpressII (Amersham Pharmacia Biotech, США) с использованием меченых Su^{TM5} амидитом праймеров.

При выполнении данных работ соблюдали требования безопасной работы, изложенные в Санитарно-эпидемиологических правилах «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» СП 1.3.1285-03.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований была проведена оценка культурально-морфологических свойств выделенных из почвы штаммов. По характеру роста в L-бульоне выделенные 6 штаммов бацилл можно было подразделить на три типа культур. Кроме того, были оценены способность штаммов к лизису специфическими сибиреязвенными бактериофагами

Гамма и КВИЭВ, чувствительность к ампициллину и гемолитическая активность [3]. Полученные характеристики выделенных штаммов представлены в табл. 1, из данных которой видно, что к типичным штаммам *B. anthracis* можно отнести только два из шести изолятов – штаммы П-1 и П-4о. Отсутствие капсулы при культивировании этих штаммов на бикарбонатно-сывороточном агаре, вероятно, связано с их частичной аттенуацией в процессе длительного нахождения в почве.

Далее было проведено выделение ДНК из исследуемых и контрольных штаммов и тестирование в ПЦР с набором праймеров *pag*, *lef*, *cya*, *cap*, *Ba 813*, комплементарных к выявленным локусам генома сибиреязвенного микроба по методу [6]. Для сравнения исследовали штаммы *B. anthracis* с различными гено- и фенотипами (81/1; 71/12; СТИ-1; СТИ-RIF4; 1; 10; 32; 193; Dakar) и 9 штаммов близкородственных бацилл. Результаты представлены в табл. 2.

Как следует из приведенных в табл. 2 результатов, только два из шести выделенных штаммов являются «полноценными» *B. anthracis* в генетическом отношении – это штаммы П-1 и П-4о (в ПЦР выявлены все пять видоспецифических ПЦР-фрагментов *pag*, *lef*, *cya*, *cap*, *Ba 813*), что согласуется с характеристиками выделенных штаммов, приведенными выше. Штамм П-4 можно отнести к атипичному бескапсульному варианту *B. anthracis*, сходному с атипичными штаммами *B. anthracis* 10, 32, 193 и Dakar, также дефектными по гену отечного фактора. Штаммы П-4с, П-4ш и П-14 несли только один хромосомный маркер *Ba 813*, который обнаруживается и у *B. cereus*, следовательно, их можно отнести к близкородственным штаммам.

Дополнительно с помощью иммуноблоттинга с кроличьими моноспецифическими сыворотками, полученными нами ранее к отдельным компонентам сибиреязвенного токсина, изучены спектры секретируемых почвенными штаммами белков (данные не приведены). Показано, что все три компонента токсина синтезируются только штаммами П-1 и П-4о, что подтверждает данные ПЦР.

Для генотипирования выделенных почвенных штаммов нами был использован метод многолокусного VNTR-типирования с использованием шести хромосомных *vrrA*, *vrrB1*, *vrrB2*, *vrrC1*, *vrrC2* и *cg3* и двух плазмидных маркеров *pXO1* и *pXO2*

Таблица 1

Свойства штаммов бацилл, выделенных из почвы скотомогильника

Штамм	Свойства штаммов					
	Проба с фагами Гамма и КВИЭВ	Зона ингибирования на среде с ампициллином, мм	Гемолиз на кровяном агаре	Проба с гамма-глобулином	Морфология колоний на бикарбонатно-сывороточной среде	Рост в L-бульоне
П-1	+	22	-	+	Шероховатые	Типичный рост
П-4о	+	10	-	+	Шероховатые	Типичный рост
П-4	+	3	+	±	Шероховатые	Осадок, бульон мутный
П-4ш	-	0	+	-	Шероховатые	Осадок, бульон мутный
П-4с	-	0	+	-	Шероховатые	Осадок, бульон мутный
П-14	-	0	+	-	Шероховатые	Осадок, бульон прозрачный

Таблица 2

Результаты постановки ПЦР с ДНК некоторых штаммов бацилл

Штамм	Праймер				
	Ba 813 152 п.н.	cap 264 п.н.	lef 385 п.н.	суа 546 п.н.	pag 747 п.н.
П-1	+	+	+	+	+
П-4о	+	+	+	+	+
П-4	+	-	+	-	+
П-4ш	+	-	-	-	-
П-4с	+	-	-	-	-
П-14	+	-	-	-	-
<i>B. anthracis</i> 81/1	+	+	+	+	+
<i>B. anthracis</i> 71/12	+	+	+	+	+
<i>B. anthracis</i> СТИ-1	+	-	+	+	+
<i>B. anthracis</i> СТИ Rif4	+	-	-	-	-
<i>B. anthracis</i> 10 – атипичный	+	-	+	-	+
<i>B. anthracis</i> 32 – атипичный	+	-	+	-	+
<i>B. anthracis</i> 193 – атипичный	+	-	+	-	+
<i>B. anthracis</i> Dakar	+	-	+	-	+
<i>B. cereus</i> 504	+	-	-	-	-
<i>B. cereus</i> 217 (anthracoides)	+	-	-	-	-
<i>B. cereus</i> 164	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> 168	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> var. niger	-	-	-	-	-
<i>B. thuringiensis</i>	-	-	-	-	-
<i>B. brevis</i>	-	-	-	-	-
<i>B. polymixa</i>	-	-	-	-	-
<i>B. megaterium</i>	-	-	-	-	-

[7]. Результаты определения величин варьируемых фрагментов по этим локусам приведены в табл. 3.

Из представленных данных видно, что выделенные из почвы штаммы П-1 и П-4о с типичными культурально-морфологическими признаками, чувствительные к ампициллину и сибирезавенному

бактериофагу и являющиеся типичными штаммами *B. anthracis* по результатам ПЦР с видоспецифическими праймерами, укладываются также в схему VNTR-типирования, разработанную для *B. anthracis*. Полученные значения величин фрагментов по 8 локусам позволяют отнести штаммы П-1 и П-4о к подгруппе *B. anthracis* A3. Следовательно, из почвы старого скотомогильника нами выделены два типичных эпидемически значимых штамма *B. anthracis*, несущих генетические элементы, кодирующие синтез компонентов токсина и капсулы.

Штамм П-4, отличающийся по ряду признаков от типового, а именно, по характеру роста в жидкой питательной среде, гемолизу эритроцитов и слабостью чувствительности к ампициллину, имеет шесть из восьми совпадающих с известными величинами VNTR-локусов, в частности, *vrrA*, *vrrB1*, *vrrB2*, *vrrC2*, *cg3*, *pXO1*. Поскольку не амплифицировались фрагменты, соответствующие локусу *VrrC1* и капсуле, то отнести штамм П-4 к какой-либо VNTR-подгруппе оказалось невозможным. Следовательно, нами выделен ранее не охарактеризованный атипичный штамм *B. anthracis*, не представляющий эпидемической опасности, но требующий дальнейшего детального изучения.

Для остальных штаммов (П-4ш, П-4с и П-14) по величинам *vrr*-локусов получена картина, сходная с таковой для штамма *B. cereus* 504. Для уточнения полученных данных нами специально был отсеквенирован *pXO1*-фрагмент штамма *B. cereus* 504. Ниже приведены результаты (шрифтом выделены прямой и обратный праймеры, а повторяющиеся последовательности – курсивом).

B. cereus 504 – *pXO1* – 129

CAATTATTAACGATCAGATTAAGTTCA
TTATTAACATCATAAGTAATGTATTAATAAAT
TTTCAAATGGATT
AAT AAT AAT AAT AAT AAT AAT
AACGGGACCAGCCATTATGAAGCAACATAAT
CTAGA

Таблица 3

Величины фрагментов *vrr*-областей штаммов, выделенных из сибирезавенного скотомогильника

Штамм	<i>vrrA</i>	<i>vrrB1</i>	<i>vrrB2</i>	<i>vrrC1</i>	<i>vrrC2</i>	<i>cg3</i>	<i>pXO1</i>	<i>pXO2</i>
<i>B. anthracis</i> 81/1	313	230	161	609	600	152	135	136
<i>B. anthracis</i> 1	324	230	162	617	601	153	136	137
<i>B. anthracis</i> 71/12	315	230	161	611	527	153	135	136
<i>B. anthracis</i> СТИ-1	316	229	162	613	602	153	133	136
<i>B. anthracis</i> 10 *	315	230	160	613	599	156	136	136
<i>B. anthracis</i> Dakar	298	229	161	496	472	156	134	144
<i>B. anthracis</i> 32 *	312	230	161	-	528	155	133	136
<i>B. anthracis</i> 193 *	310	229	163	673	585	-	-	136
П-1	313	228	164	613	532	153	133	135
П-4о	315	228	161	611	533	153	130	136
П-4	313	229	161	-	533	154	133	-
П-4ш	278	264	-	-	336	-	-	-
П-4с	285	264	163	-	312	-	-	-
П-14	294	265	164	-	324	-	-	-
<i>B. cereus</i> 504	282	266	164	-	308	-	130	-

*Атипичные штаммы.

Результаты сиквенса фрагмента ДНК *B. cereus* полностью укладываются в классификацию, предложенную Р.Keim и соавт. для *B. anthracis* [7]. Это может быть связано с очень высокой степенью гомологии генома, что отражает недавнюю эволюцию *B. anthracis* от родительской субгруппы *B. cereus* [6]. Показано, что некоторые изоляты *B. cereus* содержат последовательности, сходные более чем с половиной последовательностей открытых рамок считывания плазмиды pXO1 *B. anthracis*, причем основная часть ДНК-фрагментов *B. cereus* имела сходство от 80 до 98 %.

Совпадение данных по локусам *vggB2* и pXO1 *B. anthracis* и *B. cereus* значительно затруднило однозначную дифференциацию этих видов, тем не менее, поскольку по всем остальным локусам имелись значительные отличия от *B. anthracis*, штаммы П-4ш, П-4с и П-14 с большой степенью вероятности можно отнести к *B. cereus*.

Это – еще одно свидетельство сложности процесса дифференциации бациллярных штаммов. С целью повышения эффективности типирования бацилл в настоящее время предлагаются различные комбинации методов в зависимости от поставленных задач, но, вследствие высокой генетической мономорфности сибиреязвенного микроба, мультилокусный VNTR-анализ может оказаться наиболее приемлемым для типирования *B. anthracis* [4, 5].

Оценивая полученные данные по идентификации выделенных из старого скотомогильника бацилл, можно сделать вывод о том, что для точного подтверждения выделения возбудителя сибирской язвы по-прежнему необходимо проведение комплексных исследований – микробиологических, иммунобиологических и молекулярно-генетических. Микробиологический анализ показал присутствие в почве скотомогильника двух культур *B. anthracis*, обладающих всеми типичными для возбудителя сибирской язвы характеристиками. Эти данные были подтверждены результатами ПЦР с пятью праймерами к *pag*, *lef*, *суа*, *cap*, *Ba 813*, разработанными для генома сибиреязвенного микроба.

Дополнительные исследования выделенных штаммов с использованием мультилокусного VNTR-анализа позволили отнести выделенные штаммы П-1 и П-4о к подгруппе *B. anthracis* A3, выявить ранее не охарактеризованный атипичный штамм *B. anthracis* П-4, и предварительно отнести выделенные штаммы П-4ш, П-4с и П-14 с нетипичными для сибиреязвенного микроба свойствами к *B. cereus*.

Таким образом, нами показана принципиальная возможность использования комплексной методики

для типизации сибиреязвенных штаммов и их дифференциации от близкородственных микроорганизмов.

Работа выполнена по государственным контрактам Ф/2/09 от 09.07.2009 г. и 119-Д от 11.06.2009 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности (2009–2013 гг.)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы. Методические указания. МУК 4.2.2413-08. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2009. 67 с.
2. Обеззараживание исследуемого материала, инфицированного бактериями I–IV групп при работе методом ПЦР. Методические указания. МУ 3.5.5.-1034-01. М.: МЗ РФ; 2001. 8 с.
3. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Мокриевич А.Н., Бахтеева И.В., Белова Е.В., Борзилов А.И. и др. Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы. М.: ЗАО МП «Гигиена»; 2009. 304 с.
4. Кутырев В.В., Смирнова Н.И. Генодиагностика и молекулярное типирование возбудителей чумы, холеры и сибирской язвы. Мол. генет., микробиол., вирусол. 2003; 1:6–14.
5. Цыганкова О.И., Еременко Е.И., Цыганкова Е.А. и др. Фенотипические и генетические особенности культурально-морфологических вариантов *Bacillus anthracis* Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2008; 4:6–11.
6. Helgaso E., Okstad O.A., Caugant D.A., Johansen H.A., Fouet A., Mock M. et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*: one species on the basis of genetic evidence. Appl. Environ. Microbiol. 2000; 66:2627–30.
7. Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K.L., Schupp J.M., Okinaka R. et al. Multiple-locus VNTR analysis (MLVA) reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. 2000; 182:2928–36.
8. Patra G., Sylverste P., Ramisse V. et al. Specific oligonucleotide primers for rapid identification of *Bacillus anthracis* strains. Proc. Inter. Workshop on Anthrax. Winchester, England, September 19–21, 1996. P. 45–6.

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

1. [Laboratory diagnostics and detection of *Bacillus anthracis*. Methodological instructive regulations. MIR 4.2.2413-08]. M.: State Rosпотребнадzor Centre of Hygiene and Epidemiology; 2009. 67 p.
2. [Decontamination of the test material, infected by the bacteria of the I–IV groups, while using PCR-based methods. Methodological instructive regulations. MIR 3.5.5-1034-01]. M.: Ministry of Health of the Russian Federation; 2001. 8 p.
3. Marinin L.I., Dyatlov I.A., Mokrievich A.N., Bakhteeva I.V., Belova E.V., Borzilov A.I. et al. [Methods for examination of *Bacillus anthracis* biological properties]. M.: ZAO MP "Gigiena"; 2009. 304 p.
4. Kutyrev V.V., Smirnova N.I. [Gene diagnostics and molecular typing of etiological agents of plague, cholera, and anthrax]. Mol. Gen. Microbiol. Virusol. 2003; 1:6–14.
5. Tsygankova O.I., Eremenko E.I., Tsygankova E.A. et al. [Phenotypic and genetic peculiarities of the cultural and morphologic *Bacillus anthracis* variants]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2008; 4:6–11.

Authors:

Shishkova N.A., Kravchenko T.B., Marinin L.I., Mokrievich A.N. State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

Об авторах:

Шишкова Н.А., Кравченко Т.Б., Маринин Л.И., Мокриевич А.Н. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Московская обл., п. Оболensk, E-mail: info@obolensk.org

Поступила 22.04.11.

Н.М.Зубавичене, В.В.Золин, Е.А.Ставский**ЛИПОСОМАЛЬНЫЕ И СУСПЕНЗИОННЫЕ ФОРМЫ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ПРОТИВ ЛИХОРАДКИ ЭБОЛА КАК НОВЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ***ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово*

В статье приведены результаты исследования терапевтической эффективности липосомального и суспензионного иммуноглобулинов, приготовленных на основе 10 % козьего иммуноглобулина против лихорадки Эбола. Установлено, что наибольший лечебно-профилактический эффект при экспериментальной лихорадке Эбола на морских свинках был достигнут при двукратном введении суспензионного иммуноглобулина против лихорадки Эбола. Отмечено увеличение инкубационного периода в 2 раза, 37,5 % инфицированных животных выжило. Полученные результаты делают перспективной дальнейшую разработку новых иммуноглобулиновых препаратов различных классов на основе липосом и наноземульсий.

Ключевые слова: лихорадка Эбола, специфический иммуноглобулин, экспериментальная инфекция, морские свинки, липосомы, наноземульсия.

N.M.Zubavichene, V.V.Zolin, E.A.Stavsky**Liposomal and Suspension Forms of Immunoglobulins Against Ebola Fever as the New Medical Preparations***State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo*

Presented are the results of investigation of therapeutic effectiveness of liposomal and suspension forms of immunoglobulins, prepared on the basis of 10 % goat immunoglobulin against Ebola fever. The most pronounced therapeutic and preventive effect on guinea pigs with experimental Ebola fever was achieved by double administration of suspended immunoglobulin against Ebola fever. The incubation period increased twofold, 37,5 % of infected animals survived. The results achieved are perspective for further development of new immunoglobulin preparations on the basis of liposomes and nanoemulsions.

Key words: Ebola fever, specific immunoglobulin, experimental infection, guinea pigs, liposomes, nanoemulsion.

Расширение ареалов обитания и миграции населения, усиление товарообмена с африканскими странами, контрабандный ввоз в страну экзотических животных, возможность использования возбудителя лихорадки Эбола (особенностью которого являются высокая контагиозность в сочетании с высочайшей летальностью) в качестве потенциального агента биотерроризма делают необходимой разработку эффективных средств профилактики и лечения этого заболевания.

Сведения об успешном применении специфических иммуноглобулинов для лечения лихорадки Эбола у людей в литературе отсутствуют, хотя имеются сообщения о разработке специфических гетерологичных (лошадиных, козьих) иммуноглобулинов [1, 13, 14]. Однако, являясь гетерологичными, эти иммуноглобулины могут обладать рядом побочных нежелательных эффектов [5, 14]. При этом максимальная концентрация иммуноглобулинов в крови достигается в первые 48 ч после введения, а около 50 % введенного препарата остается в мышцах в месте введения и там же разрушается. Одним из перспективных направлений снижения системной токсичности, повышения биодоступности и, как следствие, увеличения терапевтической эффективности лекарств в современной нанобиотехнологии

является создание их липосомальных форм [4, 6, 7]. Липосомы изменяют фармакокинетику лекарственных веществ и вакцинных препаратов, повышая их терапевтическую эффективность, пролонгируют время действия лекарств в организме. Другим современным направлением разработки препаратов с применением нанотехнологий является получение наноземульсий биологически активных веществ на основе водно-масляной наноземульсии в соотношении 80 % жировых компонентов и 20 % воды, в состав которой входят соевое масло, три-н-бутил фосфат и Triton X-100 [12].

Материалы и методы

Иммуноглобулиновые препараты:

- липосомальный иммуноглобулин, приготовленный на основе 10 % козьего иммуноглобулина против лихорадки Эбола с индексом нейтрализации ($2,5 \pm 0,6$) Ig ЛД₅₀. Липосомы получали модифицированным методом экструзии мультиламеллярных везикул через поликарбонатные мембраны [4]. Эффективность включения белка в липосомы составила 30 %. Стерильность липосом контролировали стандартным методом [3].

- суспензионный иммуноглобулин – смесь, при-

готовленная на основе 10 % козьего иммуноглобулина против лихорадки Эбола с индексом нейтрализации ($2,5 \pm 0,6$) Ig ЛД₅₀ с водно-масляной наноэмульсией в пропорционном соотношении 80 % жировых компонентов и 20 % воды. В состав нано-эмульсии входят соевое масло, три-н-бутил фосфат и Triton X-100.

Вирусные препараты: вирус Эбола, вид Заир, штамм Заир К-5 (ВЭ), вирулентный для морских свинок, получен адаптацией штамма Заир Mayinga вируса Эбола к морским свинкам путем клонирования и последовательных пассажей на морских свинках [10, 11].

Животные: белые морские свинки, свободные от патогенной флоры, массой 250–300 г, 40 голов, полученные из питомника Charles River. Животных содержали на стандартном рационе. Все болезненные процедуры проводили под прикрытием эфирного наркоза. Уход за инфицированными животными и работа с ними осуществлялись в условиях инфекционного вивария с уровнем биобезопасности BSL-4 (работа персонала в защитных костюмах «Антибелок-5») с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Способ инфицирования: животных инфицировали внутрибрюшинно дозой 1,0 мл разведенной вирус-содержащей суспензии (10 % гомогенат печени морских свинок с исходной концентрацией $1 \cdot 10^6$ ЛД₅₀). Доза инфицирования – 30–50 ЛД₅₀.

Способ введения иммуноглобулиновых препаратов: липосомальный иммуноглобулин вводили однократно внутримышечно через 2 ч после инфицирования ВЭ и двукратно внутримышечно через 2 и 24 ч после инфицирования по 0,5 мл. Нано-иммуноглобулин вводили однократно внутримышечно через 2 ч после инфицирования и внутримышечно двукратно через 2 и 72 ч после инфицирования (в конце среднестатистического инкубационного периода) по 0,5 мл. В эксперименте использовали 5 групп животных по 8 голов в каждой.

В течение 21 сут (срок наблюдения) животных ежедневно осматривали, термометрировали, учитывали их гибель. Заболевшими считали морских свинок, у которых ректальная температура превышала 39,5 °С.

Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами [2].

Результаты и обсуждение

В ходе экспериментов установлено, что заболели 100 % инфицированных ВЭ животных (таблица). Помимо температурной реакции у больных животных были отмечены: взъерошенная шерсть, анорексия, адинамия, жидкий стул. Животные были вялыми, мало реагировали на посторонние вмешательства – не пытались уклониться от манипуляций экспериментатора (термометрирование, процедуры прижизненного интракардиального взятия крови).

Однократное введение липосомального иммуноглобулина через 2 ч после инфицирования морских свинок ВЭ увеличило инкубационный период на 3–4 сут по сравнению с контролем. При этом все остальные показатели у зараженных животных (продолжительность инкубационного и лихорадочного периода, средняя продолжительность заболевания) не отличались от контроля. Двукратное введение этого препарата приводило к достоверному увеличению инкубационного периода на 5–6 сут и сдвигу подъема температуры на 9–11-е сутки по сравнению с контрольной группой морских свинок. Продолжительность лихорадочного периода у животных во второй группе не отличалась от контроля. Кроме того, во второй группе отмечено достоверное увеличение средней продолжительности жизни у экспериментальных животных на 2 сут.

При однократном введении инфицированным морским свинкам суспензионного иммуноглобулина наблюдали двуволновое течение инфекции, инкубационный период увеличился на 6–10 сут по сравнению с контролем. При этом выжило 12,5 % животных. При двукратном введении морским свинкам суспензионного иммуноглобулина отмечен наибольший лечебно-профилактический эффект от применения препарата. Произошло достоверное увеличение инкубационного периода (в среднем, в 2 раза по сравнению с контролем). При этом 37,5 % заболевших животных выжило. В контрольной группе инфицированных животных длительность инкубационного периода, лихорадочного состояния и сроков гибели животных (таблица) с момента инфицирования не превысила обычных временных рамок, как было показано нами ранее [10, 11].

Факт удлинения инкубационного периода являет-

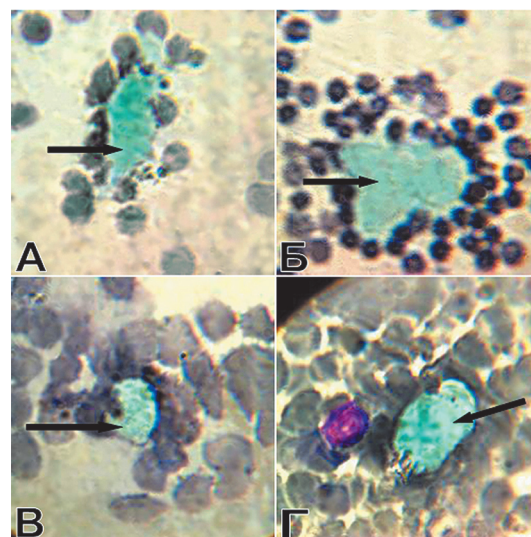
Показатели эффективности применения различных иммуноглобулиновых препаратов при введении инфицированным ВЭ животным

Показатель эффективности	Нелеченные морские свинки (контроль вируса)	Морские свинки, пролеченные разными препаратами иммуноглобулина			
		Липосомальный иммуноглобулин однократно	Липосомальный иммуноглобулин двукратно	Суспензионный иммуноглобулин однократно	Суспензионный иммуноглобулин двукратно
Количество заболевших, %	100	100	100	100	100
Количество выживших, %	0	0	0	12,5 %	37,7 %
Продолжительность инкубационного периода, сут	$3,8 \pm 1,2$	$5,7 \pm 1,4$	$9,7 \pm 0,9$	$10,2 \pm 4,1$	$12,1 \pm 2,4$
Продолжительность лихорадочного состояния, сут	$5,3 \pm 0,5$	$6,5 \pm 1,1$	$5,3 \pm 2,7$	$6,2 \pm 1,3$	$5,5 \pm 0,7$
Средняя продолжительность жизни до гибели, сут	$8,8 \pm 1,7$	$11,0 \pm 1,4$	$12,7 \pm 0,7$	$14,8 \pm 5,8$	$12,8 \pm 3,2$

ся интересным сам по себе. У данной инфекции, как и некоторых других, многими авторами отмечено укорочение инкубационного периода, утяжеление течения заболевания и ускорение гибели экспериментальных животных в случае применения низкотитражных сывороточных препаратов (иммуноглобулинов, гамма-глобулинов), либо низкотитражных гипериммунных сывороток. Следовательно, наши экспериментальные иммуноглобулины нельзя считать малоэффективными. В то же время не удалось получить значительный лечебный эффект при применении липосомального иммуноглобулина. Вероятной причиной может быть неправильно выбранная инфицирующая доза вируса 30–50 ЛД₅₀. Возможно, она была слишком большой. Известно, что эффективность применения лечебных иммуноглобулиновых препаратов ограничена инфицирующей дозой. Экспериментально установлено, лечебно-профилактический эффект от применения специфических иммуноглобулинов на лабораторных животных (морские свинки, приматы) удавалось получить при заражающей дозе 10–20 ЛД₅₀ [7, 9, 13].

Обнадеживающими являются удлинение инкубационного периода и увеличение средней продолжительности жизни, что создает предпосылки для применения других лечебных средств и процедур для борьбы с этим крайне тяжелым заболеванием.

В целом, из практики применения иммуноглобулиновых препаратов можно сделать вывод о получении, скорее, профилактического эффекта (например, при клещевом энцефалите), т.е. в случае успешного применения иммуноглобулинового препарата заболевание не развивается. Такой же эффект мы наблюдали ранее при изучении лечебно-профилактических свойств козьего IgG [5, 14]. Сходные результаты были получены при испытании лошадиного иммуноглобулина против болезни Эбола [8, 13]. В то же время нет упоминания о том, что лабораторные животные были инфицированы, заболели и были вылечены. Во всех ранее опубликованных статьях говорится о том, что инфицированным животным был введен препарат специфического иммуноглобулина через 2–4 ч после инфицирования, животное выжило, при этом у него не развилось заболевание. Тем более интересен полученный нами результат: в группах 3 и 4 инфицированные животные заболели, были пролечены и выжили. Можно предположить, что при введении суспензионного иммуноглобулина через 2 ч и в конце инкубационного периода мы обеспечили более длительное его циркулирование в кровяном русле, что привело к сдерживанию развития инфекционного процесса. Известно, что концентрация введенного лечебно-профилактического иммуноглобулина достигает максимальных значений через 48 ч после введения, после чего препарат начинает быстро разрушаться и выводиться из организма реципиента. Через 7 сут концентрация лечебно-профилактического иммуноглобулина в крови падает в 4–6 раз и через 14 сут определяется в следовых количествах. [5, 14]. Возможно, именно



Липосомы в крови морских свинок, инфицированных ВЭ: верхний ряд – 3-и сутки после введения липосомального иммуноглобулина, нижний ряд – 7-е сутки после введения липосомального иммуноглобулина. А, Б – группа агглютинированных липосом. В, Г – единичные липосомы. Увеличение $\times 1000$. Окраска Азур-II-эозином после обработки мазков парами формалина. Стрелкой показаны липосомы, окруженные эритроцитами

соединение гетерологичного иммуноглобулина с наноэмульсией, а также липосомальная форма иммуноглобулина обеспечивают пролонгацию циркуляции иммуноглобулинов в крови, обеспечивая тем самым более длительный лечебно-профилактический эффект. Косвенным подтверждением явления пролонгации может послужить факт, что при анализе мазков крови, полученных у инфицированных животных на 3-и и 7-е сутки с момента введения липосомального иммуноглобулина, видны образования, содержащие белок и имеющие кислую pH (рисунок).

Возможно, что мы наблюдаем липосомы с включенным в них иммуноглобулином. Мазки крови фиксировались формалином, при этом известно, что формалин хорошо сохраняет жиры и липоиды. Окрашивались мазки водными растворами азур-II-эозином (по Нохту), следовательно, липосомы не могли быть растворены спиртом, входящим в некоторые прописи стандартных гематологических красителей. Поэтому, несмотря на определенное воздействие фиксации и окраски, возможно, приведшие к некоему изменению формы, структуры и pH липосом, интересен и необычен сам факт обнаружения структур, похожих на конгломераты липосом, в мазках крови морских свинок в группе, получивших 2 инъекции липосомального иммуноглобулина и отсутствие подобных структур в крови животных из других групп. На всех фотографиях видно, что липосомы обладают аттрактантными свойствами для эритроцитов. Эритроциты образуют вокруг липосом кольца.

Таким образом, наибольший лечебно-профилактический эффект при экспериментальной лихорадке Эбола на морских свинках был достигнут при двукратном введении суспензионного иммуноглобулина

против лихорадки Эбола. Отмечено увеличение инкубационного периода в 2 раза, 37,5 % инфицированных животных выжило. При двукратном введении липосомального препарата иммуноглобулина отмечено достоверное удлинение инкубационного периода в 2 раза по сравнению с нелечеными животными. Полученные нами результаты делают перспективной дальнейшую разработку новых иммуноглобулинов различных классов на основе липосом и наноэмульсий, а также изучение возможностей применения таких препаратов для профилактики и лечения не только геморрагической лихорадки Эбола, но и других особо опасных вирусных инфекций.

Авторы выражают глубокую признательность д-ру James R. Baker, предоставившему нам препараты нано-эмульсии в рамках проекта МНТЦ № 1511, а также Дадаевой А.А. за микроскопию мазков крови, полученных в ходе проведения экспериментов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акинфеева Л.А., Аксёнова О.И., Василевич И.В. и др. Случай вирусной геморрагической лихорадки Эбола. Инф. бол. 2005; 1:85–8.
2. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.; 1962; 256 с.
3. Государственная фармакопея. Изд. IX. М.: Медгиз; 1961.
4. Золин В.В., Колокольцов А.А., Агафонова О.А., Бочкова Т.Г. Создание липосомального препарата, содержащего человеческий рекомбинантный альфа-2 интерферон. Вестник РАМН. 1999; 12:18–22.
5. Зубавичене Н.М., Дедкова Л.М., Сергеев Н.Н., Офицеров В.И. Сенсибилизирующие и вируснейтрализующие свойства козьих иммуноглобулинов против вируса Эбола. Вopr. вирусол. 2002; 2:45–8.
6. Каплун А.П., Шон Л.Б., Краснополянский Ю.М., Швеиц В.И. Липосомы и другие наночастицы как средство доставки лекарственных веществ. Вopr. мед. химии. 1999; 45(1):3–2.
7. Краснополянский Ю.М., Степанов А.Е., Швеиц В.И. Некоторые аспекты технологии получения липосомальных форм лекарственных препаратов. Химико-фармацевтический журн. 1999; 33(10):20–3.
8. Краснянский В.П., Михайлов В.В., Борисевич И.В. и др. Получение гипериммунной лошадиной сыворотки к вирусу Эбола. Вopr. вирусол. 1994; 2(40):91–2.
9. Маркин В.А., Михайлов В.В., Краснянский В.П. и др. Разработка принципов экстренной профилактики и лечения лихорадки Эбола. Вopr. вирусол. 1997; 1(42):31–4.

10. Chepurinov A.A., Zubavichene N.M., Dadaeva A.A. Influence of selective passages on the change in Ebola virus properties. Infect. Dis. Rev. 2001; Suppl. 3:30–6.
11. Chepurinov A.A., Zubavichene N.M., Dadaeva A.A. Elaboration of laboratory strains of Ebola virus and study of pathophysiological reactions of animals inoculated with these strains. Acta Trop. 2003; 87(3):321–9.
12. Hamouda T., Hayes M.M., Cao Z. et al. A novel surfactant nanoemulsion with broad-spectrum sporidical activity against *Bacillus* species. J. Infect. Dis. 1999; 180:1939–49.
13. Jahrling P.B., Geisbert J., Swarengen J.R. et al. Passive immunization of Ebola virus-infected Cynomolgus Monkeys with immunoglobulin from hyperimmune horses. Arch. Virol. 1996; Suppl. 11:135–40.
14. Kudoyarova-Zubavichene N.M., Sergeev N.N., Chepurinov A.A. et al. Preparation and use of hyperimmune serum for prophylaxis and therapy of Ebola virus infections. J. Infect. Dis. 1999; 179(Suppl. 1):218–23.

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

1. Akinfeeva L.A., Aksenova O.I., Vasilevich I.V. et al. [The case of Ebola haemorrhagic fever]. Inf. Bol. 2005; 1:85–8.
2. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical methods in microbiological investigations]. L.; 1962. 256 p.
3. State Pharmacopeia. Izd. IX. M.: Medgiz; 1961.
4. Zolin V.V., Kolokol'tsov A.A., Agafonova O.A., Bockova T.G. [Development of human liposomal recombinant alpha-2 interferon-containing preparation]. Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk. 1999; 12:18–22.
5. Zubavichene N.M., Dedkova L.M., Sergeev N.N., Ofitserov V.I. [Sensitizing and virus-neutralizing characteristics of goat immunoglobulins to Ebola virus]. Vopr. Virusol. 2002; 2:45–8.
6. Kaplun A.P., Son L.B., Krasnopolsky Yu.M., Shvets V.I. [Liposomes and other nanoparticles as drug delivery systems]. Vopr. Med. Khimii. 1999; 45(1):3–2.
7. Krasnopolsky Yu.M., Stepanov A.E., Shvets V.I. [Some technological aspects of liposomal medical preparations production]. Khimiko-Farmatsev. Zhurn. 1999; 33(10):20–3.
8. Krasnyansky V.P., Mikhailov V.V., Borisevich I.V. et al. [Obtaining of hyperimmune horse serum to Ebola virus]. Vopr. Virusolog. 1994; 2(40):91–2.
9. Markin V.A., Mikhailov V.V., Krasnyansky V.P. et al. [Development of principles for emergency prevention and treatment of Ebola fever]. Vopr. Virusol. 1997; 1(42):31–4.

Authors:

Zubavichene N.M., Zolin V.V., Stavsky E.A. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia.

Об авторах:

Зубавичене Н.М., Золин В.В., Ставский Е.А. ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Поступила 30.08.10.

Г.В.Куклина, О.О.Фоменков, Г.Д.Елагин, Д.А.Кутаев, Д.С.Янов, А.А.Кытманов, Н.В.Богачева,
Т.П.Воробьева, И.В.Дармов, Д.В.Печенкин

РАЗРАБОТКА ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* СЕРОГРУППЫ 1

Научно-исследовательский центр биологической защиты «33 Центрального научно-исследовательского
испытательного института Министерства обороны Российской Федерации», Киров

Разработана высокочувствительная и специфичная иммуноферментная тест-система, перспективная для обнаружения *L. pneumophila* серогруппы 1. Получены 3 стабильные гибридные клеточные линии, секретирующие моноклональные антитела к специфическим эпитопам липополисахаридного антигена *L. pneumophila* серогруппы 1. С использованием липополисахаридного антигена получены гипериммунные кроличьи сыворотки, характеризующиеся высокой специфической активностью и специфичностью.

Ключевые слова: легионеллез, липополисахаридный антиген, моно- и поликлональные антитела, иммуноферментный анализ.

G.V.Kuklina, O.O.Fomenkov, G.D.Elagin, D.A.Kutaev, D.S.Yanov, A.A.Kytmanov, N.V.Bogacheva,
T.P.Vorob'eva, I.V.Darmov, D.V.Pechenkin

Development of the Immuno-Enzyme Test-System for the Detection of *Legionella pneumophila*, Serogroup I

Research Centre of Biosecurity of the "33rd Central Research and Probation Institute of the Ministry of Defense
of the Russian Federation", Kirov

Developed is the highly sensitive and specific immuno-enzyme test-system, which is perspective for the detection of *L. pneumophila*, serogroup 1. Isolated are the three hybrid cell lines that secrete monoclonal antibodies to specific epitopes of *L. pneumophila*, serogroup 1 lipopolysaccharide antigen. Hyper immune rabbit sera, characterized by highly specific activity and specificity, are obtained using lipopolysaccharide antigen.

Key words: legionellosis, lipopolysaccharide antigen, mono- and polyclonal antibodies, enzyme immunoassay.

Болезнь легионеров – острое инфекционное заболевание, вызываемое группой микроорганизмов, относящихся к семейству *Legionellaceae*, характеризующееся воздушно-капельным механизмом передачи возбудителя и протекающее в виде лихорадки с поражением верхних и нижних дыхательных путей [2, 4].

Ежегодно в мире регистрируется от 10 до 25 тыс. случаев заболевания легионеллезом, из которых до 20 % заканчиваются летально. Болезнь распространена повсеместно, наибольшее количество случаев выявляется в странах Европы и США, и часто носят эпидемический характер [1, 3]. В Российской Федерации легионеллез регистрируется на уровне от 10 до 30 sporadic и отдельных групповых вспышек в год. Однако данная инфекция может составлять до 14 % в этиологической структуре всех пневмоний [4]. В связи со сходством клинических проявлений легионеллезной и пневмококковой пневмонии, быстрая и эффективная лабораторная диагностика приобретает решающее значение для выбора тактики этиотропной терапии больных и проведения противоэпидемических мероприятий в очаге.

Наиболее распространенными источниками заражения легионеллезом являются колонизированные возбудителем искусственные водные системы, к которым относятся системы горячего и холодного водоснабжения, централизованные системы кондиционирования воздуха с водным охлаждением, градирни

и т.д. В таких системах происходит накопление легионелл в высоких концентрациях и создаются условия для образования в воздухе мелкодисперсного бактериального аэрозоля, что приводит к риску эпидемического распространения возбудителя. Это обстоятельство предопределяет актуальность контроля концентрации легионелл в этих системах [4].

На сегодняшний день известно 50 видов легионелл, для 22 из которых показана роль в инфекционной патологии человека. Однако более 95 % случаев заболевания легионеллезом связаны с видом *L. pneumophila*, который представлен 16 серогруппами. При этом более 80 % случаев заболевания связаны со штаммами серогруппы 1. Необходимо отметить, что летальные исходы при легионеллезной инфекции также преимущественно ассоциированы с первой серогруппой данного вида возбудителя [4].

Таким образом, выявление *L. pneumophila* серогруппы 1 является актуальной задачей, для решения которой с успехом могут быть использованы такие общепринятые современные средства быстрого обнаружения микроорганизмов, как иммуноферментные тест-системы.

Целью работы явилось получение специфических легионеллезных моно- и поликлональных антител и разработка на их основе иммуноферментной тест-системы для обнаружения легионеллезного микроба серогруппы 1.

Материалы и методы

Липополисахаридный антиген, используемый для иммунизации животных и сенсибилизации планшето, получали из биомассы микробной культуры *L. pneumophila* штамма *Philadelphia-1*, выращенной на угольно-дрожжевом агаре в течение трех суток при температуре 37 °С. За основу получения антигенного препарата была взята методика Jonson W. и соавт. [7]. Исследование специфической активности полученного антигенного препарата проводили в реакции диффузионной преципитации (РДП) [4] с монорецепторной кроличьей сывороткой против *L. pneumophila* серогруппы 1.

С целью получения гипериммунных кроличьих сывороток к липополисахаридному антигену было использовано 5 кроликов. Животных иммунизировали путем подкожного и внутривенного введения антигенного препарата по модифицированной нами схеме, состоящей из четырех этапов. Изучение динамики титров антител в сыворотке крови животных проводили с использованием «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Специфическую активность и специфичность полученных сывороточных препаратов оценивали в ИФА с близкородственными легионеллами (*L. pneumophila* серогрупп 2, 3, 5 и 6, *Legionella micdadei*, *Legionella bozemanii*, *Legionella dumoffii* и рядом гетерологичных микроорганизмов (*Yersinia pestis*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*).

С целью получения гибридом-продуцентов моноклональных антител (МКАт) к специфическим эпитопам *L. pneumophila* серогруппы 1 иммунизацию мышей линии *BALB/c* проводили путем подкожного введения возрастающих доз инактивированной микробной культуры *L. pneumophila* штамма *Philadelphia-1*.

Гибридизацию спленоцитов иммунизированных мышей с клетками миеломы *SP2/0-Ag-14* осуществляли на четвертые сутки после заключительной иммунизации с использованием 50 % раствора полиэтиленгликоля (ПЭГ 1560 «Sigma», США) по общепринятой методике [6].

Скрининг первичных гибридных клонов с использованием поверхностного липополисахаридного антигена проводили, начиная с 10-х суток культивирования трижды с интервалом 2–3 дня, а скрининг антителопродуцирующих гибридных линий – на 12-е сутки после клонирования. Второе и третье тестирование всех первично-позитивных культур проводили, кроме того, с использованием вышеперечисленных близкородственных легионелл и гетерологичных микроорганизмов.

Для получения асцитической жидкости мышам линии *BALB/c* интраперитонеально вводили сначала по 0,3 мл пристана («Sigma», США), а через 14 сут – от 2 до 4 млн гибридных клеток. Полученные асци-

тические жидкости исследовали в ИФА.

Планшеты для постановки ИФА сенсибилизировали липополисахаридным антигеном в концентрации 2 мкг/мл, а также вышеперечисленными близкородственными легионеллами и гетерологичными микроорганизмами в концентрации 100 млн м.к./мл. Кроличьи сыворотки титровали двукратным шагом с разведения 1:100 до 1:409600, культуральную и асцитическую жидкости – с 1:5000 до 1:5120000. Антивидовые конъюгаты против IgG кролика и IgG мыши («Sigma», США) применяли в рабочем разведении. В качестве субстрата использовали о-фенилендиамин («Sigma», США). Оптическую плотность субстратно-индикаторной смеси измеряли на фотометре Multiscan («Thermo Scientific», США) при длине волны 492 нм.

Выделение иммуноглобулинов из асцитических жидкостей мышей и гипериммунных сывороток кроликов осуществляли двукратным осаждением насыщенным раствором сульфата аммония с последующей очисткой препаратов моно- и поликлональных антител путем ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефацелле («Sigma», США).

Синтез конъюгатов легионеллезных моно- и поликлональных антител с пероксидазой хрена («Sigma», США) проводили с использованием перйодатного окисления [8]. Рабочее разведение иммунпероксидазных конъюгатов определяли методом «шахматного» титрования.

Для определения оптимальной сенсибилизирующей дозы поликлональных антител в лунки 96-луночного планшета вносили раствор иммуноглобулинов в концентрации от 0,062 до 40 мкг/мл белка в 0,05 М карбонатно-бикарбонатном буферном растворе. Планшеты инкубировали в течение 1 ч при температуре 37 °С.

Лиофилизацию иммунологически активных компонентов тест-системы осуществляли в защитной среде высушивания, содержащей 7,5 % сахарозы, в течение (20±1) ч.

Экспериментальное исследование чувствительности сконструированной тест-системы проводили с использованием штаммов *L. pneumophila* серогруппы 1. Изучение специфичности тест-системы проводили в отношении близкородственных легионелл, а также ряда гетерологичных микроорганизмов.

Результаты и обсуждение

Полученные препараты липополисахаридного антигена в РДП с легионеллезной монорецепторной кроличьей сывороткой формировали линии преципитации при разведении от 1:16 до 1:64.

В опыте по получению гипериммунных кроличьих сывороток после первых трех этапов наблюдалась положительная динамика накопления сывороточных антител к липополисахаридному антигену. Четвертый этап характеризовался незначительной сероконверсией. В результате были получены сывороточные препараты, характеризующиеся высоким

Таблица 1

Чувствительность ИФА при выявлении *L. pneumophila* штамма *Philadelphia-1* в условиях постановки реакций с использованием разных комбинаций специфических моно- и поликлональных антител

Антитела, используемые в качестве сенсирина	Чувствительность ИФА при выявлении <i>L. pneumophila</i> штамма <i>Philadelphia-1</i> с использованием иммунопероксидазного конъюгата, приготовленного на основе препарата, м.к./мл ($X_{\text{геом}} \times \text{antilg } I_{95, \text{lg}}$)				
	МКАт гибридной клеточной линии			поликлональных антител	
	149Н7В1	147Е5А10	142Н12В7		
МКАт гибридной клеточной линии	149Н7В1	Н	$8,57 \cdot 10^5 \pm 1,35$	$2,99 \cdot 10^6 \pm 1,22$	$7,21 \cdot 10^5 \pm 1,65$
	147Е5А10	$8,28 \cdot 10^5 \pm 1,80$	Н	$1,75 \cdot 10^6 \pm 1,26$	$1,00 \cdot 10^5 \pm 1,11$
	142Н12В7	$3,10 \cdot 10^6 \pm 1,08$	$1,60 \cdot 10^6 \pm 1,18$	Н	$1,84 \cdot 10^6 \pm 1,29$
Поликлональные		$7,73 \cdot 10^5 \pm 1,66$	$0,97 \cdot 10^5 \pm 1,05$	$1,71 \cdot 10^6 \pm 1,22$	$3,73 \cdot 10^5 \pm 1,34$

Примечание. Н – невозможно выявление *L. pneumophila* штамма *Philadelphia-1* при данном сочетании; во всех случаях $n=20$.

уровнем титров антител к иммуногену (от 1:102400 до 1:409600). При исследовании полученных сывороток методом ИФА с культурами близкородственных легионелл и гетерологичных микроорганизмов перекрестных реакций не выявлено.

В результате трех опытов по слиянию иммунных спленоцитов и миеломных клеток получено 98 первично-позитивных культур, продуцирующих МКАт к липополисахаридному антигену и не взаимодействующих с гетерологичными микроорганизмами. С целью отбора наиболее перспективных для клонирования первично-позитивных культур оценивали морфологию растущих гибридных клеток, их пролиферативную активность, а также способность сохранять высокий уровень синтеза специфических моноклональных антител. В итоге были отобраны 10 первично-позитивных культур, которые подвергли клонированию методом лимитирующих разведений. По результатам оценки пролиферативной активности и стабильности антителопродукции отобраны 9 гибридом, которые затем были использованы для работы МКАт *in vivo*.

По результатам ИФА, наиболее выраженный уровень продукции МКАт в титрах от 1:640000 до 1:2560000 был отмечен у трех гибридных клеточных линий: 149Н7В1, 147Е5А10, 142Н12В7, которые характеризовались высокой стабильностью своих основных свойств в процессе культивирования *in vivo*.

С целью выбора препаратов моно- и поликлональных антител, обеспечивающих наиболее высокую эффективность иммуноферментных реакций, направленных на выявление *L. pneumophila* серогруппы 1, опробованы в качестве сенсирина и основы для приготовления иммунопероксидазных конъюгатов различные комбинации специфических моно- и поликлональных антител (табл. 1).

Результаты ИФА были отрицательными при использовании в качестве сенсирина и основы иммунопероксидазного конъюгата МКАт одной гибридомы, что можно объяснить однозпитопной направленностью антител. Высокая чувствительность ИФА к *L. pneumophila* штамма *Philadelphia-1* обеспечивается при сочетании поликлональных антител в качестве сенсирина и МКАт, продуцируемых гибридомой 147Е5А10, как основы для иммунопероксидазного конъюгата. Таким образом, при конструировании

тест-системы были использованы поликлональные антитела в качестве сенсирина и меченные пероксидазой МКАт гибридной клеточной линии 147Е5А10.

В результате оценки влияния сенсибилизирующей дозы поликлональных антител на чувствительность и воспроизводимость ИФА установлено, что полный уровень сенсибилизации планшета в течение 1 ч при температуре 37 °С обеспечивается при концентрации иммуноглобулинов 10 мкг/мл. Увеличение концентрации антител до 40 мкг/мл к повышению чувствительности не приводило, а применение иммуноглобулинов в концентрации 5 мкг/мл и менее не обеспечивало воспроизводимости ИФА.

Исследование чувствительности и специфичности сконструированной иммуноферментной тест-системы показало, что препарат обеспечивал выявление штаммов *L. pneumophila* серогруппы 1 в концентрации 100 тыс м.к./мл, а также не давал ложных положительных результатов при исследовании близкородственных легионелл и ряда гетерологичных микроорганизмов в концентрации 100 млн м.к./мл (табл. 2).

Таблица 2

Чувствительность и специфичность иммуноферментной тест-системы для обнаружения *L. pneumophila* серогруппы 1

Вид (серогруппа) микроорганизма	Количество исследованных штаммов	Определяемая концентрация, м.к./мл	Количество выявляемых штаммов
<i>L. pneumophila</i> (1)	5	$1 \cdot 10^5$	5
<i>L. pneumophila</i> (2)	1	$1 \cdot 10^8$	-
<i>L. pneumophila</i> (3)	1	То же	-
<i>L. pneumophila</i> (5)	1	»	-
<i>L. pneumophila</i> (6)	1	»	-
<i>L. micdadei</i>	1	»	-
<i>L. bozemanii</i>	1	»	-
<i>L. dumoffii</i>	1	»	-
<i>Y. pestis</i>	3	»	-
<i>B. anthracis</i>	1	»	-
<i>F. tularensis</i>	3	»	-
<i>B. abortus</i>	2	»	-
<i>B. mallei</i>	1	»	-
<i>B. pseudomallei</i>	1	»	-
<i>V. cholerae</i>	1	»	-
<i>E. coli</i>	1	»	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	6	»	-
<i>Y. enterocolitica</i>	3	»	-

Таким образом, получены 3 гибридные клеточные линии МКАт к специфическим эпитопам липополисахаридного антигена *L. pneumophila* серогруппы 1, сохраняющих высокую стабильность основных свойств при культивировании *in vivo*. Разработана методика получения высокоактивной и специфичной гипериммунной кроличьей сыворотки против липополисахаридного антигена *L. pneumophila* штамма *Philadelphia-1*. Приготовлены препараты специфических легионеллезных моно- и поликлональных антител, и на их основе разработана высокочувствительная и специфичная иммуоферментная тест-система, перспективная для обнаружения *L. pneumophila* серогруппы 1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: Медицина; 2009. 472 с.
2. Прозоровский С.В., Покровский В.И., Тартаковский И.С. Болезнь легионеров (легионеллез). М.: Медицина; 1984. 207 с.
3. Тартаковский И.С. Болезнь легионеров. Легионеллез – прошлое, настоящее, будущее. Медицина для всех. 2000; 2:23–5.
4. Темежникова Н.Д., Тартаковский И.С. Легионеллезная инфекция. М.: Медицина; 2007. 264 с.
5. Фримель Г. Иммунологические методы. М.: Медицина; 1987. 472 с.
6. Galfre G., Howe S.C., Milstein C., Butcher G.W., Howard J.C. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hy-

brid cell lines. Nature. 1977; 266(5602):550–2.

7. Johnson W., Pesanti E., Elliott J.A. Serospecificity and opsonic activity of antisera to *Legionella pneumophila*. Infect. Immun. 1979; 26:698–704.

8. Nacane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. J. Histochem. Cytochem. 1974; 22(12):1084–91.

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

1. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Guidelines]. M.: Meditsina; 2009. 472 p.
2. Prozorovsky S.V., Pokrovsky V.I., Tartakovsky I.S. [Legionnaires Disease (Legionellosis)]. M.: Meditsina; 1984. 207 p.
3. Tartakovsky I.S. [Legionnaires Disease. Legionellosis – Past, Present, and Future]. Meditsina dlya vseh. 2000; 2:23–5.
4. Temezhnikova N.D., Tartakovsky I.S. [Legionellosis Infection]. M.: Meditsina; 2007. 264 p.
5. Frimel' G. [Immunologic Methods]. M.: Meditsina; 1987. 472 p.

Authors:

Kuklina G.V., Fomenkov O.O., Elagin G.D., Kutaev D.A., Yanov D.S., Kytmanov A.A., Bogacheva N.V., Vorob'eva T.P., Darmov I.V., Pechenkin D.V. Research Centre of Biosecurity of the “33rd Central Research and Probation Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation”. Kirov, Russia.

Об авторах:

Куклина Г.В., Фоменков О.О., Елагин Г.Д., Кутаев Д.А., Янов Д.С., Кытманов А.А., Богачева Н.В., Воробьева Т.П., Дармов И.В., Печенкин Д.В. Научно-исследовательский центр биологической защиты «33 Центрального научно-исследовательского испытательного института Министерства обороны Российской Федерации». Киров.

Поступила 29.04.11.

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

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ШТАММА *FRANCISELLA TULARENSIS* 15/10 С ДЕЛЕТИРОВАННЫМ ГЕНОМ *recA*

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

Делеция гена *recA* в геноме *Francisella tularensis* 15/10 приводит к повышению чувствительности к ультрафиолетовому облучению, снижению способности к гомологичной рекомбинации, незначительному снижению вирулентности для мышей. Эффективность размножения штамма *Francisella tularensis* 15/10 Δ *recA* в макрофагоподобных клетках, устойчивость к бактерицидному действию нормальной кроличьей сыворотки и протективные свойства на мышинной модели туляремии не изменились по сравнению с штаммом *Francisella tularensis* 15/10.

Ключевые слова: туляремийный вакцинный штамм, ген *recA*, рекомбинация, протективные свойства.

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

Immunobiological Properties of *Francisella tularensis* 15/10 Strain with Deleted *recA* Gene

State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

Deletion of *recA* gene in *Francisella tularensis* 15/10 genome leads to the increase in its sensitivity to ultraviolet irradiation, reduction of the homologous recombination capacity, and a slight decline of virulence for mice. Efficacy of *Francisella tularensis* 15/10 Δ *recA* reproduction within microphage-like cells, its resistance to normal rabbit serum, and protective properties on the mouse model of tularemia are the same as in original *Francisella tularensis* 15/10.

Key words: tularemia vaccine strain, *recA* gene, recombination, protective properties.

Для профилактики туляремии в РФ используется живая вакцина, созданная на основе штамма *F. tularensis* 15/10. Анализ нуклеотидной последовательности генома штамма *F. tularensis* LVS [10], производного штамма *F. tularensis* 15/10, показал наличие *recA*-подобного гена [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?Db=genome&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=19299]. Но функциональная роль этого гена для туляремийного микроба остается невыясненной. Ранее для близкородственного микроорганизма *F. tularensis subsp. novicida* было показано, что удаление *recA*-подобного гена приводит к повышению чувствительности к ультрафиолетовому облучению и воздействию алкилирующих агентов [5], но отсутствовали данные о влиянии этой мутации на гомологичную рекомбинацию и иммунобиологические свойства. Известно, что инактивация белка RecA в вакцинном штамме *Micobacterium bovis* BCG привела к стабилизации вакцинных свойств [7]. Поэтому представляет определенный интерес изучение иммунобиологических свойств *F. tularensis* 15/10 без *recA*-подобного гена.

Материалы и методы

Штаммы и плазмиды, использованные в работе, представлены в таблице.

Штамм *Francisella tularensis* 15/10 Δ *recA* получен методом аллельного обмена, описанным ранее [6].

Культивирование штаммов *F. tularensis* проводили при температуре 37 °C на среде FT-агар (ФГУН ГНЦ ПМБ) и жидкой питательной среде (FTB) [2],

при необходимости в питательные среды добавляли антибиотики полимиксин В (Pm) 100 мкг/мл, хлорамфеникол (Cm) 3 мкг/мл. Культивирование штаммов *E. coli* проводили на питательной среде Лурия-Бертани (LB) [8] при температуре 37 °C с добавлением соответствующих антибиотиков Cm 10 мкг/мл, Ap 100 мкг/мл.

Для приготовления клеточных бактериальных суспензий использовали забуференный физиологический раствор (ЗФР), pH 7.2. Стандартные генно-инженерные манипуляции проводили как описано [3]. Для определения чувствительности к перекиси водорода (H₂O₂) использовался диско-диффузионный метод с диаметром дисков 5 мм. Определение чувствительности к УФ-облучению проводили, используя UV-облучатель с длиной волны 254 нм, «Cole Parmer», США.

Линию мышинных макрофагоподобных клеток J774.A1 культивировали в пластиковых флаконах и планшетах для культур тканей (Corning Costar, США) в концентрации 3–9·10⁵ м.к./мл в среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM, Gibco, США) с добавлением 10 % инактивированной фетальной сыворотки телят, 2 мМ L-глутамина и 0,2 % бикарбоната натрия при температуре 37 °C и концентрации углекислого газа 5 % в CO₂-инкубаторе (Sanyo, США).

Нормальная кроличья сыворотка (НКС) была получена от кроликов породы шиншилла. Оценку устойчивости к НКС туляремийных штаммов проводили по выживаемости бактерий в НКС после инкубирования бактериальной суспензии в концентрации 1·10⁶ КОЕ/мл при температуре 37 °C в течение 24 ч.

Штаммы и плазмиды		
Название	Характеристика	Источник или ссылка
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ <i>supE44 ΔlacU169</i> (φ801acZΔM15) <i>hsdR17</i> (r _k -m _k -) <i>recA19 endA1</i> <i>gyrA96 thi-I elA1</i>	[13]
<i>E. coli</i> S17-1	<i>thi, thr, leu, tonA, lacY, supE, recA</i> : RP4-2-Tc: :Mu, Kn: :Tn7	[11]
<i>E. coli</i> S17-1(pHV33-mob)	<i>E. coli</i> S17-1 с плазмидой pHV33-mob	[6]
<i>E. coli</i> S17-1(pHV33-mob/ <i>recA</i>)	<i>E. coli</i> S17-1 с плазмидой pHV33-mob/ <i>recA</i>	Данная работа
<i>Francisella tularensis</i> 15/10	Pm ^r , прототип вакцинного штамма	Государственная коллекция микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk»
<i>Francisella tularensis</i> 15/10Δ <i>recA</i>	<i>F. tularensis</i> 15/10 с инактивированным геном <i>recA</i>	Государственная коллекция микроорганизмов «ГКПМ-Оболensk»
<i>Francisella tularensis</i> 15/10Δ <i>recA</i> (pHV33-mob/ <i>recA</i>)	<i>F. tularensis</i> 15/10 с инактивированным геном <i>recA</i> , несущий плазмиду pHV33-mob/ <i>recA</i> , содержащую регион хромосомной ДНК с нативным геном <i>recA</i>	Данная работа
<i>E. coli</i> S17-1(pPV/Δ <i>iglC</i>)	<i>E. coli</i> S17-1 с плазмидой pPV/Δ <i>iglC</i>	[6]
pPV/Δ <i>iglC</i>	Amp ^r , Cm ^r , <i>sacB</i> , <i>mob</i> содержит фрагмент хромосомы <i>F. tularensis</i> 15/10 с инактивированным геном <i>iglC</i>	[6]
pHV33-mob	Amp ^r , Cm ^r , Tc ^s	[6]
pHV33-mob/ <i>recA</i>	Amp ^r , Cm ^r , Tc ^s , содержит регион хромосомной ДНК <i>F. tularensis</i> 15/10 с нативным геном <i>recA</i>	Данная работа

В работе использовали мышей линии BALB/c. Определение LD₅₀ проводили согласно методу Кербера в модификации И.П.Ашмарина и А.А.Воробьева [1]. Мышей линии BALB/c (по 5 в группе, самцы и самки, возраст 6–8 недель, массой 18–20 г) инфицировали подкожно бактериальной суспензией в дозах 1·10¹, 1·10², 1·10³ и 1·10⁴ КОЕ/мышь и наблюдали в течение 30 дней. Определение протективности проводили аналогично определению LD₅₀, по прошествии 30 дней, мышам вводили подкожно культуру *F. tularensis* 503 в дозе 1·10³ КОЕ/мышь (DCI штамма *F. tularensis* 503 для мышей линии BALB/c равна 1 КОЕ).

Ампликон размером 4009 п.о. с геном *recA* был получен с праймерами FSA 5'-AAAGTCGACCTG GTGGTTTGTATGGTT-3' и RSA 5'-AAAGTCGACTAC CATCTCAAGGTACT-3' на матрице ДНК клеток штамма *F. tularensis* 15/10.

Плазмида pHV33-mob/*recA* была получена в результате встраивания в плазмиду pHV33-mob по сайту рестрикции SalI ампликона с геном *recA*. Селекцию клонов *E. coli* DH5α с плазмидой pHV33-mob/*recA* проводили на среде с ампициллином с последующим ПЦР-анализом с праймерами FSA, RSA.

Мобилизационный перенос плазмид из клеток *E. coli* S17-1 в клетки *F. tularensis* проводили как описано [6].

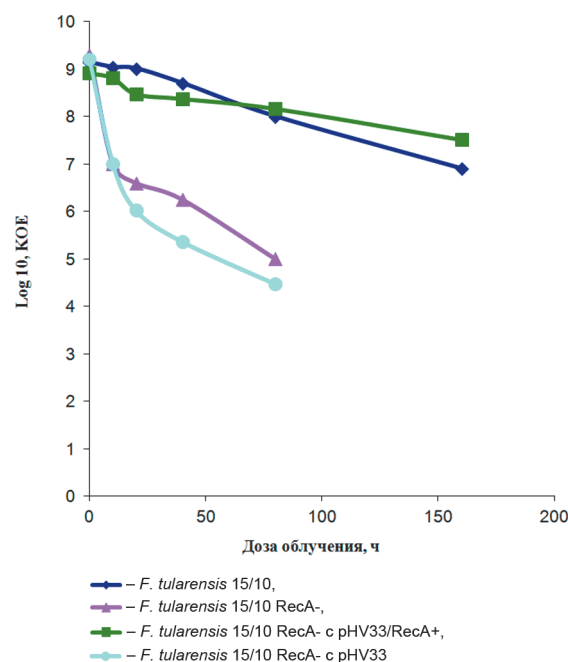
Результаты и обсуждение

Делеция гена *recA* не повлияла на культурально-морфологические свойства штамма при выращивании на плотных и жидких питательных средах. После 48 часов инкубации на FT-агаре вырастали колонии диаметром 2 мм с характерной для культур вакцинного штамма туляремиального микроба формой и цветом.

Время удвоения оптической плотности культуры на среде FTB равнялось двум часам.

В мышиных макрофагоподобных клетках линии J774.A1 количество клеток *F. tularensis* 15/10Δ*recA* увеличилось за 21 ч в 44 раза, что не отличалось от данных для клеток штамма *F. tularensis* 15/10.

Клетки штамма *F. tularensis* 15/10Δ*recA* обладают повышенной чувствительностью к УФ-облучению по сравнению с исходным штаммом *F. tularensis* 15/10 (рисунок). Введение плазмиды pHV33-mob/*recA* с геном *recA* в клетки *F. tularensis* 15/10Δ*recA* полностью восстанавливает устойчивость бактерий к УФ-облучению.



Устойчивость штаммов *F. tularensis* 15/10 к УФ-облучению

Чувствительность бактерий штамма *F. tularensis* 15/10 $\Delta recA$ к бактерицидному действию перекиси водорода (H_2O_2) сравнима с таковой для клеток *F. tularensis* 15/10. Для концентраций перекиси водорода 1 % зона подавления составляла 0,9 см. Бактерицидная активность НКС для штаммов *F. tularensis* 15/10 $\Delta recA$ и *F. tularensis* 15/10 была практически одинакова и составила 10 % выживаемости. Эффективность переноса плазмиды pHV33-mob в штамм *F. tularensis* 15/10 $\Delta recA$ сопоставима с таковой родительского штамма *F. tularensis* 15/10.

Процесс гомологичной рекомбинации изучался с использованием плазмиды pPV/ Δglc , несущей последовательность, гомологичную хромосомной ДНК *F. tularensis* 15/10. Частота интеграции pPV/ Δglc в хромосомную ДНК штамма *F. tularensis* 15/10 составляла 10^{-7} , тогда как для *F. tularensis* 15/10 $\Delta recA$ клоны с интегрированной плазмидой не получены, т.е. частота интеграции составляла менее 10^{-9} . Эти данные позволяют сделать вывод о том, что делеция *recA* гена приводит к репрессии механизма рекомбинации.

Удаление гена *recA* из клеток *F. tularensis* 15/10 привело к десятикратному снижению остаточной вирулентности по сравнению со штаммом *F. tularensis* 15/10. LD₅₀ штамма *F. tularensis* 15/10 $\Delta recA$ составила $5,0 \cdot 10^3$ КОЕ.

Мыши линии BALB/c, иммунизированные клетками штамма *F. tularensis* 15/10 $\Delta recA$ в дозе $1 \cdot 10^1$, $1 \cdot 10^2$, $1 \cdot 10^3$ и $1 \cdot 10^4$ КОЕ/мышь, были устойчивы к заражению в дозе $1 \cdot 10^3$ КОЕ/мышь штамма *F. tularensis* 503.

Таким образом, изучение иммунобиологических свойств полученного штамма *F. tularensis* 15/10 $\Delta recA$ сравнительно со штаммом исходного типа показало одинаковые культурально-морфологические свойства и повышение чувствительности к ультрафиолетовому облучению. Данное наблюдение совпадает с результатами работы [5] и, возможно, говорит об участии гена *recA* в репарации повреждений хромосомы, вызванных УФ-облучением. Полученные данные об отсутствии влияния мутации гена *recA* у клеток *F. tularensis* на чувствительность к H_2O_2 не отличают туляремийный микроб от *Brucella abortus* [9]. Мутантный штамм сохранил свойство выживать в нормальной кроличьей сыворотке [4] и не утратил способности к размножению в макрофагоподобных клетках J774. А1, что важно для формирования в организме хозяина клеточного иммунитета [12]. Атенуирование на порядок при сохранении протективных свойств можно рассматривать как положительный признак для живой вакцины, а существенное снижение способности к гомологичной рекомбинации позволяет говорить о стабилизации полезных качеств штамма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. 58 с.
2. 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.
3. Манятис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир; 1964. 479 с.
4. Мокриевич А.Н., Кондакова А.Н., Валаде Э., Платонов М.Е., Вахрамеева М.Е., Шайхутдинова Р.З., Миронова Р.И., Блах Д., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Кравченко Т.Б., Комбарова Т.И., Видаль Д., Павлов В.М., Линднер Б., Дятлов И.А., Книрель Ю.А. Биологические свойства и строение липополисахарида вакцинного штамма *Francisella tularensis*, полученного при инактивации гена «чувства кворума» *qseC*. Биохимия. 2010; 75(4):539–48.
5. Berg J.M., Mdluli K.E., Nano F.E. Molecular Cloning of the *recA* Gene and Construction of a *recA* Strain of *Francisella novicida*. Infect. and immun. 1992; 60(2): 690–3.
6. Golovliov I., Sjostedt A., Mokrievich A., Pavlov V. A method for allelic replacement in *Francisella tularensis*. FEMS Microbiol. Lett. 2003; 222:273–80.
7. Keller M., Boettger E.C., Sande P. Tuberculosis vaccine strain *Mycobacterium bovis* BCG Russia is a natural *recA* mutant. BMC Microbiol. 2008; 8:120.
8. Miller J.H. Experiments in Molecular Genetics. N.Y.: Gold Harbor Laboratory. 1972. 436 p.
9. Roux C.M., Booth N.J., Bellaire B.H., Gee J.M., Roop R.M. II, Kovach M.E., Tsolis R.M., Elzer P.H., Ennis D.G. RecA and RadA Proteins of *Brucella abortus* Do Not Perform Overlapping Protective DNA Repair Functions following Oxidative Burst J. Bacteriol. 2006; 188(14):5187–95.
10. Sandstrom G. The tularemia vaccine. J. Chem. Tech. Biotech. 1994; 59:315–20.
11. Simon R., Priefer U., Puhler A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. Biotechnology. 1983; 1:784–91.
12. Sjostedt A., Sandström G., Tärnvik A., Jaurin B. Nucleotide sequence and T-cell epitopes of a membrane protein of *Francisella tularensis*. J. Immunol. 1990; 145:311–7.
13. Woodcock D.M., Crowther P.J., Doherty J., Jefferson S., DeCruz E., Noyer-Weidner M., Smith S.S., Michael M.Z., Graham M.W. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. Nucleic Acids Res. 1989; 17:3469–78.

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. 58 p.
2. 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.
3. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. [Methods of Genetic Engineering. Molecular Cloning]. M.: Mir; 1964. 479 p.
4. Mokrievich A.N., Kondakova A.N., Valade E., Platonov M.E., Vakhrameeva M.E., Shaikhutdinova R.Z., Mironova R.I., Blakha D., Bakhteeva I.V., Titareva G.M., Kravchenko T.B., Kombarova T.I., Vidal' D., Pavlov V.M., Lindner B., Dyatlov I.A., Knirel' Yu.A. [Biological properties and lipopolysaccharide structural organization of *Francisella tularensis* vaccine strain obtained after *qseC* gene inactivation]. Biokhimiya. 2010; 75(4):539–48.

Authors:

Лапин А.А., Мокриевич А.Н., Вахрамеева Г.М., Комбарова Т.И., Бахтеева И.В., Дятлов И.А., Павлов В.М. State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

Об авторах:

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

Поступила 04.07.11.

А.Г.Рязанова, Е.И.Еременко, О.И.Цыганкова, Е.А.Цыганкова, А.Н.Куличенко

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОГО ТИПИРОВАНИЯ *BACILLUS ANTHRACIS* В РЕФЕРЕНС-ЦЕНТРЕ ПО МОНИТОРИНГУ ЗА ВОЗБУДИТЕЛЕМ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь

В работе представлены результаты молекулярного типирования *B. anthracis* в рамках деятельности Референс-центра по мониторингу за возбудителем сибирской язвы. Обобщен опыт использования генотипирования при проведении эпидемиологического расследования вспышек сибирской язвы. Отмечено, что MLVA-генотипирование с анализом от 8 до 25 VNTR-локусов при изучении штаммов *B. anthracis*, выделенных в Российской Федерации и на сопредельных территориях, позволяет проводить корректное сравнение генотипов с данными всемирной MLVA-базы данных. Определены основные задачи Референс-центра по разработке подходов к генотипированию возбудителя сибирской язвы, к числу которых относится изучение возможности использования дополнительных методов генотипирования, таких как анализ SNP, SNR с оценкой вариабельности описанных локусов и поиском новых полиморфных областей.

Ключевые слова: *B. anthracis*, сибирская язва, генотипирование, VNTR, MLVA, SNP, SNR.

A.G.Ryazanova, E.I.Eremenko, O.I.Tsygankova, E.A.Tsygankova, A.N.Kulichenko

Application of *Bacillus anthracis* Molecular Typing Methods by the Reference Center for the Anthrax Agent Monitoring

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol

Presented are the results of *B. anthracis* molecular typing of in the scope of work of the Reference center for the anthrax agent monitoring. Summarized is the experience of genotyping application in epidemiological investigation of anthrax outbreaks. MLVA-genotyping (8–25 VNTR-loci analysis) of *B. anthracis* strains, isolated in Russia and in neighboring regions is shown to provide the correct comparison of genotypes with the data of the global MLVA-data bank. The major tasks of reference center for the development of approaches to *B. anthracis* genotyping are identified. These approaches include research of additional genotyping methods such as SNP analysis, SNR analysis with assessment of the described loci variability and identification of new polymorphic regions.

Key words: *B. anthracis*, anthrax, genotyping, VNTR, MLVA, SNP, SNR.

Возбудитель сибирской язвы, *Bacillus anthracis*, до относительно недавнего времени считался генетически высокомономорфным. Индивидуальные различия геномов штаммов стали очевидными только после внедрения наиболее результативных методов молекулярного типирования, основанных на многолокусном анализе вариабельных областей генома *B. anthracis* (MLVA). Схема исследования восьми генетических областей с вариабельным числом tandemных повторов (VNTR-локусы), предложенная P.Keim *et al.* [9], широко применяется как самостоятельно, так и с использованием дополнительных VNTR-локусов [10, 11].

В настоящее время в мировой практике молекулярное типирование возбудителя сибирской язвы проводят, применяя метод MLVA в качестве самостоятельного, а также в сочетании с другими методами. В частности, MLVA дополняют анализом медленно эволюционирующих единичных нуклеотидных полиморфизмов (SNP) [13] и единичных нуклеотидных повторов (SNR), являющихся одной из разновидностей VNTR-локусов и обладающих очень высокой частотой мутаций [12].

В соответствии с приказом Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 88 от 17.03.2008 г. на базе

ФГУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора функционирует Референс-центр по мониторингу за возбудителем сибирской язвы. Одной из задач Референс-центра, для решения которой требуется использование методов генетического типирования, является создание геномных портретов штаммов *B. anthracis* с целью проведения оперативных и ретроспективных расследований вспышек сибирской язвы с использованием молекулярных методов анализа.

Материалы и методы

Обработку и обеззараживание исследуемого материала для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) выполняли согласно методическим указаниям [2]. Генотипирование штаммов проводили методом MLVA в собственной модификации с использованием олигонуклеотидных праймеров для 8–25 VNTR-локусов, описанных [9, 10, 11], а также разработанными в СтавНИПЧИ оригинальными методами, состоящими в сочетанном использовании MLVA, анализа полиморфизма длины амплификационно-рестрикционных фрагментов гена протективного антигена (PCR-RFLP PA) и SNR [5]. Для некоторых локусов использовали секвенирование последовательностей ДНК.

Результаты и обсуждение

В оригинальном варианте MLVA выполняется с использованием флуоресцентно-меченых праймеров и анализа фрагментов амплификации в автоматическом анализаторе ДНК, что требует дорогостоящего оборудования и реактивов. Нами предложена более доступная модификация MLVA с использованием немеченых праймеров к VNTR-локусам, электрофоретического разделения фрагментов амплификации в агарозном геле, фрагментного анализа с помощью цифровой системы визуализации и компьютерной программы [4]. Результаты проведенного MLVA-8-генотипирования штаммов *B. anthracis*, выделенных за последние 55 лет на территории Российской Федерации и республик бывшего Советского Союза, позволили отнести штаммы как к описанным генотипам, так и выявить уникальные генотипы с их географической приуроченностью. Анализ восьми VNTR-локусов позволил определить характерный генотип, присущий штаммам с комплексом атипичных свойств, генотипические особенности штаммов *B. anthracis* с различным проявлением признаков, ассоциированных с патогенностью [1, 3, 4, 6].

Ретроспективное исследование 14 штаммов *B. anthracis*, выделенных из разных объектов в Ставропольском крае, Кабардино-Балкарской Республике и двух районах Республики Калмыкия в июле-августе 1998 г., выявило четыре разных MLVA-генотипа, идентичных в пределах каждой группы штаммов одной территории. Интерпретация этих результатов позволила сделать вывод о независимом характере вспышек сибирской язвы в четырех регионах. Напротив, MLVA-генотип штаммов, выделенных от людей и из почвы с места вынужденного убоя животных во время двух последовательных вспышек сибирской язвы, произошедших осенью 2006 г. и весной 2007 г. на сопредельных территориях – Моздокском районе Республики Северная Осетия-Алания и Курском районе Ставропольского края, оказался одинаковым. Эти данные свидетельствовали о происхождении штаммов из одного и того же стационарно неблагополучного пункта на территории Курского района Ставропольского края, что подтверждалось эпидемиологическим расследованием [7].

MLVA-генотипирование и секвенирование также были использованы при проведении оперативного эпидемиологического расследования с целью установления причинно-следственных связей формирования эпидемического неблагополучия по сибирской язве, сложившейся в 2010 г. в Омской области, а результаты исследования с их использованием имели ключевое значение.

После вынужденного убоя больных лошадей в Тюкалинском районе сибирской язвой заболело шесть человек, один из которых скончался. Эпидемиологическое расследование установило, что мясо вынужденно забитых лошадей из этого эпизоотического очага поступило на мясоперерабатываю-

щее предприятие Омска ООО «Дарина», где было использовано при изготовлении мясных полуфабрикатов, которые в дальнейшем поступили в торговую сеть нескольких областей Российской Федерации.

В Референс-центре проведена окончательная идентификация шести штаммов возбудителя сибирской язвы, выделенных из различных источников в ходе этой вспышки учреждениями Роспотребнадзора и Россельхознадзора. С целью отождествления штаммов проведено генетическое типирование методом MLVA с анализом 24 VNTR-областей генома *B. anthracis*. MLVA-24-генотипирование показало, что ДНК двух штаммов *B. anthracis*, выделенных ГУ «Омская областная ветеринарная лаборатория» из уха жеребца (д. Бекишево), уха кобылы (д. Бурановка), штамма, изолированного ФГУЗ СтавНИПЧИ, из пробы пельменей «Особенные», а также двух штаммов, выделенных из проб пельменей «Русские» (ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Тверской области»), имели идентичные MLVA-генотипы. ДНК штамма *B. anthracis*, выделенного из крови скончавшегося больного (ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Омской области»), имела MLVA-генотип, идентичный генотипу ДНК штаммов, выделенных из проб пельменей и материала от лошадей, по 22 хромосомным и 1 плазмидному локусу, отличаясь по размеру VNTR-фрагмента плазмиды капсулообразования rXO2 на 2 пары нуклеотидов (1 tandemный повтор). Такое изменение размера локуса, по всей видимости, обусловлено пассивированием штамма возбудителя через организм человека, а также воздействием интенсивной антибактериальной терапии. Результаты проведенного генотипирования были подтверждены секвенированием и переданы в Управление Роспотребнадзора и следственные органы Омской области.

MLVA-генотипирование выявило принадлежность ДНК штаммов, изолированных в Омской области, к генотипу, не описанному в мировой базе данных генотипов *B. anthracis*, однако генотип этих штаммов был очень близок к генотипу штаммов, выделенных в Республике Бурятия в 2008 г., отличаясь по размеру неизвестного ранее аллеля одного хромосомного локуса – *Seb-Vams 13* (247 п.н.), тогда как бурятские штаммы имели относительно распространенный в мире аллель (427 п.н.). Уникальность генотипов штаммов, выделенных в Омской области и Республике Бурятия, заключается в наличии редкого аллеля локуса *vrrB2* величиной 180 п.н., упоминавшегося в доступной литературе лишь однажды при описании MLVA-8-генотипа штамма, изолированного из трупа коровы в Эстонии [8].

При проведении лабораторного исследования материала от заболевших людей выделение культуры не всегда возможно, особенно, если отбор материала осуществлен после начала антибиотикотерапии. Так, во время вспышки сибирской язвы, произошедшей в Краснодарском крае в апреле 2011 г., Референс-центром проведено генотипирование ДНК возбудителя сибирской язвы, выделенных из натив-

ного материала – смывов с язв двух больных кожной формой сибирской язвы – без выделения культуры. ДНК-содержащего материала было достаточно для анализа ДНК по основной схеме генотипирования с исследованием 8 VNTR-локусов. Филогенетический анализ, проведенный для сравнения полученных данных с результатами MLVA-8-генотипирования ДНК штаммов, выделенных ранее на территориях Краснодарского края и сопредельных субъектов Южного и Северокавказского федеральных округов, установил, что исследованные ДНК имели размеры аллелей локусов и их сочетание, присущие большинству штаммов Юга России.

В СтавНИПЧИ также разработан методический подход к генетическому типированию возбудителя сибирской язвы, состоящий в сочетанном использовании MLVA, анализа PCR-RFLP PA и SNR. Включение в схему PCR-RFLP PA или SNR-локуса 16 A_{ch} дает возможность разделить штаммы из одной вспышки, имеющие одинаковый MLVA-генотип, на группы. Использование сочетания MLVA с анализом трех SNR-локусов позволяет получить индивидуальную характеристику штаммов из одной вспышки [5].

Нами разработана база данных генотипов коллекционных штаммов сибиреязвенного микроба «*Bacillus anthracis* genotypes». Она содержит сведения о происхождении и генотипах штаммов сибиреязвенного микроба, выделенных в разных регионах РФ и некоторых бывших республиках СССР. База содержит информацию об аллелях от 8 до 25 VNTR-локусов, данные о SNR-локусах и генотипах гена протективно-антигена и позволяет пополнять ее данными об аллелях SNP-анализа и опубликованных генотипах. Для сравнения MLVA-25 генотипов штаммов, полученных в результате анализа, используют on line базу данных «*Bacillus anthracis* 2006» Web-сайта «MLVAbank for Bacterial Genotyping», охватывающую опубликованные генотипы штаммов *B. anthracis*.

Опираясь на имеющийся опыт молекулярного типирования возбудителя сибирской язвы сотрудники Референс-центра в 2010 г. разработали проекты методических рекомендаций «Использование метода MLVA для эпидемиологического расследования вспышек сибирской язвы» и «Генетическое типирование штаммов *Bacillus anthracis* методом MLVA-22».

Таким образом, современный подход к молекулярному типированию возбудителя сибирской язвы, признанный в настоящее время во всем мире, заключается в использовании MLVA-генотипирования с анализом от 8 до 25 VNTR-локусов как основополагающего метода, который может быть применен самостоятельно или в совокупности с другими методами типирования (например, анализ SNP, SNR и др.). Использование MLVA-генотипирования при анализе штаммов, выделенных в Российской Федерации и на сопредельных территориях, позволяет проводить корректное сравнение генотипов с данными всемирной MLVA-базы данных.

Задача Референс-центра по мониторингу за воз-

будителем сибирской язвы заключается в изучении возможности использования дополнительных методов генотипирования, таких как анализ SNP, SNR с оценкой вариабельности описанных локусов и поиском новых полиморфных областей, а также секвенировании последовательностей генов, полиморфных локусов генома *B. anthracis*. Перспективной является оценка информативности методов мультилокусного секвенирования (MLST), анализа длины амплифицированных фрагментов (AFLP) и целесообразности их применения как независимых методов типирования, так и в комплексе с существующими схемами. Результаты вышеизложенных исследований позволят в итоге стандартизировать методические подходы к генотипированию возбудителя сибирской язвы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Цыганкова Е.А., Цыганкова О.И., Куличенко А.Н. Генотипические особенности штаммов *Bacillus anthracis* с разным проявлением признаков, ассоциированных с патогенностью. Пробл. особо опасных инф. 2010; 2(104):53–6.
2. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. Методические указания МУ 1.3.2569-09. М.; 2009.
3. Цыганкова О.И., Еременко Е.И., Брюханов А.Ф., Абгарян А.Г., Ефременко В.И., Рязанова А.Г. Генотипирование штаммов сибиреязвенного микроба на территории стран СНГ. Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол. 2003; 6(приложение):51–6.
4. Шишкова Н.А., Мокриевич А.Н., Платонов М.Е., Светоч Т.Э., Маринин Л.И. Изучение генетического разнообразия штаммов сибиреязвенного микроба из коллекции ГНЦ ПМБ. Пробл. особо опасных инф. 2010; 2(104):60–5.
5. Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K.L., Schupp J.M., Okinaka R. et al. Multiple locus variable number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. 2000; 182(10):2928–36.
6. Le Fleche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoeud F., Ramisse V. et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. BMC Microbiology. 2001; 1:2.
7. Lista F., Faggioni G., Valjevac S., Ciammaruconi A., Vaissaire J., Doujet C. et al. Genotyping of *Bacillus anthracis* strains based on automated capillary 25-loci multiple locus variable-number tandem repeats analysis. BMC Microbiol. 2006; 6:33.
8. Stratillo C.W., Lewis C.T., Bryden L., Mulvey M.R., Bader D. Single-nucleotide repeat analysis for subtyping *Bacillus anthracis* isolates. J. Clin. Microbiol. 2006; 44(3):777–82.
9. Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y. et al. Global Genetic Population Structure of *Bacillus anthracis*. PLoS ONE. 2007; 2(5):e461.

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

1. Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Tsygankova E.A., Tsygankova O.I., Kulichenko A.N. [Genotypic peculiarities of *Bacillus anthracis* strains with different manifestation of pathogenicity-associated features]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; 104:53–6.
2. [Arrangement of work of laboratories using the nucleic acid amplification methods in the course of work with material containing microorganisms of pathogenicity groups I–IV. MU 1.3.2569-09]. M.; 2009.
3. Tsygankova O.I., Eremenko E.I., Bryukhanov A.F., Abgaryan A.G., Efremenko V.I., Ryazanova A.G. [Gene typing of *Bacillus anthracis* strains isolated on the territory of the CIS countries]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2003; 6(supplement):51–6.
4. Shishkova N.A., Mokrievich A.N., Platonov M.E., Svetoch T.E., Marinin L.I. [Study of the genetic diversity of the anthrax microbe strains from the collection of SRC AMB]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; 104:60–5.

Authors:

Ryazanova A.G., Eremenko E.I., Tsygankova O.I., Tsygankova E.A., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. Sovetskaya St., 13–15, Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Об авторах:

Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Цыганкова О.И., Цыганкова Е.А., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: anthraxlab@mail.ru

Поступила 07.07.11.

А.Е.Хлынцева, Н.М.Лунева, Е.В.Белова, И.А.Дятлов, И.Г.Шемякин

РАЗРАБОТКА И ИСПЫТАНИЯ ДИАГНОСТИКУМА НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СПОР ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ В РЕАКЦИИ ЛАТЕКС-АГГЛЮТИНАЦИИ

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

Проведены исследования по иммобилизации моноклональных антител на твердом носителе (латексных микрочастицах) и подбору оптимальной их нагрузки. Наибольшая чувствительность реакции латекс-агглютинации наблюдалась при использовании моноклональных антител 1Е6. Оптимальная нагрузка моноклональных антител на латексных частицах составила 20 мкг на 50 мкл исходной латексной суспензии. Проведена оценка чувствительности и специфичности лиофильновысушенных латексных суспензий с иммобилизованными МКА. Их чувствительность и специфичность не уступала исходной жидкой латексной суспензии. На их основе сконструирован латексный диагностикум для определения спор возбудителя сибирской язвы, разработан и утвержден комплект нормативной документации, включающий в себя инструкцию по применению и технические условия (ТУ 9388-112-78095326-2010, код ОКП 938890). Проведены межлабораторные и комиссионные испытания экспериментальных образцов сконструированного латексного диагностикума. Полученные препараты характеризуются высокой чувствительностью (от $1 \cdot 10^5$ до $2 \cdot 10^6$ спор/мл и выше) и специфичностью (не реагируют со спорами различных видов спорообразующих бацилл в концентрации $1 \cdot 10^8$ спор/мл и ниже).

Ключевые слова: моноклональные антитела (МКА), латексные микрочастицы, реакция латекс-агглютинации (РЛА), чувствительность, специфичность, комиссионные испытания.

A.E.Khlyntseva, N.M.Luneva, E.V.Belova, I.A.Dyatlov, I.G.Shemyakin

Development and Testing of Monoclonal Antibodies-Based Diagnostic Preparation for *Bacillus anthracis* Spores Detection Using Latex Agglutination Method

State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

Immobilization of anti-*B. anthracis* monoclonal antibodies (MAbs) on latex microparticles was studied, the optimal load of these MAbs was determined to be 20 μ g for 50 μ l of the stock latex suspension. The highest sensitivity of latex agglutination test was observed for 1E6 MAbs. Latex suspensions with immobilized MAbs were lyophilized. Their sensitivity and specificity were shown to be highly competitive with those of the stock liquid latex suspension. Latex diagnosticum for *Bacillus anthracis* spores detection was constructed on the basis of these lyophilized reagents, developed and approved was the regulatory documentation that included their application instructions and technical specifications. Carried out were inter-laboratory and commission tests of experimental prototypes of the designed latex diagnosticum. These preparations demonstrated high sensitivity (from $1 \cdot 10^5$ to $2 \cdot 10^6$ spores/ml and even more) and specificity (absence of cross-reactions with spores of different species of sporogenous bacilli at concentration of 10^8 spores/ml).

Key words: monoclonal antibodies (MAbs), latex microparticles, latex agglutination test, sensitivity, specificity, commission tests.

Сибирская язва является особо опасной инфекцией, поражающей людей и сельскохозяйственных животных, и требует постоянного внимания органов санитарно-эпидемиологического и ветеринарного надзора. Подобно другим бациллам, в неблагоприятных условиях бактерии *Bacillus anthracis* образуют споры, которые могут сохраняться в почве в течение нескольких десятилетий, формируя устойчивые природные очаги инфекции.

По данным ВОЗ, в мире ежегодно регистрируется около 20 тыс. случаев заболевания людей сибирской язвой, нередко с летальным исходом. На территории России и стран СНГ выявлено более 72 тыс. стационарно неблагополучных пунктов, где существуют почвенные очаги инфекции. В настоящее время отмечается активизация многих очагов сибирской язвы, поэтому службы надзора Российской Федерации оценивают санитарно-эпидемиологическую обстановку как напряженную.

Приоритетной задачей лабораторной диагностики сибирской язвы является создание новых достоверных способов детекции спор и вегетативной фор-

мы *B. anthracis* в различных объектах окружающей среды и материале от животных и людей.

К настоящему времени в нашей стране и за рубежом разработано множество экспериментальных иммунодиагностических тест-систем, предназначенных для выявления возбудителя сибирской язвы и его антигенов. Однако экспериментальные разработки зачастую не завершаются внедрением результатов в практику на уровне сертифицированных препаратов, как правило, из-за несоответствия принятым параметрам специфичности (неспецифическое взаимодействие с близкородственными видами, такими как *B. cereus* и др. [3]). В связи с этим весьма перспективным представляется конструирование тест-систем, уникальная специфичность которых к спорам возбудителя сибирской язвы обеспечивается особыми свойствами основного иммунореагента – моноклональных антител.

В ходе предыдущих работ нами была получена и охарактеризована панель из 20 гибридных клонов, продуцирующих МКА к спорам возбудителя сибирской язвы *B. anthracis*, шесть из исследованных

МКА – 4Е6, 2В8, 3G3, 2С8, 6В6 и 1Е6 специфически взаимодействовали со спорами 16 штаммов возбудителя сибирской язвы и не давали перекрестных реакций со спорами 21 штамма близкородственных бактерий. Результаты по определению констант аффинности МКА показали, что наибольшей аффинностью обладают антитела 1Е6, 6В6 и 3G3 [1].

Основными параметрами диагностических тест-систем являются их специфичность, чувствительность и воспроизводимость получаемых результатов. Кроме того, существенным показателем является время, затрачиваемое на проведение анализа. Одним из простых и надежных методов детекции возбудителей инфекционных заболеваний является реакция латекс-агглютинации, отличающаяся простотой постановки, возможностью быстрого получения ответа, отсутствием необходимости использования специальных устройств для регистрации результатов при достаточно высокой чувствительности метода. Реакция латекс-агглютинации может быть использована как для качественного, так и для полуколичественного определения инфекционных агентов. Метод основан на специфическом взаимодействии антител, иммобилизованных на твердом носителе (полиакролеиновых микрочастицах), с целевыми микроорганизмами (или их компонентами) с образованием визуально регистрируемого агглютината. Очевидно, что при разработке латексных диагностикумов преимущество должно отдаваться МКА, как более стандартным и высокоспецифичным иммунологическим компонентам [2].

Целью работы являлось конструирование латексного диагностикума на основе отобранных высокоспецифичных МКА для выявления возбудителя сибирской язвы в споровой форме.

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов. В работе использовались споры штаммов микроорганизмов рода *Bacillus*, которые были получены из коллекции микроорганизмов ФБУН ГНЦ ПМБ, из коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ СтавНИПЧИ и ФКУЗ ИркутскНИПЧИ Сибири и ДВ, а также из коллекционного центра живых культур ФКУЗ ВолгоградНИПЧИ. Споры получали при выращивании микроорганизмов на голодном L-агаре. Образование спор оценивали путем просмотра в микроскопе с помощью фазово-контрастного устройства раздавленной или висячей капли, а также мазков, окрашенных по Циллю-Нильсену.

Иммобилизация МКА на латексных частицах. В работе использовались латексные частицы А-63-21 (Институт биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва). Синтезированные монодисперсные акролеиновые частицы имели средний диаметр 1180 нм. К 50 мкл 10 % суспензии латексных частиц добавляли от 10 до 100 мкг МКА. Частицы предварительно дважды от-

мывали 500 мкл 0,9 % раствора натрия хлорида путем центрифугирования в течение 10 мин при 8000 g. После добавления антител объем раствора доводили до 500 мкл 0,9 % раствором натрия хлорида и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре на шейкере. Для блокировки непрореагировавших альдегидных групп к латексным частицам добавляли 4 мл 1 % раствора овальбумина в 0,1 М боратном буфере, pH 8,2. От несвязавшихся МКА латексные частицы отмывали 0,1 М боратным буфером путем трехкратного центрифугирования в течение 10 мин при 1200 g, после чего осадок ресуспендировали в 5 мл 0,1 М боратного буфера (pH 8,2), содержащего 1 % овальбумина.

Постановка реакции латекс-агглютинации. Постановку реакции латекс-агглютинации осуществляли в 96-луночных круглодонных планшетах (Медполимер, Россия). В лунки планшета (кроме первого вертикального ряда) вносили по 25 мкл 0,1 М боратного буфера. В лунки первого и второго вертикальных рядов вносили по 25 мкл взвесей спор убитых культур сибиреязвенного микроба и штаммов гетерологичных микроорганизмов с концентрацией $1 \cdot 10^9$ м.к./мл. Суспензию спор титровали двукратным шагом, начиная со второго вертикального ряда, получая ряд последовательных разведений с концентрацией от $1 \cdot 10^9$ до $5 \cdot 10^5$ м.к./мл. В качестве отрицательного контроля (контроль спонтанной агглютинации) использовали 0,1 М боратный буфер. Далее во все лунки, содержащие споры убитых культур микроорганизмов, и в лунки с отрицательными контролями вносили по 25 мкл приготовленных латексных суспензий с иммобилизованными в определенной концентрации МКА 1Е6, 6В6 и 3G3. Конечный объем в лунках составил 50 мкл. Непосредственно перед внесением в лунки планшета латексные суспензии хорошо перемешивали. Планшеты слегка встряхивали и инкубировали в течение 1,5–2 ч при комнатной температуре в защищенном от света месте.

Результат учитывали визуально по четырехкрестовой системе: «++++» – агглютинированы все частицы латекса, равномерно покрывая дно лунки и образуя «зонтик»; «+++» – агглютинирована большая часть латексных частиц, что выражается в уменьшении диаметра «зонтика»; «++» – агглютинирована половина латексных частиц; «+» – большая часть латексных частиц не агглютинирована и осела на дно в виде «пуговицы»; «–» – признаков агглютинации нет, все частицы осели на дно в виде «точки». Положительной считается реакция, оцениваемая не менее чем на «++++».

Лифофильное высушивание латексных суспензий с иммобилизованными МКА. Полученные латексные суспензии с иммобилизованными МКА были высушены из замороженного состояния с использованием лифофильной сушилки Epsilon 2-4 LSC, («Christ», Германия). Предварительно латексные суспензии были разлиты по 0,5 мл в стеклянные флаконы объе-

мом 4 мл с резиновыми пробками. Высушенные препараты хранили при температуре 4 °С.

Результаты и обсуждение

Работа по конструированию латексного диагностикума для определения спор *B. anthracis* состояла из следующих этапов:

- иммобилизация и подбор оптимальной нагрузки МКА на твердом носителе – латексных микрочастицах (получение латексных суспензий с иммобилизованными МКА);
- проверка чувствительности и специфичности полученных латексных суспензий с иммобилизованными МКА при помощи панели штаммов спор сибирской язвы и гетерологичных микроорганизмов в реакции латекс-агглютинации;
- лиофильная сушка латексных суспензий с иммобилизованными МКА, проверка чувствительности и специфичности высушенных латексных реагентов в реакции латекс-агглютинации;
- изготовление экспериментальных образцов латексных диагностикумов для определения спор возбудителя сибирской язвы;
- проведение межлабораторных и комиссионных испытаний экспериментальных образцов латексных диагностикумов для определения спор возбудителя сибирской язвы.

Для конструирования сибиреязвенного диагностикума предварительно были выбраны МКА 1Е6, 6В6, 3Г3, обладающие высокой аффинностью и специфичностью в отношении спор *B. anthracis*. Данные МКА были получены и охарактеризованы ранее в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)», государственный контракт № 117-Д от 11.06.2009 г.

Для подбора оптимальной нагрузки МКА на латексных частицах была проведена их иммобилиза-

ции с различной концентрацией (10, 20, 40, 60, 80, 100 мкг). Оптимальную нагрузку МКА определяли в реакции латекс-агглютинации, МКА 1Е6, 6В6, 3Г3 – со спорами вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 (таблица).

По результатам анализа было установлено, что чувствительность реакции значительно увеличивается при использовании латексной суспензии с иммобилизованными МКА 1Е6 по сравнению с другими антителами. Оптимальная нагрузка на латексных частицах для всех трех моноклональных антител составила 20 мкг/мл на 50 мкл исходной латексной суспензии, дальнейшее увеличение количества МКА не привело к увеличению чувствительности реакции. Таким образом, для разработки сибиреязвенного латексного диагностикума были выбраны МКА 1Е6 с нагрузкой на латексных частицах – 20 мкг МКА на 50 мкл латексной суспензии.

Чувствительность и специфичность сибиреязвенной латексной суспензии оценивали в реакции латекс-агглютинации с инактивированными культурами трех штаммов *B. anthracis* (*B. anthracis* СТИ-1, *B. anthracis* М-71, *B. anthracis* М71/12) и четырех гетерологичных штаммов рода *Bacillus* (*B. megaterium* В-1435, *B. cereus* В-160, *B. subtilis* В-1405, *B. licheniformis* В-1411).

В результате проведенного анализа установлено, что полученная латексная сибиреязвенная суспензия с иммобилизованными МКА 1Е6 выявляет исследованные штаммы возбудителя сибирской язвы в концентрациях от $9,8 \cdot 10^5$ до $2,0 \cdot 10^6$ спор/мл и выше и не имеет перекрестной активности с гетерологичными штаммами рода *Bacillus*.

Для увеличения срока годности латексные суспензии были лиофильно высушены. Чувствительность и специфичность лиофильно высушенных латексных суспензий определяли в реакции латекс-агглютинации. Перед началом анализа флаконы с лиофильно высушенными образцами выдерживали в течение 20 мин при комнатной температу-

Подбор оптимальной нагрузки моноклональных антител 1Е6, 6В6, 3Г3 к *B. anthracis* на латексных частицах «А-63-21»

МКА, мкг	МКА	Концентрация спор <i>B. anthracis</i> , спор/мл									
		$5,0 \cdot 10^8$	$2,5 \cdot 10^8$	$1,3 \cdot 10^8$	$6,3 \cdot 10^7$	$3,1 \cdot 10^7$	$1,6 \cdot 10^7$	$7,8 \cdot 10^6$	$3,9 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^6$	$9,8 \cdot 10^5$
10	1Е6	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	-
	6В6	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	-	-
	3Г3	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+	-	-
20	1Е6	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+
	6В6	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	-
	3Г3	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	-
40	1Е6	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+
	6В6	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	-
	3Г3	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	-
80	1Е6	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+
	6В6	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	-
	3Г3	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	-
100	1Е6	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	2+
	6В6	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	-
	3Г3	4+	4+	4+	4+	4+	4+	3+	3+	2+	-

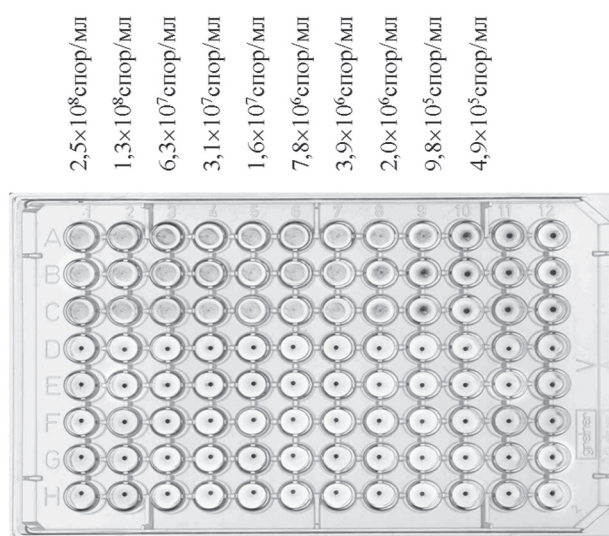
ре, затем содержимое каждого флакона ресуспендировали в 500 мкл деионизованной воды и тщательно перемешивали.

Постановку анализа и учет результатов реакции проводили как описано выше, за исключением того, что споровые взвеси штаммов *B. anthracis*, близкородственных микроорганизмов рода *Bacillus* и положительный контроль титровали двукратном шагом с начальной концентрации $2,5 \cdot 10^8$ м.к./мл. В качестве положительного контроля использовали жидкую споровую взвесь *B. anthracis* СТИ-1.

В результате проведенного анализа установлено, что лиофильно высушенная сибиреязвенная латексная суспензия выявляет исследованные штаммы *B. anthracis* в концентрациях от $9,8 \cdot 10^5$ до $2,0 \cdot 10^6$ спор/мл и выше и не имеет перекрестной активности с близкородственными микроорганизмами рода *Bacillus*, то есть по чувствительности и специфичности определения лиофильно высушенный латексный препарат не уступает исходной жидкой латексной суспензии с иммобилизованными МКА и может быть использован в качестве компонента латексного сибиреязвенного диагностикума для определения спор *B. anthracis* (рисунок).

На основании проведенной работы по конструированию латексного диагностикума был разработан и утвержден комплект нормативной документации, включающий в себя инструкцию по применению и технические условия (ТУ 9388-112-78095326-2010, код ОКП 938890).

В набор латексного диагностикума входили: 96-луночный планшет с U-образным профилем лунок для постановки реакции латекс-агглютинации; лиофильно высушенная латексная суспензия с иммобилизованными моноклональными антителами к спорам *B. anthracis* – 5 флаконов; жидкая инактивированная взвесь спор *B. anthracis* СТИ-1



Оценка чувствительности и специфичности сибиреязвенной латексной суспензии после лиофильного высушивания

($1 \cdot 10^9$ спор/мл) – 1 флакон; навеска солей (0,34 г борной кислоты, 0,43 г тетрабората натрия) для приготовления 100 мл 0,1 М боратного буфера, pH 8,2.

Для оценки эффективности сконструированных диагностикумов были проведены межлабораторные испытания на базе ФГУН ГНЦ ПМБ и комиссионные испытания на базе Иркутского, Ставропольского и Волгоградского научно-исследовательских противочумных институтов Роспотребнадзора. Для проведения испытаний предоставлялось не менее 5 наборов латексного диагностикума. Подлинность, чувствительность и специфичность латексного диагностикума проверяли путем постановки РЛА с 17 штаммами *B. anthracis* и с 36 штаммами близкородственных бацилл в споровой форме. В результате проведенных испытаний установлено, что «Набор реагентов для определения спор *Bacillus anthracis* в реакции латекс-агглютинации» обнаруживал споры возбудителя сибирской язвы в концентрации от $1 \cdot 10^5$ до $2 \cdot 10^6$ спор/мл и выше и не реагировал со спорами различных видов спорообразующих бацилл в концентрации $1 \cdot 10^8$ спор/мл и ниже, за исключением *Bacillus cereus* VRRL 569, который выявлен в концентрации $1 \cdot 10^8$, что составило 2,7 %. Ввиду наличия перекрестно реагирующих антигенов у представителей рода *Bacillus*, допускается при проведении РЛА положительный результат с гетерологичными штаммами не более, чем у 10 % от числа исследуемых штаммов.

Таким образом, латексный диагностикум «Набор реагентов для определения спор *Bacillus anthracis* в реакции латекс-агглютинации» по чувствительности и специфичности соответствует требованиям, предъявляемым к МИБП для идентификации возбудителей особо опасных инфекций. Простота постановки реакции, ее демонстративность, возможность быстрого получения ответа, отсутствие необходимости применения специальных устройств для регистрации результатов является основанием для рассмотрения вопроса о внедрении набора реагентов в практику работы учреждений санэпиднадзора в условиях повседневной деятельности и чрезвычайных ситуаций. Методы контроля, предложенные авторами в технических условиях, воспроизводимы. Показатели качества, полученные в результате контроля, соответствуют требованиям ТУ 9388-112-78095326-2010. Инструкция по применению на представленный набор реагентов включает все необходимые пользователю сведения для воспроизведения предлагаемого способа идентификации спор возбудителя сибирской язвы.

Выражаем благодарность за помощь в проведении работ научным сотрудникам ФБУН ГНЦ ПМБ Маринину Л.И.; ФКУЗ ВолгоградНИПЧИ Храповой Н.П., Баркову А.М., Барковой И.А.; ФКУЗ СтавНИПЧИ Тюменцевой И.С., Жарниковой И.В., Ждановой Е.В.; ФКУЗ ИркутскНИПЧИ Сибири и ДВ Кравец Е.В., Дугаржаповой З.Ф.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хлынцева А.Е., Белова Е.В., Жарникова И.В., Тюменцева И.С., Куличенко А.Н., Дятлов И.А., Шемякин И.Г. Конструирование тест-системы для селективного концентрирования спор *Bacillus anthracis* на основе магнитных частиц с иммобилизованными моноклональными антителами. Биотехнол. 2010; 4:81–8.

2. Andreotti P.K., Ludwig G.V., Peruski A.H. et al. Immunoassay of infectious agents. Biotechniques. 2003; 35:850–9.

3. Steichen C., Chen P., Kearney J.F., Turnbough C.L. Identification of the Immunodominant Protein and Other Proteins of the *Bacillus anthracis* Exosporium. J. Bacteriol. 2003; 185:1903–10.

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

1. Khlyntseva A.E., Belova E.V., Zharnikova I.V., Tyumentseva I.S., Kulichenko A.N., Dyatlov I.A., Shemyakin I.G. [Development of the test-

system for the selective concentration of *Bacillus anthracis* spores based on the use of magnet particles with immobilized monoclonal antibodies]. Biotekhnologia. 2010; 4:81–8.

Authors:

Khlyntseva A.E., Luneva N.M., Belova E.V., Dyatlov I.A., Shemyakin I.G. State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

Об авторах:

Хлынцева А.Е., Лунева Н.М., Белова Е.В., Дятлов И.А., Шемякин И.Г. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Московская обл., п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 03.03.11.

С.В.Генералов, Е.Г.Абрамова, А.К.Никифоров, Ж.В.Матвеева**КЛЕТОЧНЫЕ КУЛЬТУРЫ В ПРОИЗВОДСТВЕ
ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА***ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

В обзоре обозначены основные современные направления получения антирабического иммуноглобулина с улучшенными свойствами. Проанализированы результаты исследований, связанные с применением вируса бешенства, выращенного на клеточных культурах, в производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина.

Ключевые слова: гетерологичный антирабический иммуноглобулин, культура клеток, профилактика бешенства, рабический антиген.

S.V.Generalov, E.G.Abramova, A.K.Nikiforov, Zh.V.Matveeva**Cell Structures in Heterologous Anti-Rabies Immunoglobulin Production***Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov*

This paper reviews basic modern trends in obtainment of anti-rabies immunoglobulin with enhanced properties. One of these trends is associated with the substitution of organ-tissue antigen by cultural antigen at the stage of producer immunization. Analyzed are the results of research connected with the use of the cell-cultures grown Rabies virus in production of heterologous anti-rabies immunoglobulin. The study testifies of applicability of the transferred *Vero* cell culture as a substrate for rabies antigen preparation. In addition to this, specified are the advantages of the rabies cultural antigen usage over the organ-tissue one at the stage of hyper-immune serum production.

Key words: heterologous anti-rabies immunoglobulin, cell culture, rabies prophylaxis, rabies antigen.

Бешенство относится к группе особо опасных инфекционных болезней человека и животных, характеризующихся поражением центральной нервной системы и абсолютной летальностью. Несмотря на проведение профилактических мероприятий, бешенство по-прежнему остается одним из наиболее распространенных зооантропонозов, угрожающим здоровьем людей. По оценке ВОЗ, в мире ежегодно получают укусы и имеют контакты с подозреваемыми на бешенство животными около 10 млн чел., 4 млн из их числа получают специальную медицинскую помощь, количество летальных случаев составляет от 35000 до 55000 [36]. В России, по данным Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, число ежегодных обращений за антирабической помощью составляет более 400000 чел., на детей в возрасте до 14 лет приходится около 25 %. На протяжении последних лет инфекцию регистрировали в семидесяти субъектах страны.

В случаях нанесения повреждения человеку больным или подозрительным на бешенство животным необходимо использование антирабического иммуноглобулина (АИГ) [36]. В основе методики комбинированных прививок АИГ и вакциной лежит идея удлинения инкубационного периода бешенства за счет пассивного введения антител и формирования активного иммунитета в результате курса вакцинации. В настоящее время в мировой практике здравоохранения применяют препараты АИГ, полученные

из иммунных сывороток человека или животных.

Гомологичный АИГ, получаемый из сыворотки крови человека, отличается хорошей переносимостью и редкими случаями возникновения аллергических реакций. Высокая стоимость и небольшой объем препарата, связанный с трудностями иммунизации волонтеров, ограничивает спрос на препараты гомологичного антирабического иммуноглобулина в развивающихся странах с низким доходом населения [36].

За рубежом на стадии изучения находится вопрос получения моноклональных антител к вирусу бешенства, а также молекул иммуноглобулинов и их фрагментов, созданных методами генной инженерии [27, 28, 37]. Их использование должно способствовать снижению развития постэкспозиционного анафилактического шока. Вместе с тем, обладая узкой специфичностью действия, препараты нового поколения могут быть недостаточно эффективными в результате возможной мутации антигенного состава вируса бешенства. Сложные методы получения и контроля максимально очищенных препаратов ведут к их высокой себестоимости.

Производством гетерологичных препаратов АИГ в основном занимаются национальные фармацевтические компании развивающихся стран. Данное обстоятельство связано со сравнительно низкой стоимостью производимого препарата. Некоторые мировые фармацевтические компании (Behring, Sclavo, Berna) отказались от производства гетерологичного

АИГ, причиной тому является давление, которое оказывают на них защитники прав животных [35], поскольку в качестве продуцентов в большинстве стран используют лошадей [11].

В России зарегистрировано два препарата АИГ из сыворотки крови лошади – производства Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» (Россия) и ЗАО «Биолек» (Украина). Оба препарата успешно применяются на территории Российской Федерации и стран СНГ.

На сегодняшний день гетерологичный АИГ можно считать приемлемой и безопасной альтернативой гомологичному препарату, так как современные методы очистки иммуноглобулиновых препаратов позволяют значительно снизить частоту побочных эффектов, проявляющихся в результате применения АИГ животного происхождения, до 1–2 % [1, 36]. В середине прошлого столетия значение данного показателя составляло около 46 % [20], а в конце восьмидесятых годов – около 6 % [34].

Вопрос дальнейшего усовершенствования гетерологичных препаратов АИГ, даже при такой сравнительно небольшой доле возникновения побочных эффектов, остается актуальным. Перспективны разработки более совершенных способов концентрации и очистки антирабической сыворотки, значительно повышающие специфическую активность и безопасность готового препарата. Отечественные и зарубежные исследователи предлагают использовать различные варианты осаждения, хроматографии, ферментативной обработки, фильтрации [1, 3, 10, 18, 23]. По мнению некоторых исследователей, использование в качестве продуцентов сыворотки вместо лошадей других домашних животных, антитела которых являются менее аллергенными, позволит получать более безопасный в иммунологическом отношении препарат [9, 26, 31]. Продуцентами иммунной сыворотки могут быть крупный рогатый скот, свиньи, овцы, домашняя птица.

Другим направлением совершенствования препарата гетерологичного АИГ является применение для иммунизации продуцентов антигена, полученного на культуре животных клеток. В настоящее время многие производители гетерологичного антирабического иммуноглобулина для иммунизации продуцентов сыворотки применяют инактивированный фиксированный вирус бешенства, полученный из мозговой ткани животных. Органотканевой антиген характеризуется не только более низким уровнем иммуногенности по сравнению с культуральным, но и содержанием в нем балластной мозговой ткани, вызывающей образование в сыворотке продуцентов антител-нейротоксинов [8, 36]. В связи с этим применение клеточных культур в качестве основной системы для репродукции вирусов вполне обосновано возможностью получать стандартизированный препарат антигена, максимально очищенный, с небольшим числом чужеродных антигенов в виде клеточных компонентов.

На сегодняшний день репродукцию вируса бе-

шенства успешно осуществляют на различных клеточных системах. Для производства вакцин используют первично-трипсинизированные и перевиваемые клетки почек сирийского хомяка (ПСХ) [4, 8, 19, 22], куриные и перепелиные фибробласты [6, 25], зародышевые клетки свиньи, собаки [30], диплоидные клетки человека [14], клетки почечного эпителия зеленой мартышки (Vero) [12, 13, 16, 21]. В настоящее время выявлено бесспорное преимущество перевиваемых клеток в качестве клеточного субстрата для репродукции вируса бешенства по сравнению с первично-трипсинизированными, что связано с высокой потенцией роста клеток, стандартностью биологических свойств и возможностью крупномасштабного культивирования в ферментерах большого объема. Необходимо отметить, что в России из всего разнообразия перевиваемых клеточных культур для производства МИБП официально разрешена только клеточная линия Vero (Ишкильдин И.Б. и соавт., 2005; Петрова И.И. и соавт., 2005). Она не представляет опасности для человека при производстве биопрепаратов, существенным моментом является отсутствие онкогенных свойств у данной клеточной линии [30, 32]. За рубежом клеточная линия Vero успешно применяется при производстве вакцин против бешенства, полиомиелита, японского энцефалита. Отечественные исследователи также предлагают использование клеточной линии Vero для производства антирабической концентрированной клеточной вакцины [12].

Вирус бешенства, репродуцированный на культуре первично-трипсинизированных клеток ПСХ, был предложен для иммунизации продуцентов антирабической сыворотки P.Lepine и P.Atanasiu в конце шестидесятых годов прошлого века [4, 5]. Вирус бешенства в клеточной культуре ПСХ накапливался в меньшем титре и обладал меньшей иммуногенностью, чем вирус, полученный на мозговом субстрате. Поэтому для иммунизации требовалось либо применение больших доз антигена, что индуцировало образование низкоафинных антител в течение длительного времени, либо введение в организм продуцента живого вируса.

Более эффективным оказался способ получения профилактической лошадиной антирабической сыворотки, предложенный С.А.Consales *et al.* [15]. Для иммунизации продуцентов авторы использовали вирус бешенства (штамм Пастера), репродуцированный на перевиваемой культуре клеток почек хомяка (ВНК). В результате применения культурального антигена накопление необходимого титра антител в организме продуцента происходило в два раза быстрее, объем иммунизирующей дозы удалось сократить в пять раз.

Вирус, репродуцированный на клеточной линии ВНК, также предложен для получения активной овечьей антирабической сыворотки [2]. Авторами разработана схема комбинированной иммунизации овец органотканевым и культуральным антигеном (штамм Щелково-51С). В сравнении с предложенным ранее способом, не предусматривавшим применения куль-

турального антигена [7], такой подход позволяет получать сыворотку с более высоким титром антител.

Однако наибольшие успехи в области применения культурального вируса бешенства в производстве гетерологичного иммуноглобулина были получены при использовании перевиваемой линии клеток Vero. Отечественными исследователями установлено, что антиген вируса бешенства полученный на перевиваемой культуре клеток Vero, при равной иммуногенности с вирусом, репродуцированным на первичной культуре клеток ПСХ, позволяет получать более высокий титр вируснейтрализующих антител (Ситник Н.П. и соавт., 2005). После цикла иммунизации морских свинок нативной антирабической вакциной, полученной на культуре перевиваемых клеток Vero, титр антител в сыворотке составил 46,2 МЕ/мл. При использовании вакцины, полученной на культуре клеток ПСХ, титр антител в сыворотке морских свинок был равен 11,7 МЕ/мл. При сравнении гуморального ответа лошадей показано, что титр защитных антител был выше в 1,5 раза в иммунной сыворотке лошади, иммунизированной антирабической вакциной, полученной на культуре перевиваемых клеток Vero, по сравнению с титром в сыворотке лошади, иммунизированной вакциной, полученной на культуре клеток ПСХ. Подобный эффект позволил рассматривать возможность использования клеточной линии Vero для репродукции вируса бешенства при производстве антирабического иммуноглобулина [9]. Иммунизация лошадей инактивированным, очищенным и концентрированным культуральным вирусом бешенства (штамм Внуково-32) с адьювантами фосфатом алюминия и нуклеинатом натрия позволяет получать антирабическую сыворотку со специфической активностью 133,0–211,2 МЕ/мл и содержанием гамма-глобулина 44,5–58,2 %. Активность иммуноглобулина, полученного из такой сыворотки, составила $(439,4 \pm 17,3)$ МЕ/мл [10].

Предложены способы получения антирабической сыворотки с использованием коммерческих культуральных вакцин Rabipur (Индия), полученных на клетках куриных эмбрионов, и PVRV (Франция) – на клетках Vero [17]. В качестве продуцентов использовали мулов. Преимущество иммунизации животных культуральными вакцинами установлено в сравнении с органотканевым антигеном из ткани головного мозга лошади. Значения титров антител сывороток, полученных при использовании антигена на основе культуральных вакцин Rabipur и PVRV, а также вирусной мозговой суспензии к 56-му дню эксперимента составили соответственно 139, 118, 18 МЕ/мл.

T.Luekrajap сообщает о практическом применении культурального антигена в серийном производстве АИГ в Таиланде [24]. К 8-й неделе иммунизации титр антител достигает значения 70 МЕ/мл. Активность антирабического иммуноглобулина, производимого в Таиланде с использованием вакцины, полученной на клеточной линии Vero, соответствует требованиям ВОЗ и составляет не менее 200 МЕ/мл.

O.Ozkan *et al.* при иммунизации лошадей предлагают использовать не подкожный, а внутрикожный способ введения культурального рабического антигена [29]. В отличие от подкожного введения рабического антигена, при внутрикожном и внутримышечном накопление антител происходит быстрее и в большем количестве. Подобное явление может быть связано с более эффективным взаимодействием компонентов вируса с сетью нервных рецепторов (Иванов В.С., 2001). Значение титра антител полученной сыворотки составило 320 МЕ/мл уже через пять недель после первой иммунизации.

Таким образом, несомненна перспектива применения перевиваемой клеточной линии Vero для изготовления культурального рабического антигена в производстве гетерологичного АИГ.

Применение высокоактивного препарата антирабического иммуноглобулина, полученного с использованием культурального антигена, позволит улучшить качество оказываемой антирабической помощи за счет снижения риска возникновения побочных эффектов в виде нейропаралитических осложнений у пациентов.

Следует отметить, что получение более активного и безопасного в аллергическом отношении препарата далеко не единственное преимущество использования культурального антигена. Например, небольшой объем вводимой дозы антигена упрощает рутинную процедуру иммунизации [17, 29]. При использовании культурального антигена у животных практически не происходит возникновения абсцессов в месте введения в отличие от применения органотканевого. Использование культурального рабического антигена на этапе получения гипериммунной сыворотки является альтернативой трудоемким процессам интрацеребрального заражения животных, их вскрытия и приготовления вирусосодержащей мозговой суспензии, и позволит не только сделать производство препарата более этичным, но и соответствовать рекомендациям ВОЗ по исключению применения органотканевого антигена в производстве антирабического иммуноглобулина [36]. Систематизировав вышеуказанные материалы и определив направление научного поиска сотрудники ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» начали разработку технологии получения культурального рабического антигена для производства гетерологичного АИГ.

Работа выполнена по государственному контракту № 63-Д от 29.06.2010 в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система биологической и химической безопасности Российской Федерации 2009–2013 годы».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Лобовикова О.А., Еремин С.А., Васин Ю.Г., Михеева Т.А. и др. Производство гетерологичного антирабического иммуноглобулина – итоги первых пяти лет. Пробл. особо опасных инф. 2010; 3(105):58–62.
2. Бабкин М.В., Стегний Б.Т., Ничик С.А., Прохорятова Е.В., Кучерявенко Р.А., Годовский А.В. Способ получения гипериммунной антирабической сыворотки. Патент UA 19403.

3. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Храмова Е.М., Шепелёв И.А., Савицкая Л.В. и др. Получение препарата F(ab')₂-фрагментов антирабического иммуноглобулина с использованием иммобилизованного пепсина. Пробл. особо опасных инф. 2008; 3(97):53–6.
4. Каплан М.М., Копровски Х., редакторы. Методы лабораторных исследований по бешенству. Женева: ВОЗ; 1975. 360 с.
5. Карпов С.П., Прегер С.М., Синельников Г.Е., Федоров Ю.В. Гипериммунные сыворотки. Томск; 1976. 380 с.
6. Нагиева Ф.Г., Бектемирова М.С., Матевосян К.Ш., Бектемиров Т.А., Пиле Э.Р. Репродукция фиксированного вируса бешенства в культуре перепелиных фибробластов, растущих в суспензии. Вopr. вирусол. 1980; 4:429–31.
7. Недосеков В.В., Сливко И.А., Куриннов В.В., Луницин А.В., Груздев К.Н. Способ получения гипериммунной антирабической сыворотки. Патент РФ 2196607.
8. Селимов М.А. Бешенство. М.: Медицина; 1978. 336 с.
9. Ситник Н.П., Загидуллин Н.В., Ибрафиллов А.Г., Еникеева Л.Ф., Мухачева А.В., Шафеева Р.С. и др. Способ получения высокоспецифичной гетерологичной антирабической сыворотки. Патент РФ 2322503.
10. Ситник Н.П., Ибрафиллов А.Г., Загидуллин Н.В., Алсынбаев М.М., Тимербаева Р.Х. Препарат гетерологичного антирабического иммуноглобулина для внутривенного и внутримышечного введения и способ его получения. Патент РФ 2339401.
11. Тихонов И.В., Рубан Е.А., Грязнёва Т.Н. Биотехнология. СПб.: ГИОРД; 2005. 792 с.
12. Шафеева Р.С., Фролова А.В., Муллагулова М.Н. Получение в эксперименте концентрированной очищенной культуральной антирабической вакцины на основе перевиваемых клеток Веро. В кн.: Роль иммунобиологических препаратов в современной медицине. Уфа; 1995. Т. 1. С. 191–4.
13. Barrett P., Mundi W., Kistner O., Howard M. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. Expert. Rev. Vaccines. 2009; 8:607–18.
14. Brookes S., Parsons G., Johnson N., McElhinney L., Fooks A. Rabies human diploid cell vaccine elicits cross-neutralising and cross-protecting immune responses against European and Australian bat lyssaviruses. Vaccine. 2005; 23:4101–9.
15. Consales C.A., Valentini E.J.G., Albas A., Mendonca R., Fuchs R., Soares M.A. et al. The preparation of cultured rabies virus and the production of antiserum for human use. Journal of Biological Standardization. 1988; 16:27–32.
16. Costa W., Cunha R., Bolzan V., Silva Ade C., Caporale G., Chaves L. et al. Immunogenicity and safety of a new Vero cell rabies vaccine produced using serum-free medium. Vaccine. 2007; 25:8140–5.
17. Goel S.K., Sharma S., Singh U. Antibody response to purified chick embryo cell vaccine in equines for production of equine rabies immune globulin. Biologicals. 2003; 31:233–6.
18. Hong H., Rooijakkers E., Ke N., Groen J., Osterhaus A. Methods for the purification of equine rabies immunoglobulin: effects on yield and biological activity. Biological. 1994; 22:1–6.
19. Kallel H., Rourou S., Majoul S., Loukil H. A novel process for the purification of veterinary rabies vaccine in BHK-21 cells grown on microcarriers in 20-l bioreactor. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003; 61:441–6.
20. Karliner J.S., Belaval G.S. Incidence of reactions following administration of antirabies serum: a study of 526 cases. JAMA. 1965; 193:359–62.
21. Kumar A., Mani K., Palaniappan C., Bhau L., Swaminathan K. Purification, potency and immunogenicity analysis of Vero cell culture-derived rabies vaccine: a comparative study of single-step column chromatography and zonal centrifuge purification. Microbes Infect. 2005; 7:1110–6.
22. Lalosević D., Lalosević V., Lazarević-Ivanc Lj., Knezević I. BHK-21 cell culture rabies vaccine: immunogenicity of a candidate vaccine for humans. Dev. Biol. (Basel). 2008; 131:421–9.
23. Lang J., Attanath P., Quiambao B., Singhasivanon V., Chanthavanich P., Montalban C. et al. Evaluation of the safety, immunogenicity, and pharmacokinetic profile of a new, highly purified, heat-treated equine rabies immunoglobulin, administered either alone or in association with a purified, Vero-cell rabies vaccine. Acta Tropica. 1998; 70:317–33.
24. Luekrajana T., Wangsai J., Phanuphak P. Production of antirabies serum of equine origin. In: Meslin F.-X., Kaplan M.M., Koprowsky H., editors. Laboratory techniques in rabies. Geneva: WHO; 1996. P. 401–4.
25. Madhusudana S., Anand N., Shamsundar R. Economical multi-site intradermal regimen with purified chick embryo cell vaccine (Rabipur) prevents rabies in people bitten by confirmed rabid animals. Int. J. Infect. Dis. 2002; 6:210–4.
26. Motoi Y., Sato K., Hata H., Morimoto K., Inoue S., Yamada A. Production of rabies neutralizing antibody in hen's eggs using a part of the G protein expressed in Escherichia coli. Vaccine. 2005; 23:3026–32.
27. Müller T., Dietzschold B., Ertl H., Fooks A.R., Freuling C., Fehlfeld-Gardiner C. et al. Development of a mouse monoclonal antibody cocktail for post-exposure rabies prophylaxis in humans. PLoS. Negl. Trop. Dis. 2009; 3(11):e542.
28. Nagarajan T., Rupprecht C.E., Dessain S.K., Rangarajan P.N., Thiagarajan D., Srinivasan V.A. Human monoclonal antibody and vaccine approaches to prevent human rabies. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2008; 317:67–101.
29. Ozkan O., Aylan O., Ates C., Celebi B. Production of heterolog anti-rabies immune sera. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi. 2004; 15:49–54.
30. Perez O., Paolazzi C. Production methods for rabies vaccine. Journal of industrial microbiology & biotechnology. 1997; 18:340–7.
31. Redwan el-R.M., Fahmy A., El Hanafy A., Abd El-Baky N., Sallam S.M. Ovine anti-rabies antibody production and evaluation. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 2009; 32:9–19.
32. Rourou S., van der Ark A., van der Velden T., Kallel H.A. microcarrier cell culture process for propagating rabies virus in Vero cells grown in a stirred bioreactor under fully animal component free conditions. Vaccine. 2007; 25:3879–89.
33. Satoru Y., Akira N., Tadasuke A. Human Fab antibody gene cluster for effectively neutralizing rabies virus. Patent JP № 2006166905. IPC C12N15/09, 29.06.2006.
34. Wilde H., Chomchey P., Prakongsri S., Puyaratabanhu, Chutivongse S. Adverse effects of equine rabies immune globulin. Vaccine. 1989; 7:10–11.
35. Wilde H., Khawplod P., Hemachudha T., Sitprija V. Postexposure treatment of rabies infection: can it be done without immunoglobulin? Clin. Infect. Dis. 2002; 34:477–80.
36. WHO Expert Consultation on Rabies: first report. WHO technical report series 931. Geneva; 2004. 121 p.
37. Yunde H., Shizen Zh., Mifang L. Humanized genetically engineered neutralizing antibody of rabies virus. Patent CN № 1355253. IPC C07K16/08. 26.06.2002.

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

1. Abramova E.G., Nikiforov A.K., Lobovikova O.A., Eremin S.A., Vasin Yu.G., Mikheeva T.A. et al. [Heterologous anti-rabies immunoglobulin – results of the first five years of production]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; 105:58–62.
2. Babkin M.V., Stegny B.T., Nichik S.A., Prokhoryatova E.V., Kucheryavenko R.A., Godovsky A.V. [Method of obtainment of hyper-immune anti-rabies serum]. UA Patent 19403.
3. Generalov S.V., Abramova E.G., Nikiforov A.K., Khramkova E.M., Shepelev I.A., Savitskaya L.V. et al. [F(ab')₂-fragments of anti-rabies immunoglobulin production using immobilized pepsin]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2008; 97:53–6.
4. Kaplan M.M., Koprovsky Kh., editors. [Methods for Laboratory Investigations of Rabies Virus]. Geneva: WHO; 1975. 360 p.
5. Karpov S.P., Preger S.M., Sinelnikov G.E., Fedorov Yu.V. [Hyper-Immune Sera]. Tomsk; 1976. 380 p.
6. Nagieva F.G., Bektemirova M.S., Matevosyan K.Sh., Bektemirov T.A., Pile E.R. [Reproduction of the fixed rabies virus in the culture of quail fibroblasts that grow in suspension]. Vopr. Virusol. 1980; 4:429–31.
7. Nedosekov V.V., Slivko I.A., Kurinnov V.V., Lunitsin A.V., Grudev K.N. [Method of obtainment of hyper-immune antirabic serum]. RF patent 2196607.
8. Selimov M.A. [Rabies Virus]. M.: Meditsina; 1978. 336 p.
9. Sitnik N.P., Zagidullin N.V., Ibrafilov A.G., Enikeeva L.F., Mukhacheva A.V., Shafeeva R.S. et al. [Method of obtainment of highly specific heterologous anti-rabies serum]. RF patent 2322503.
10. Sitnik N.P., Ibrafilov A.G., Zagidullin N.V., Alsynbaev M.M., Timerbaeva R.Kh. [Preparation of heterologous anti-rabies immunoglobulin for intravenous and intramuscular injections, and method of its obtainment]. RF patent 2339401.
11. Tikhonov I.V., Ruban E.A., Gryazneva T.N. [Biotechnology]. St. Petersburg.: GIORД; 2005. 792 p.
12. Shafeeva R.S., Frolova A.V., Mullagulova M.N. [Production of concentrated purified cultural anti-rabies vaccine within the frames of experiment on the basis of transferred Vero cells]. In: [Role of Immunobiological Preparations in Modern Medicine]. Ufa; 1995. Vol. 1. P. 191–4.

Authors:

Generalov S.V., Abramova E.G., Nikiforov A.K., Matveeva Zh.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Матвеева Ж.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 15.10.10.

И.М.Жулидов, Е.Г.Абрамова, А.К.Никифоров, М.В.Антонычева, И.В.Шульгина, О.А.Лобовикова, Н.И.Вахрушина, А.Д.Белоусов, С.А.Еремин, М.Н.Киреев, Н.А.Шарапова, Л.В.Савицкая, Т.А.Михеева, Л.Н.Минаева, М.В.Галкина, Р.А.Свинцов, Т.В.Аленкина, Ю.Г.Васин, Г.В.Базлов

БЕЗОТХОДНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ПРОИЗВОДСТВЕ ГЕТЕРОЛОГИЧНОГО АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА

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

Предложен комплексный подход к утилизации отходов производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина – эритроцитарной массы, фибрина, спиртосодержащего стока. Методом десорбции с поверхности эритроцитов выделен специфический иммуноглобулин. Выявлено, что дополнительный выход иммуноглобулина после обработки эритроцитов неионными детергентами составляет от 10 до 19 %. Из высушенной методом распыления эритроцитарной массы получена ценная белковая подкормка для лошадей-производителей. Из фибрина методом ферментативного гидролиза получена питательная основа для изготовления микробиологических сред. В результате масштабированного выращивания штаммов *Vibrio cholerae* способом глубинного культивирования установлено, что показатель эффективности сред на основе гидролизата фибрина в 1,5–2 раза выше по сравнению со средами на основе гидролизата мяса и казеина. Разработана технология регенерации этилового спирта после цикла риванол-спиртового осаждения гамма-глобулина. Объемная доля этилового спирта после регенерации составила (93 ± 1) %. Показано, что восстановленный спирт пригоден в качестве осадителя при фракционировании антирабической сыворотки. Таким образом, разработанные технологии позволяют утилизировать отходы производства антирабического иммуноглобулина и предусматривают дальнейшее использование продуктов переработки в производстве МИБП.

Ключевые слова: гетерологичный антирабический иммуноглобулин, отход производства, эритроциты, гидролизат фибрина, питательная среда, регенерация, десорбция.

I.M.Zhulidov, E.G.Abramova, A.K.Nikiforov, M.V.Antonycheva, I.V.Shul'gina, O.A.Lobovikova, N.I.Vakhrushina, A.D.Belousov, S.A.Eremin, M.N.Kireev, N.A.Sharapova, L.V.Savitskaya, T.A.Mikheeva, L.N.Minaeva, M.V.Galkina, R.A.Svintsov, T.V.Alenkina, Yu.G.Vasin, G.V.Bazlov

Non-Waste Alternative Technologies in the Production of Heterologous Anti-Rabies Immunoglobulin

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Presented is a comprehensive approach to utilization of the wastes that appear in the process of heterologous anti-rabies immunoglobulin production (packed red cells, fibrin, and alcohol-containing products). Specific immunoglobulin is extracted from the surface of red blood cells using desorption technique. Additional yields of immunoglobulin after exposure of erythrocytes to non-ionic detergent amount to 10–19 % of the output. Rich protein supplement feeding for horses-producers is obtained from spray-dried packed red cells. Solid nutritious substrate for microbiological media production is obtained from fibrin using enzymic hydrolysis method. The efficiency of the fibrin hydrolysate-based media is 1.5–2 times higher in comparison with that of the media based on the digest of meat and casein, as demonstrated by the results of *Vibrio cholerae* scaled cultivation. Furthermore, worked out is the technology of ethanol regeneration after the rivanol-ethanolic precipitation of gamma globulin, alcohol content by volume being (93 ± 1) % after the regeneration. It is demonstrated that the regenerated alcohol can be used as a precipitator in the process of anti-rabies serum fractioning. All in all, the developed techniques make it possible to utilize the wastes of anti-rabies immunoglobulin production and provide for further use of derivatives while producing medical immunobiological preparations.

Key words: heterologous anti-rabies immunoglobulin, wastes, erythrocytes, fibrin hydrolysate, nutrient medium, regeneration, desorption.

Проблема охраны окружающей среды от загрязнения отходами в последние десятилетия привлекает все большее внимание. На предприятиях Российской Федерации ежегодно образуется около 7 млрд т твердых и 90 млн т токсичных промышленных отходов, из которых 87 млн т относятся к III и IV классам опасности. Количество отходов потребления, или твердых бытовых отходов (ТБО), ежегодно возрастает в России на 30 млн т. После вступления в силу Федерального закона от 27.12.2002 г. № 184-ФЗ «О техническом регулировании» идет процесс наработки общих и специальных технических регламентов. Одним из серьезных вопросов, требующих должного отражения в регламентируемых документах, является решение

вопросов обращения с отходами производства.

На предприятиях по производству медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП) образуется значительное количество отходов, в том числе биологических, которые перерабатываются в незначительной степени и используются в качестве кормовых добавок или утилизируются как отходы производства и вывозятся на полигон ТБО, что способствует ухудшению экологической обстановки.

Проблему утилизации некоторых отходов производства МИБП пытались решить во Всесоюзном государственном научно-исследовательском институте контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов, где была разработана техно-

логия выделения белков – серопротеина и альбумина из отходов глобулинового производства с помощью полиэтиленгликолевого метода для получения гидролизатов. Доказана возможность использования отходов вакцинно-сывороточного производства (туши животных, лошадиные эритроциты, фибрин, «отработанные» куриные эмбрионы) в качестве основы питательных сред для культивирования микроорганизмов [7, 11, 12]. Из отхода производства холерной вакцины был выделен ферментный комплекс для получения гидролизата белкового сырья [3]. В литературе описан упрощенный и удешевленный способ выделения С4 и С3 компонентов комплемента человека из отходов промышленного фракционирования плазмы крови по Кону [4, 5]. Из отходов промышленного фракционирования человеческой плазмы был получен противогерпетический иммуноглобулин человека, состоящий на 97 % из IgG [2]. Имеются данные о получении трансфер-факторного препарата «Аффинолейкин» из лейкоцитарной массы – не утилизируемого отхода производства альфа-интерферона человека [6].

Однако комплексные программы по утилизации основных типов отходов, образующихся в процессе производства МИБП, в частности, гетерологичного антирабического иммуноглобулина (АИГ), в литературе не описаны.

Целью работы явилась разработка эффективных, ресурсосберегающих и экономичных методов переработки отходов производства АИГ за счет внедрения оригинальных биотехнологических способов.

Материалы и методы

В работе использовали отходы производства гетерологичного АИГ – фибрин и эритроцитарную массу из гипериммунной сыворотки крови лошадей-продуцентов, а также спиртосодержащий сток после риванол-спиртового осаждения гамма-глобулина.

Фибрин образуется на этапе дефибринации из иммунной плазмы крови лошадей. Плазму смешивали с 30 % раствором кальция хлорида из расчета 2,6 см³ на 1 дм³ плазмы и выдерживали в течение 18 ч при температуре (6±2) °С. Сгусток фибрина разрушали с помощью гомогенизатора и отделяли на сепараторе АСГ-3М при (9000±200) об./мин.

Гидролизат фибрина для использования в качестве основы питательных сред готовили методом ферментации фаршем из поджелудочной железы КРС [12]. Физические свойства и химический состав гидролизата фибрина определяли по методикам, изложенным в Государственной Фармакопее (ГФ) Российской Федерации XII, ч. 1, ФС 42-3874-99 «Физико-химические, химические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов», МУК 4.1/4.2588-96 «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям» и МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических пита-

тельных сред».

Биологические показатели питательной среды контролировали в соответствии МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза».

Эффективность применения питательных сред, приготовленных на основе гидролизата фибрина, оценивали по результатам экспериментального масштабированного выращивания производственных штаммов *Vibrio cholerae* O1 М-41 и *V. cholerae* не O1 105. Выращивание микроорганизмов в жидкой питательной среде из гидролизата фибрина проводили способом глубинного культивирования с принудительной аэрацией, перемешиванием и подкормкой 40 % раствором глюкозы.

Эритроцитарную массу высушивали методом распыления на установке КЯУЛ 101325.002. Для выделения иммуноглобулина с поверхности эритроцитов использовали метод десорбции [8]. В десорбционных растворах и полученном из них иммуноглобулине определяли содержание белка биуретовым методом и его однородность – электрофоретически на пленках из ацетатцеллюлозы согласно ФС 42-3874-99, а также значение рН потенциометрическим методом согласно ГФ XII, ч. 1.

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

Уровень специфической активности десорбированного АИГ и иммуноглобулина, выделенного с использованием регенерированного этилового спирта, определяли двумя способами: *in vivo* – биологическим методом в реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах [15], и *in vitro* – в дот-иммуноанализе [14]. Статистическую обработку результатов реакции нейтрализации проводили по методу Reed и Muench [15].

Спиртосодержащий отход (фугат) собирали в накопитель на конечном этапе выделения гамма-глобулина после прохождения смеси фильтрата антирабической сыворотки и 25 % этилового спирта через сверхцентрифугу СГО 100 и перерабатывали на сконструированной оригинальной регенерационной установке. Определение концентрации этилового спирта проводили ареометрическим методом на ареометре АСП-3 с погрешностью спирта по объему 0,5 %.

Результаты и обсуждение

Согласно биотехнологической схеме получения гетерологичного АИГ, на этапе взятия гипериммунной крови у лошадей-продуцентов отходом являются форменные элементы крови, в том числе эритроциты; на этапе фракционирования – фибрин, получаемый из иммунной плазмы; после осаждения гамма-глобулина риванол-спиртовым методом – спиртосодержащий сток. Данная схема не предусматривает

переработку вышеперечисленных отходов и они уничтожаются путем сжигания эритроцитов, вывоза фибрина на свалку ТБО и сброса спиртосодержащих стоков в очистные сооружения. Между тем, первые два отхода являются ценными биологическими продуктами и могут быть использованы в качестве пищевой подкормки для продуцентов и дополнительного источника выхода иммуноглобулинов [1, 8, 13], а также в производстве питательных сред [9, 10]. Регенерированный этиловый спирт может применяться в производстве АИГ в качестве осадителя гамма-глобулиновой фракции или дезинфектанта.

Предложенный нами комплексный подход к утилизации отходов производства АИГ включает в себя как их переработку, так и дальнейшее использование продуктов переработки в производстве препарата. Так, для получения качественной белковой подкормки продуцентов была разработана биотехнологическая схема высушивания эритроцитарной массы методом распыления на установке марки КЯУЛ 101325.002, где высокая температура обеспечивается нагнетаемым в сушильную камеру горячим воздухом. В ходе экспериментов подобран оптимальный температурный режим высушивания эритроцитов, предохраняющий их от обугливания: на входе в камеру – 120 °С, на выходе – 95 °С. Для лучшей адсорбции эритроцитов на наполнителе был подобран оптимальный размер фторопластовых частиц, который соответствовал $(0,4 \pm 0,1)$ см³ и обеспечивал эффект «псевдокипящего слоя» при конвекционной сушке. Предварительно перед высушиванием проводили разбавление сырца-эритроцитарной массы водой, очищенной до конечной концентрации 20 %. Скорость высушивания составила 5 кг/ч из расчета по сухой массе. Получены 3 экспериментальные серии сухих эритроцитов общим весом 19,2 кг из 300 дм³ жидкой эритроцитарной массы.

Второе направление использования эритроцитов иммунной крови продуцентов связано с их высокой сорбционной емкостью. Опыт производств МИБП (столбнячных, дифтерийных, стафилококковых сывороток и иммуноглобулинов) свидетельствует, что эритроциты крови с сорбированными на их поверхности белками могут являться резервным источником дополнительных количеств специфических иммуноглобулинов. Использование метода десорбции позволяет увеличить выпуск МИБП на 20–35 %. Для обработки эритроцитарной массы предложен метод десорбции с использованием неионных детергентов Tween 80 и Span 20 с последующим выделением гамма-глобулина риванол-спиртовым методом. Показано, что оптимальным является десорбционный раствор, содержащий 0,9 % натрия хлорида с 0,5 % неионного детергента Tween 80 (рН 8,2). Были получены три экспериментальные серии АИГ, десорбированного с поверхности эритроцитов. При изучении основных качественных характеристик десорбированного иммуноглобулина зарегистрированы показатели, соответствующие таковым в фармакопейной

статье на коммерческий препарат АИГ. Так, значение специфической активности препарата серии № 1, выявленное *in vivo*, составило 345 МЕ/мл (титр антител – 1:3094) при участии в реакции 527 LD₅₀ вируса бешенства, в то время как фармакопейный показатель составляет не менее 150 МЕ/мл при участии в реакции 100–1000 LD₅₀; активность, определенная *in vitro* в иммунозолотом анализе, соответствовала титру 1:5000 для серий № 1, 2 и 1:2500 для серии № 3 (активность коммерческого АИГ в иммунозолотом анализе 1:2500–1:10000). Содержание белка в препарате экспериментальных серий № 1–3 составило $(9,1 \pm 0,1)$ %, что также соответствовало регламентируемому показателю – $(10,0 \pm 1,0)$ %. Результаты электрофореза подтвердили однородность десорбированного иммуноглобулина – была получена практически 100 % фракция гамма-глобулина без примесей альбумина, α , β -глобулинов.

Следовательно, для увеличения выпуска антирабического иммуноглобулина без повышения численности лошадей-продуцентов имеется резерв – иммуноглобулины, сорбированные на поверхности форменных элементов иммунной крови. Выявлено, что дополнительный выход иммуноглобулина после обработки эритроцитов десорбирующим раствором составляет от 10 до 19 %.

Еще одним отходом после фракционирования гипериммунной плазмы является фибрин – ценнейшее белоксодержащее сырье. Фибрин содержит полноценный по аминокислотному составу белок, близкий к белку мышечной ткани – миозину, а также необходимые для питания бактерий соли натрия, калия, железа, фосфора, кальция. В отличие от белков мяса животных, фибрин состоит только из аминокислот и свободен от небелковых включений, что ускоряет расщепление белков на аминокислоты. В связи с этим вполне обосновано использование фибрина как альтернативы мясному сырью и казеину для изготовления питательных сред.

Для получения питательной основы фибрин подвергали гидролизу ферментами поджелудочной железы крупного рогатого скота при рН $(8,0 \pm 0,1)$. Предварительно проводили термическую обработку фибрина при 100 °С в течение 30 мин и для лучшей денатурации белка применяли механическое измельчение. Содержание аминного азота в гидролизате фибрина составило от 0,5 до 0,7 %. Физико-химические показатели экспериментальной и контрольных основ представлены в таблице.

Полученный гидролизат использовали в качестве основы для приготовления питательных сред. По физико-химическим и биологическим показателям питательные среды на основе гидролизата фибрина при выращивании на них тест-штаммов холерного вибриона и чумного микроба удовлетворяли требованиям МУК 4.2.2316-08.

Об эффективности применения питательных сред, приготовленных на основе гидролизата фибрина, свидетельствуют данные экспериментального

Сравнительная характеристика физико-химических свойств белковых гидролизатов

Показатель	Гидролизат фибрина (экспериментальные серии)	Гидролизат мяса КРС (производственные серии)	Гидролизат казеина (производственные серии)
Описание	Прозрачная жидкость темно-коричневого цвета	Прозрачная жидкость темно-коричневого цвета	Прозрачная жидкость темно-коричневого цвета
Сухой остаток, %	6,06±1,16	8,05±0,99	10,27±0,62
Пептон, %	1,84±0,12	2,49±0,93	2,51±0,11
Углеводы, мкг	425±0,00	*	*
Железо, мкг	393±12	404±171	438±138
Фосфор неорганический, %	0,03±0,01	0,05±0,01	0,045±0,01
Фосфор общий, %	0,048±0,01	0,08±0,02	0,1±0,005
Хлориды, %	0,26±0,01	0,08±0,00	*
Кальций, %	0,0005±0,00	0,0018±0,0006	0,01±0,00
Магний, %	0,0022±0,0002	0,0032±0,0021	0,017±0,02
Общий азот, %	1,1±0,17	1,16±0,12	1,43±0,11
Аминный азот, %	0,56±0,11	0,72±0,08	0,93±0,11
% расщепления белка	48,55±4,02	61,83±3,17	64,13±2,15

*Не определяли.

масштабированного выращивания производственных штаммов *V. cholerae* O1 M-41, используемого для изготовления холерной вакцины, и *V. cholerae* не O1 105, применяемого в качестве адсорбента при производстве холерной диагностической агглютинирующей сыворотки O1. При культивировании *V. cholerae* не O1 105 в ферментере объемом 0,250 м³ с использованием среды из гидролизата фибрина показатель эффективности составил 40 млрд м.к./мл, тогда как на традиционной среде из гидролизата мясного сырья – 18 млрд м.к./мл. При культивировании *V. cholerae* O1 M-41 в ферментере объемом 0,5 м³ на среде из гидролизата фибрина этот показатель имел значение 158 млрд м.к./мл, в то время как на традиционной среде из казеинового гидролизата – 111,4 млрд м.к./мл. Следовательно, показатель эффективности сред, полученных на основе гидролизата фибрина, в 1,5–2 раза выше по сравнению со средами, полученными на основе гидролизата мяса и казеина.

Если учесть, что для производства 100 дм³ питательной среды требуется 40 дм³ гидролизата фибрина, а за год от 80 лошадей возможно получить свыше 200 кг фибрина или 200 дм³ питательной основы, то, используя данный отход, можно ежегодно производить не менее 500 дм³ питательного бульона для глубинного культивирования микроорганизмов.

Переработку еще одного отхода производства АИГ – спиртосодержащего стока, образующегося после осаждения гамма-глобулина 96 % этиловым спиртом, проводили на оригинальной регенерационной установке, сконструированной на базе емкости-реактора РЗРЯ рн-6/0,63-1нж. Процесс регенерации спиртосодержащего отхода (фугата) проводили при максимальной температуре кипения 98 °С, в дефлегматоре на всем протяжении цикла температуру поддерживали в пределах (78,5±0,5) °С. Производительность регенерационной установки – (7±0,5) л/ч. Объемная доля этилового спирта после

процесса регенерации составила (93±1) %. Первые 3–5 дм³ легколетучих фракций (хлороформсодержащие соединения) и остатки после регенерации с 1 % содержанием спирта утилизировали в очистные сооружения.

Восстановленный спирт использовали в качестве осадителя при экспериментальном фракционировании антирабической сыворотки. АИГ трех экспериментальных серий, полученных с использованием регенерируемого спирта, по основным показателям полностью соответствовал требованиям спецификации на препарат.

За год при производстве АИГ образуется свыше 16000 дм³ спиртосодержащих стоков, из которых возможно получить методом регенерации более 2900 дм³ 92–94 % этилового спирта.

Таким образом, разработаны схемы переработки отходов производства АИГ – эритроцитарной массы, фибрина и спиртосодержащих стоков. Показано, что продукты переработки отходов могут быть включены в биотехнологическую схему производства АИГ, а также служить сырьем для производства питательных сред. Помимо экономических приоритетов, настоящие разработки имеют и другие значимые аспекты, так как ведут к снижению экологической нагрузки на окружающую среду.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Емельянов Б.А., Чепулис Г-К.С., Соколов Я.А. Способ получения иммуноглобулинов. Патент РФ № 2128508.
2. Кострова О.М., Алешкин В.А. Способ получения препарата противогерпетического иммуноглобулина человека. Патент РФ № 2051054.
3. 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.
4. Матвеевская Н.С., Алешкин В.А. Способ выделения С4-компонента комплемента человека. Патент РФ № 94025651.
5. Матвеевская Н.С., Алешкин В.А. Способ выделения фрагмента 3СД компонента С3 комплемента человека. Патент РФ № 2068694.
6. Мац А.Н., Перепечкина Н.П., Воейкова Е.С., Райхер Л.И.,

Райхер И.И., Старкова Б.А., Пархоменко Т.Г., Майчук Ю.Ф., Позднякова В.В. Способ получения препарата «Аффинолейкин» для противоинойфекционной иммунотерапии. Патент РФ № 2076715.

7. Николаева Г.И. Опыт применения гидролизатов ферментных элементов крови в вакцинном производстве. Ученые записки Казанского Ветеринарного Института им. Н.Э.Баумана. 1976; 123:64–8.

8. Перишин Б.Б., Кузьмин С.Н., Филатов Н.Н. Сорбированные иммуноглобулины животных – резерв для увеличения выпуска лечебных антитоксических и диагностических сывороток. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1994; 4:96–100.

9. Равилов А.З., Гильмутдинов Р.Я., Хусаинов М.Ш. Микробиологические среды. Казань: Фен; 1999. 398 с.

10. Раскин Б.М. Отечественные сухие питательные среды и перспективы их разработки. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1985; 5:25–32.

11. Ситков В.И., Заерко В.И., Сурмило А.П., Тутов И.К., Колпакова Р.Г. Способ получения гидролизатов и использование их при изготовлении питательных сред для культивирования микроорганизмов. Патент РФ № 2103345.

12. Телишевская Л.Я. Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение. Аграрная наука. 2000; 295 с.

13. Файвишевский М.Л. Переработка крови убойных животных. М.: Колос; 1993. 726 с.

14. Шаропова Н.А., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К. и др. Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе. Пробл. особо опасных инф. 2010; 1(103):63–6.

15. Meslin F.-X., Kaplan M.M., Koprowski H., editors. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva: WHO; 1996. 469 p.

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

1. Emel'yanov B.A., Chepulis G.K.S., Sokolov Ya.A. [Method of immunoglobulin obtainment]. RF Patent № 2128508.

2. Kostrova O.M., Aleshkin V.A. [Method of obtainment of the humanized zoster immunoglobulin preparation]. RF Patent № 2051054.

3. 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. Nutrient medium for *Yersinia* and *Vibrio* microorganism cultivation]. Patent № 2360962.

4. Matveevskaya N.S., Aleshkin V.A. [Method of segregation of C4 component of the human complement]. RF Patent № 94025651.

5. Matveevskaya N.S., Aleshkin V.A. [Method of segregation of the 3CD component of C3 human complement]. RF Patent № 2068694.

6. Mats A.N., Perepechikina N.P., Voeikova E.S., Raikher L.I., Raikher I.I., Starkova B.A., Parkhomenko T.G., Maichuk Yu.F., Pozdnyakova V.V. [Method of obtainment of "Affine-endolysin" preparation for anti-infective immune therapy]. RF Patent № 2076715.

7. Nikolaeva G.I. [Experience in Application of Blood Corpuscle Hydrolysates in the Process of Vaccine Production]. Uch. Zapiski N.E. Bauman Kazan Vet. Institute. 1976; 123:64–8.

8. Pershin B.B., Kuz'min S.N., Filatov N.N. [Immobilized animal immunoglobulins as a reserve supply for the increase in output of therapeutic anti-toxin and diagnostic sera]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1994; 4:96–100.

9. Ravilov A.Z., Gil'mutdinov R.Ya., Khusainov M.Sh. [Microbiological Media]. Kazan: Fen; 1999. 398 p.

10. Raskin B.M. [Domestic dry nutrient media and their future developments]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1985; 5:25–32.

11. Sit'kov V.I., Zaerko V.I., Surmilo A.P., Tutov I.K., Kolpakova R.G. [Method of hydrolysate obtainment and its use in the process of nutrient media production for microorganism cultivation]. RF Patent № 2103345.

12. Telishevskaya L.Ya. [Protein Hydrolysates. Obtainment, Chemical Composition/Formula, Application]. Agramaya Nauka. 2000; 295 p.

13. Faivishvsky M.L. [Blood Processing of Slaughter Animals]. M.: Kolos; 1993. 726 p.

14. Sharapova N.A., Abramova E.G., Nikiforov A.K. et al. [Determination of the activity of the anti-rabies sera and heterologous anti-rabies immunoglobulin *in vitro* in the dot immunoassay]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; 103:63–6.

Authors:

Zhulidov I.M., Abramova E.G., Nikiforov A.K., Antonycheva M.V., Shul'gina I.V., Lobovikova O.A., Vakhrushina N.I., Belousov A.D., Eremin S.A., Kireev M.N., Sharapova N.A., Savitskaya L.V., Mikheeva T.A., Minaeva L.N., Galkina M.V., Svintsov R.A., Alenkina T.V., Vasin Yu.G., Bazlov G.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

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

Поступила 11.11.10.

С.Т.Жолдошов**ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ
В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ***Институт медицинских проблем Южного отделения Национальной академии наук,
Кыргызская Республика*

Проведен анализ 217 случаев заболевания кожной формой сибирской язвы. Представлены результаты изучения особенностей клинического течения сибирской язвы и эпидемических проявлений этой инфекции на юге Кыргызстана.

Ключевые слова: сибирская язва, клиника, диагностика, лечение.

S.T.Zholdoshev**Peculiarities of Anthrax Clinical Manifestations in the Current Context***Institute of Medical Problems of the South Branch of National Academy of Science, Kyrgyz Republic*

Carried out is the analysis of 217 cases of cutaneous anthrax. Displayed are the results of investigation of peculiarities of anthrax clinical progression and epidemic manifestations in the South of Kyrgyz Republic.

Key words: anthrax, clinical picture, diagnostics, treatment.

Сибирская язва широко распространена в странах Азии, Африки и Южной Америки. Ежегодно в мире регистрируется от 20 до 100 тыс. случаев заболеваний людей. Преобладает кожная форма болезни, однако возможны септическая, легочная, кишечная [1, 2, 3, 4, 5].

Территория юга Кыргызстана исторически является неблагополучной по сибирской язве [5]. В последние годы в южных областях республики (Ошская, Жалал-Абадская, Баткенская) регистрируется от 20 до 77 случаев заболеваний сибирской язвой среди людей в год. Учитывая клиническую картину заболевания (в основном, кожные проявления), больные нередко обращаются за медицинской помощью к хирургам, дерматовенерологам, целителям.

Целью исследования является клинико-эпидемиологический анализ 217 случаев заболевания кожной формой сибирской язвы.

Материалы и методы

Анализ клинических проявлений кожной формы сибирской язвы был проведен на основании наблюдения за 217 больными с данной нозологией в возрасте от 15 до 70 лет, находившихся на стационарном лечении в медицинских учреждениях в южных областях Кыргызстана с 1999 по 2009 год. При клиническом обследовании и оценке тяжести состояния больных использовали общепринятые критерии, особое внимание обращали на характер выраженности основных симптомов: продолжительность лихорадки, наличие отека, размер язвы, серозное отделяемое, срок отторжения струпа, продолжитель-

ность лимфаденита [1, 3, 4]. У 136 (62,7 %) больных кожной формой сибирской язвы удалось выделить из сибиреязвенных карбункулов *B. anthracis*. Забор материала (серозно-кровянистое содержимое из-под струпа, отделяемое из свежих дочерних пузырьков вокруг язвы) производился стерильной пипеткой на 1–2-й день госпитализации и на 3–4-й день после отмены антибиотиков. Выделенные микроорганизмы идентифицировали, производили пересев и проводили исследование чувствительности к антибиотикам унифицированным диско-диффузным методом. Эпидемиологический анализ проводился по таким показателям, как территориальное распределение заболеваний, сезонность, половой и возрастной состав заболевших.

Результаты и обсуждение

Анализ 217 случаев заболеваний людей кожной формой сибирской язвы показал, что независимо от эпидемиологической ситуации чаще болеют люди в возрасте от 18 до 50 лет (76,9 %) и от 51 до 60 лет (17,2 %). Причем среди заболевших преобладают лица мужского пола (90,3 %). По социальному составу больные распределились следующим образом: 73 (33,6 %) – рабочие, 21 (9,7 %) – пенсионеры и домохозяйки, 64 (29,5 %) – животноводы, 59 (27,2 %) – фермеры и арендаторы.

Из 217 пациентов у 214 (99,1 %) установлен источник возбудителя инфекции. Заражение произошло во время участия в прирезке крупного и мелкого рогатого скота – 67 (30,9 %), разделки туш животных – 51 (23,5 %), обработке внутренних орга-

нов – 22 (10,1 %), при контакте с сырым мясом – 59 (27,2 %), шкурами животных – 13 (5,9 %), почвой – 2 (0,9 %). Заболеваемость сибирской язвой на юге Кыргызстана имеет выраженную летне-осеннюю сезонность. Большинство (73,9 %) случаев заболевания приходится на июль, август и сентябрь.

Из 217 больных 171 (78,8 %) был госпитализирован в стационар в течение первых 4 дней болезни, 46 (21,9 %) – на 5–6-й день. С диагнозом сибирская язва поступило 69 (31,8 %) больных, с другими диагнозами (фурункул, флегмона, рожа, абсцесс, инфицированная рана, сепсис и др.) – 33 (15,2 %) больных. Самолечением занимались 42,0 % больных сибирской язвой, амбулаторную помощь с хирургическим вмешательством до госпитализации в стационар получили 13,7 % больных, к целителям обращались 11,6 % больных сибирской язвой.

Легкое течение кожной формы сибирской язвы наблюдалось у 158 (72,8 %) больных и характеризовалось нормальной или субфебрильной температурой тела, удовлетворительным общим состоянием, наличием незначительного отека мягких тканей в области карбункула. При среднетяжелом течении заболевания (37 больных – 17,1 %) отмечались повышение температуры тела до 38–38,5 °С, отек мягких тканей, увеличение регионарных лимфатических узлов, умеренно выраженные явления интоксикации (умеренная тахикардия, тахипноз, головная боль и др.). Тяжелое течение болезни (22 больных – 10,1 %) проявлялось выраженными нарушениями общего состояния (головной болью, тошнотой, рвотой, тахикардией) лихорадкой до 39–39,3 °С и выше, наличием обширного отека тканей.

Размеры карбункулов соответствовали тяжести течения болезни. Сроки отторжения струпа коррелировали с тяжестью основного процесса. Появление отека на 1-й день болезни отмечено у 43,3 % больных, на 2-й – у 39,2 %, на 3–5-й – у 17,5 %. При этом отмечена четкая зависимость сроков появления отека и тяжести течения болезни. Увеличение регионарных лимфатических узлов наблюдалось у 58,8 % больных и отсутствовало у 41,2 % больных, у 13 (6,7 %) отмечены явления лимфангоита. Установлено, что частота лимфаденита находится в прямой зависимости от тяжести заболевания: при легком течении болезни лимфаденит наблюдался у 49,3 % больных, при средней тяжести – у 58,5 %, при тяжелом течении – у 69,1 %. У 31 % больных заболевание протекало с нормальной температурой, у 51,6 % больных повышение температуры тела наблюдалось в пределах от 37,1 до 38,0 °С и лишь у 17,4 % больных – до 40,0 °С и выше.

При легких формах назначали бензилпенициллин по 500000–1000000 ЕД внутримышечно 6 раз в сутки в течение 5–7 дней. При среднетяжелом и тяжелом течении дополнительно назначали инфузионные растворы и средства патогенетической терапии.

У 76 (30,8 %) больных диагноз сибирской язвы был подтвержден антраксиновой пробой, у

95 (43,8 %) – бактериологическим методом, у 55 (25,3) – бактериологически и антраксиновой пробой, у 21 (9,7 %) – клинико-эпидемиологическим методом. При этом в первые 3 дня болезни положительная реакция на введение антраксина отмечена у 47,0 % больных, на 2-й неделе – у 74,0 %. В то же время положительные результаты при бактериологических исследованиях на 1-й неделе от начала заболевания были отмечены у 43,9 % больных, на 2-й неделе – у 17,6 %.

У 215 из 217 больных заболевание протекало с развитием на коже типичного сибиреязвенного карбункула, представляющего собой очаг коагуляционного некроза в месте входных ворот инфекции с резко выраженной экссудацией серозно-геморрагической жидкости в окружающие ткани, сопровождающейся явлениями отека и лимфаденитом.

Все случаи кожной формы сибирской язвы, сопровождавшиеся с первых дней заболевания образованием карбункула с последующим или одновременным развитием отека и лимфаденита, выделены нами как карбункулезная разновидность кожной формы.

У 5 (2,3 %) больных заболевание началось не с образования карбункула, а с развития обширного отека тканей. И только некоторое время спустя в области наиболее выраженного отека появились симптомы некроза кожи и подкожной клетчатки. Тяжелое течение этой клинической разновидности, отсутствие видимого типичного карбункула и развитие обширного отека с последующим некрозом резко отличает эти случаи от обычной клиники кожной формы, что позволило нам выделить эризипелоидную разновидность кожной формы. У 9 больных, заболевание у которых протекало в форме, напоминающей карбункулезную, на месте входных ворот инфекции имело место развитие пузырей, наполненных геморрагической жидкостью. Эта форма заболевания в дальнейшем описана нами как буллезная разновидность кожной формы сибирской язвы.

Установлено, что зоны локализации карбункулов охватывают преимущественно открытые области тела, которые поражаются неодинаково. Существуют участки, через которые заражение происходит наиболее часто (пальцы рук, кисти, предплечья, плечи, локтевые суставы). Не было случаев поражения волосистой части головы. Локализация единичных карбункулов по отдельным областям тела была следующей: верхние конечности – 210 случаев (96,7 %), шея – 3 (1,2 %), пупок – 2 (0,8 %), брови – 2 (0,8 %).

Первичный аффе́кт в виде плоской, сухой язвы у больных сибирской язвой встречается в 88,7 % случаев; у больных с гнойно-бактериальной инфекцией первичный аффе́кт (100 % случаев) протекает в виде гнойных пустул с некротическим стержнем. Дочерние везикулы в виде симптома «жемчужного ожерелья» встречаются только в 47 % случаев. По количеству карбункулов преобладают единичные – 188 (86,6 %), множественные сибиреязвенные кар-

бункулы отмечены в 29 (13,4 %) случаях.

Таким образом, в результате проведенного анализа 217 случаев заболевания людей кожной формой сибирской язвы установлено, что при локализации сибиреязвенного карбункула в области лица и шеи болезнь протекает тяжелее, чем при поражении кистей рук и нижних конечностей. Заболевания регистрировали только в летний период, больных госпитализировали в стационар начиная с 3 дня болезни. Среди заболевших подавляющее большинство составляют мужчины; обычно отмечается легкое течение болезни.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Володин А.С., Шапошников А.А., Баранов В.И., Кашапов Н.Г., Столяр В.П., Кутуев Ю.И. Медико-экологические и гигиенические аспекты в чрезвычайных ситуациях. Защита здоровья человека от воздействия вредных факторов. М.: ЗАО «МП Гигиена»; 2008. 381 с.
2. Ладный В.И., Ющенко Г.В. Сибирская язва на территории Российской Федерации. Эпидемиол. и инф. бол. 2009; 2:36–40.
3. Лобзин Ю.В., редактор. Руководство по инфекционным болезням. СПб: Фолиант; 2003. С. 142–6.
4. Никифоров В.Н. Кожная форма сибирской язвы у человека. М.: Медицина; 1973. 122 с.

5. Онищенко Г.Г., Васильев Н.Т., Литусов Н.В. и др. Сибирская язва: актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, диагностики, лечения и профилактики. М.; 1999. 447 с.

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

1. Volodin A.S., Shaposhnikov A.A., Baranov V.I., Kashapov N.G., Stolyar V.P., Kutuev Yu. I. [Medical ecological and hygienic issues in emergency situations]. [Protection of Human Health from Exposures to Hazardous Agents]. M.: ZAO "MP Gigena"; 2008. 381 p.
2. Ladny V.I., Yushchenko G.V. [Anthrax in the territory of the Russian Federation]. Epidemiol. Infek. Bol. 2009; 2:36–40.
3. Lobzin Yu. V., editor. [Guidelines on Infectious Diseases]. S-Pb.: Foliant; 2003. P. 142–6.
4. Nikiforov V.N. [Cutaneous Anthrax in Humans]. M.: Meditsina; 1973. 122 p.
5. Onishchenko G.G., Vasil'ev N.T., Litusov N.V. et al. [Anthrax: Pressing Issues of Microbiology, Epidemiology, Diagnostics, Treatment, and Prophylaxis]. M.; 1999. 447 p.

Authors:

Zholdoshev S.T. Institute of Medical Problems of the South Branch of National Academy of Science. Uzgenskaya St., 130-a, Osh, 714018, Kyrgyz Republic. E-mail: saparbai@mail.ru

Об авторах:

Жолдошев С.Т. Институт медицинских проблем Южного отделения Национальной академии наук. Кыргызская Республика, 714018, г. Ош, ул. Узгенская, 130-а. E-mail: saparbai@mail.ru

Поступила 23.03.11.

Е.В.Сазанова, Т.А.Малюкова, А.В.Бойко, Е.В.Растунцева, Е.Ю.Лоцманова, З.С.Юсупова

**ХРОНОМЕТРАЖ КАК СПОСОБ КОНТРОЛЯ ПРИОБРЕТЕНИЯ НАВЫКОВ РАБОТЫ
С ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ
В ПРОЦЕССЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ ПЕРЕПОДГОТОВКИ**

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

В работе предложен подход, позволяющий оценивать успешность освоения методики и выработки навыка вскрытия лабораторных животных лицами, обучающимися на курсах профессиональной переподготовки с освоением приемов безопасной работы с патогенными биологическими агентами I–II групп. Полученные результаты могут быть использованы как основа для планирования практических занятий, составления учебного расписания, совершенствования организации и нормирования работы сотрудников, участвующих в образовательном процессе, обеспечения биобезопасности работ.

Ключевые слова: патогенные биологические агенты I–II групп, вскрытие лабораторных животных, хронометраж, биологическая безопасность.

E.V.Sazanova, T.A.Malyukova, A.V.Boiko, E.V.Rastuntseva, E.Yu.Lotsmanova, Z.S.Yusupova

**Chronometry as a Method to Assess the Formation of Skills Required for Work
with the Agents of Particularly Dangerous Infections in the Course of Professional Retraining**

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

The aim of the study is to assess how successfully the trainees obtain skills of post mortem examination of laboratory animals, with strict observance of the rules of safe work with pathogenic biological agents of I–II groups, during their training at professional retraining courses. Individual continuous chronometry is offered as the assessment method. The obtained results can be used for planning of practical training, drafting the time-table, standardization of work of instructors.

Key words: pathogenic biological agents of I–II groups, post mortem examination of laboratory animals, chronometry, biological safety.

Контроль приобретения теоретических знаний и практических навыков – неотъемлемый этап процесса обучения. Нормативные документы в сфере непрерывного профессионального образования и обеспечения биологической безопасности работ [1], учебные программы регламентируют оценку уровня знаний в виде зачетов, тестирования, решения эпидемиологических и бактериологических задач, заключительного экзамена.

Для совершенствования процесса обучения, составления учебной программы, расписания занятий, решения вопросов, связанных с организацией и нормированием труда преподавателей, лаборантов, дезинфекторов актуальным является изучение затрат времени на проведение слушателями курсов отдельных микробиологических исследований. К наиболее опасным и продолжительным работам с патогенными биологическими агентами (ПБА) относится вскрытие лабораторных животных.

Имеются утвержденные расчетные нормы времени на проведение микробиологических исследований для лабораторий клинической микробиологии (бактериологии) лечебно-профилактических учреждений. Анализ документов показал, что отсутствуют нормы времени на исследование биопробных животных, зараженных возбудителями сибирской язвы, туляремии, холеры, чумы. На исследование биопробных животных, зараженных возбудителем бруцеллеза, в целом отведено 150 мин. Однако этот показатель не определяет временные затраты на от-

дельные этапы исследования, в т.ч. на вскрытие. В нормативном документе также содержится общий показатель «вскрытие лабораторных животных», не позволяющий адекватно судить о виде животного и возбудителя инфекционной болезни. Вместе с тем, требования по обеспечению биобезопасности при вскрытии биопробных животных, зараженных ПБА I–II групп [1] и ПБА III–IV групп [2], различны. Соответственно должны отличаться и временные затраты на выполнение манипуляций.

Целью исследования является изучение динамики продолжительности операций по вскрытию лабораторных животных при освоении методов безопасной работы с возбудителями ООИ у слушателей курсов профессиональной переподготовки.

Для изучения временных затрат был использован хронометраж рабочего процесса [3, 5, 7]. В результате анализа существующих видов хронометража и учета особенностей организации проведения практических занятий для проведения исследований был выбран метод индивидуального непрерывного хронометража с цифровой записью результатов [3, 7].

Хронометраж проводили преподаватели отдела образовательных программ и подготовки специалистов РосНИПЧИ «Микроб», наблюдающие за вскрытием лабораторных животных и соблюдением правил обеспечения биобезопасности работы слушателями курсов. Контрольную группу составили сотрудники РосНИПЧИ «Микроб», владеющие навыками вскрытия лабораторных животных.

Вскрытие лабораторных животных проводили в соответствии с регламентированной методикой [6] с соблюдением требований санитарных правил [1]. Операция включала непосредственно вскрытие, приготовление мазков-отпечатков внутренних органов для окраски по Граму и исследование методом флюоресцирующих антител, посев органов на плотные и жидкие питательные среды.

Освоение методики проводили в несколько этапов:

- вскрытие незараженных лабораторных животных в противочумном костюме IV типа;
- вскрытие незараженных животных в противочумном костюме I типа;
- вскрытие зараженных животных в противочумном костюме I типа.

По полученным данным были рассчитаны среднеарифметические показатели, а достоверность их различий определялась с помощью критерия Стьюдента (t-критерий) [4]. Временные затраты на начальном этапе освоения методики вскрытия лабораторных животных на незараженных белых мышах в противочумном костюме IV типа составили в среднем $(46,9 \pm 12,2)$ мин, что в 2,3 раза превышало средние временные затраты контрольной группы ($p < 0,05$).

Дальнейшее обучение показало приобретение навыка, что было подтверждено результатами вскрытия незараженных животных в противочумном костюме I типа. При этом среднее значение временных затрат сократилось на 36 % и составило $(30 \pm 8,4)$ мин ($p < 0,05$), что, тем не менее, превышало показатель контрольной группы в 1,5 раза ($p < 0,05$).

Практические занятия по лабораторной диагностике возбудителей острых пневмоний, сибирской язвы, чумы включали задания по вскрытию инфицированных лабораторных животных в противочумном костюме I типа по стандартной методике. Среднее значение временных затрат на вскрытие составило $(34,6 \pm 10,1)$ мин, что на 29,4 % меньше начальных результатов при освоении методики ($p < 0,05$). Положительная динамика результатов при условии точного выполнения методики и правил обеспечения биобезопасности работ свидетельствовали о закреплении навыка вскрытия лабораторных животных.

Большие временные затраты, $(40,7 \pm 8,4)$ мин, на вскрытие животных, зараженных *Pasteurella multocida*, обусловлены увеличением объема задания – вскрытие двух белых мышей, из которых одна имела патолого-анатомические изменения, и, соответственно, более длительным пребыванием слушателей курсов в противочумном костюме I типа в блоке для работы с инфицированными животными.

Необходимо отметить ряд недостатков хронометража, влияющих на продолжительность выполнения операции. Во-первых, полученные данные обычно содержат потери времени, связанные с недостатками в организации труда. Во-вторых, необходимо присутствие наблюдателя в непосредственной близости от объекта наблюдения, что является основным усло-

вием процесса обучения, и может оказать негативное психологическое воздействие на слушателя, вызвать проявления нервозности и привести к искажению действительных временных показателей.

Таким образом, сокращение временных затрат на выполнение вскрытия лабораторных животных при соблюдении техники и биобезопасности работ свидетельствует об успешном освоении методики слушателями курсов. Полученные данные являются основой при планировании практических занятий, составлении учебного расписания, совершенствовании организации работ по обеспечению учебного процесса.

С целью совершенствования организации деятельности с ПБА I–II групп целесообразно использование хронометража и других методов расчета норм времени на проведение отдельных микробиологических исследований (операций). Предварительно необходимо разработать стандартные операционные процедуры, учитывающие требования обеспечения биобезопасности и рациональные приемы труда.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безопасность работ с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). Санитарные правила. СП 1.3.1285-03. Бюл. норм. и метод. документов Госсанэпиднадзора. 2003; 3:95–115.
2. Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08. Бюл. норм. и метод. документов Госсанэпиднадзора. 2009; 4:17–66.
3. Гандина Н.М. Экономика и нормирование труда: учебное пособие. И.; 1998. 200 с.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия: Учебное пособие для биологических специальных вузов. 4-е изд. М.; 1990. 352 с.
5. Никонов Б.Ф. Хронометраж. Большая Советская Энциклопедия. 3-е изд. М.; 1978. Т. 28. С. 404.
6. Учебно-методическое пособие по заражению и вскрытию лабораторных животных. Саратов; 2010. 51 с.
7. Яркина Т.В. Основы экономики предприятия. Учебное пособие. М.; 2005. 79 с.

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

1. Safety Work with Microorganisms of I–II Groups of Pathogenicity. Sanitary Rules. SP 1.3.1285-03. Byul. norm. i metod. documen. Gossanepidnadzora. 2003; 3:95–115.
2. Safety Work with Microorganisms of III–IV Groups of Pathogenicity and Agents Causing Parasitic Diseases. Sanitary and Epidemiological Rules. SP 1.3.2322-08. Byul. norm. i metod. documen. Gossanepidnadzora. 2009; 4:17–66.
3. Gandina N.M. [Economics and Labour Rating: Educational Guidance]. I.; 1998. 200 p.
4. Lakin G.F. Biometry. 4 izd. M.; 1990. 352 p.
5. Nikonov B.F. [Chronometry]. Bolshaya Sov. Encyclopedia. 3 izd. M.; 1978. Vol. 28. P. 404.
6. [Handbook on inoculation and post mortem examination of laboratory animals]. Sarov; 2010. 51 p.
7. Yarkina T.V. [Basic Economics of Enterprise]. Ucheb. posob. M.; 2005. 79 p.

Authors:

Sazanova E.V., Malyukova T.A., Boiko A.V., Rastuntseva E.V., Lotsmanova E.Yu., Yusupova Z.S. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrap@microbe.ru

Об авторах:

Сазанова Е.В., Малукова Т.А., Бойко А.В., Растунцева Е.В., Лотсманова Е.Ю., Юсупова З.С. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Поступила 26.10.11.

С.Н.Тихонов, К.А.Ротов, В.В.Алексеев, Е.А.Снатенков

ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ ЛИПОСОМАЛЬНОГО И СВОБОДНОГО ГЕНТАМИЦИНА ПРИ АЭРОГЕННОМ ЗАРАЖЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕМ МЕЛИОИДОЗА

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград

Представлены данные по изучению протективных свойств свободной и липосомальной форм гентамицина при аэрогенном заражении возбудителем мелиоидоза. При сравнительном изучении препаратов выявлено, что иммобилизация гентамицина в липосомы позволила существенно увеличить ED_{50} препарата. Это может быть связано с повышенной сорбцией липосомального препарата паренхиматозными органами, в том числе легкими.

Ключевые слова: мелиоидоз, гентамицин, липосомы.

S.N.Tikhonov, K.A.Rotov, V.V.Alekseev, E.A.Snatenkov

Study of Protective Properties of Gentamicin in Liposome-Entrapped and Free Forms in Case of Aerogenic Melioidosis Infection

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd

Presented are data on investigation of protective properties of free and liposome-entrapped forms of gentamicin against aerogenic infection caused by melioidosis agent. Comparative study identified that immobilization of gentamicin into liposomes increased substantially the ED_{50} of the preparation. This, probably, can be related to higher sorption of liposomal preparation by parenchymal organs including lungs.

Key words: melioidosis, gentamicin, liposomes.

Мелиоидоз – инфекционное заболевание, распространение которого в природе имеет определенные географические границы (регионы с влажным субтропическим климатом). Также, по данным экспертов, возбудитель мелиоидоза – *Burkholderia pseudomallei* – является потенциальным агентом биотерроризма [1, 6, 8]. Сложности лечения мелиоидоза, в первую очередь, обусловлены природной резистентностью возбудителя ко многим антибиотикам. Летальность при несвоевременно начатой терапии у больных септической и легочной формой мелиоидоза превышает 90 %. Ранее нами было показано, что иммобилизация гентамицина в липосомы повышает эффективность лечения экспериментального мелиоидоза [5].

Целью данной работы явилось изучение протективных свойств липосомального и свободного гентамицина при аэрогенном заражении животных возбудителем мелиоидоза.

В липосомы антимикробного препарата определяли микробиологическим методом [4]. Степень окисления липидов липосомальной мембраны (проба Клейна) определяли спектрофотометрически [7]. В эксперименте нами были использованы белые мыши и белые крысы обоего пола по 7 животных в группе, свободную и липосомальную форму препарата вводили животным внутрибрюшинно однократно за 4 ч до заражения в дозах 6,0; 3,0 и 4,26; 2,13 мг соответственно. Контролем служили интактные животные. Экспериментальных животных заражали в динамической камере аэрозольной лаборатории суточной культурой *B. pseudomallei* 100 в дозе 10, 20 и 40 LD_{50} . Наблюдение за животными проводили в течение 30 сут. Об эффективности антибиотиков судили по количеству павших животных, ED_{50} средней продолжительности жизни. Эффективную дозу лекарственного препарата оценивали общепринятым методом [3].

Материалы и методы

Липосомы готовили методом выпаривания и обращения фаз [2] из хроматографически чистых лецитина и холестерина («Serva», Германия) в весовом соотношении 7:3. Материалом для включения внутрь липосом служил гентамицина сульфат (ОАО «Синтез», Курган, Россия). Экструзию липосомального гентамицина проводили через поликарбонатные мембраны с размером пор 100 нм. Средний размер и однородность по размеру липосом определяли методом электронной микроскопии (инструментальное увеличение – 120000). Количество включенного

Результаты и обсуждение

Нами проведено изучение протективных свойств липосомального и свободного гентамицина сульфата при аэрогенном заражении белых мышей возбудителем мелиоидоза. Однократное введение животным липосомального гентамицина сульфата за 4 ч до заражения в дозах 4,26 и 2,13 мг/мышь способствовало выживанию 85 и 57 % животных соответственно. Применение свободного антибиотика было менее эффективным, процент защиты составил всего 14 и 28 % от общего количества мышей при использовании 3 и 6 мг антибиотика на животное, ED_{50} липосо-

мального гентамицина сульфата в 2 раза ниже таковой неиммобилизованного препарата (3,68 и 7,54 мг соответственно).

При использовании заражающей дозы 40 LD₅₀ ED₅₀ липосомального гентамицина сульфата составила 4,1 мг, что в 1,8 раза меньше чем при применении свободного антибиотика (ED₅₀ = 5,9 мг).

В следующем исследовании протективных свойств гентамицина сульфата в свободной и липосомальной формах при аэрогенном заражении *B. pseudomallei* 100 в качестве экспериментальных животных нами были использованы белые крысы. Применение липосомального гентамицина сульфата в дозах 4,26 и 2,13 мг при заражающей дозе 10 LD₅₀ было эффективным. При этом выжило 75 % белых крыс, свободная форма препарата в дозах 6 и 3 мг была менее эффективна и позволила выжить 50 % животных. ED₅₀ иммобилизованного в липосомы антибиотика составила 3,29 мг, что в 1,9 раза меньше, чем у свободного гентамицина сульфата (6,28 мг).

Сравнительное изучение протективных свойств гентамицина сульфата в свободной и липосомальной формах при аэрогенном заражении *B. pseudomallei* 100 при использовании заражающей дозы 20 LD₅₀ показало значительные преимущества фосфолипидных везикул с включенным внутрь антибиотиком перед обычной формой препарата. Применение свободной формы антибиотика в дозах 6,0 и 3,0 мг позволила выжить всего 25 % животных в каждой группе.

Использование липосомального гентамицина сульфата в дозах 4,26 и 2,13 мг позволило увеличить процент защиты до 75 и 50 соответственно. ED₅₀ липосомального гентамицина сульфата была ниже в 1,9 раза в сравнении со свободным (3,95 и 7,7 мг соответственно).

Таким образом, применение липосомальных антибактериальных препаратов было более эффективным, чем использование в качестве протективного агента свободного антибиотика при экспериментальной аэрогенной мелиоидозной инфекции, что может быть связано с повышенной сорбцией липосомаль-

ного препарата паренхиматозными органами, в том числе, легкими.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев В.В., Тихонов Н.Г., Липницкий А.В., Пучков В.С., Алексеева В.В., Кивокурцева Т.Ю. Аэрогенные инфекции в аспекте проблемы биотерроризма. Пробл. особо опасных инф. 2003; 85:20–7.
2. Антонов В.Ф., Торчилин В.П. Липосомы: применение в биологии и медицине. М.: Медицина; 1985. 182 с.
3. Владимировский М.А., Ладыгина Г.А., Тенцова А.И. Эффективность стрептомицина, включенного в липосомы, при экспериментальном туберкулезе у мышей. Антибиотики. 1983; 1:23–6.
4. Дмитриева В.С. Микробиологический контроль активности антибиотических препаратов. М.: Медицина; 1965. 112 с.
5. Ротов К.А., Тихонов С.Н., Снатенков Е.А., Алексеев В.В., Антонов В.А., Алексеева В.В., Савченко С.С., Курилов В.Я. Наноллипосомальный гентамицин и его применение для лечения мелиоидоза. Вестник Волгоградского гос. мед. университета. 2009; 4(32):110–13.
6. Bossi P., Tehnell A., Baka A. et al. Bichat guidelines for the clinical management of glanders and melioidosis and bioterrorism-related glanders and melioidosis. Euro. Surveill. 2004; 9:17–8.
7. Klein R.A. The detection of oxidation in liposome preparations. Biochim. Biophys. Acta. 1970; 210:486–9.
8. Wheelis M. First shots fired in biological warfare. Nature. 1998; 395:213.

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

1. Alekseev V.V., Tikhonov N.G., Lipnitsky A.V., Puchkov V.S., Alekseeva V.V., Kivokurtseva T.Yu. [Aerogenic infections regarded from the viewpoint of bioterrorism problems]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2003; 85:20–7.
2. Antonov V.F., Torchilin V.P. [Liposomes: Application in Biology and Medicine]. M.: Meditsina; 1985. 182 p.
3. Vladimirovsky M.A., Ladygina G.A., Tentsova A.I. [Effectiveness of liposome-incorporated streptomycin in experimental tuberculosis in mice]. Antibiotiki. 1983; 1:23–6.
4. Dmitrieva V.S. [Microbiological Control of Antibiotic Preparations Activity]. M.: Meditsina; 1965. 112 p.
5. Rotov K.A., Tikhonov S.N., Snatenkov E.A., Alekseev V.V., Antonov V.A., Alekseeva V.V., Savchenko S.S., Kurilov V.Ya. [Liposome-entrapped gentamicin and its use in treatment of melioidosis]. Vestnik Volgograd. Gos. Med. Univ. 2009; 4(32):110–13.

Authors:

Tikhonov S.N., Rotov K.A., Alekseev V.V., Snatenkov E.A. Volgograd Research Anti-Plague Institute. Golubinskaya St., 7, Volgograd, 400131, Russia. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Об авторах:

Тихонов С.Н., Ротов К.А., Алексеев В.В., Снатенков Е.А. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 18.04.11.

В.В.Кабин¹, Б.Л.Агапов¹, А.А.Кузнецов², А.Н.Матросов²

К 110-ЛЕТИЮ ФЕДЕРАЛЬНОГО КАЗЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ «АСТРАХАНСКАЯ ПРОТИВОЧУМНАЯ СТАНЦИЯ»

¹ФКУЗ «Астраханская противочумная станция», Астрахань;

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

Приводится исторический очерк деятельности одного из старейших противочумных учреждений России – Астраханской противочумной станции. Специалисты станции внесли большой вклад в развитие учения о природной очаговости чумы и других опасных инфекций, обеспечение и проведение мероприятий по эпидемиологическому надзору и профилактике чумы и других особо опасных инфекционных болезней на территории Северо-Западного Прикаспия.

Ключевые слова: Астраханская противочумная станция, эпидемиологический надзор, чума, холера, туляремия, вирусные инфекции.

V.V.Kabin, B.L.Agapov, A.A.Kuznetsov, A.N.Matrosov

To 110th Anniversary of the Federal Public Health Institution “Astrakhan Plague Control Station”

Astrakhan Plague Control Station, Astrakhan; Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov

Presented is a historical essay on the work of one of the oldest Russian anti-plague institutions – “Astrakhan Plague Control Station”. Noted is the fact that specialists of this institution made a substantial contribution to the development of the theory of plague natural focality and other contagious infections, as well as to the provision for and implementation of measures for epidemiological surveillance and prophylaxis of plague and other particularly dangerous infectious diseases in the territory of the North-West Caspian sea region.

Key words: Astrakhan plague control station, epidemiological surveillance, plague, cholera, tularemia, viral infections.

В 2011 г. исполнилось 110 лет старейшему учреждению противочумной службы России – Астраханской противочумной станции. В июле 1901 г. в связи с эпидемическими вспышками чумы в Астраханском крае по решению правительства была учреждена первая в стране противочумная лаборатория в Астрахани. До 1914 г. лаборатория находилась в ведении управления Главного врачебного инспектора МВД, в 1914–1917 гг. – института экспериментальной медицины Санкт-Петербурга. Уже в дореволюционный период она из провинциальной бактериологической лаборатории выросла в научный центр по борьбе с чумой на юго-востоке России. Штат ее постепенно увеличивался. В это время на базе Астраханской лаборатории проводили свои исследования выдающиеся ученые – доктор медицинских наук, профессор, впоследствии академик Д.К.Заболотный (1911 г.), доктор медицинских наук В.И.Исаев (1901, 1905 гг.), а также профессор, видный отечественный биолог, иммунолог и бактериолог, почетный член Петербургской АН и многих иностранных академий, лауреат Нобелевской премии, доктор медицинских наук И.И.Мечников (1911 г.). С 1901 по 1922 год в Астраханской лаборатории работали известные исследователи – врачи И.А.Деминский, Е.И.Нагулевич, И.В.Страхович, С.В.Суворов, В.И.Иорданский, принимавшие непосредственное участие в локализации и ликвидации

вспышек чумы [23, 24]. В этот период в отечественной и зарубежной литературе специалистами лаборатории были опубликованы научные работы, ряд которых имеет мировое значение. К ним можно отнести работы И.А.Деминского и Н.Н.Клодницкого, в которых обосновывалась эндемичность природных очагов чумы и была показана роль верблюдов в распространении инфекции [3, 8]. В 1912 г. И.А.Деминский, заразившись чумой при лабораторном вскрытии малых сусликов, ценой своей жизни доказывает, что источником чумы в Астраханских степях являются эти грызуны.

С 1917 по 1922 год лаборатория подчинялась Губернскому отделу здравоохранения. В эти годы она переживала тяжелые времена: материальных средств на оснащение и содержание лабораторной базы не хватало, штат сокращался, методы диагностики, лечения и профилактики чумы отсутствовали или оказывались неэффективными.

В 1922 г. Астраханская бактериологическая лаборатория в числе других, расположенных на юге России, перешла в непосредственное подчинение Саратовского государственного краевого института микробиологии юго-востока РСФСР «Микроб», в штате которого находилась до 1935 г. В этот период укрепляется лабораторная база учреждения, увеличивается число квалифицированных кадров. Специалисты лаборатории участвуют в ликвидации

эпидемических вспышек чумы в Нижнем Поволжье, совместно с сотрудниками института ведут научные исследования по эпидемиологии, эпизоотологии и лечению чумы и других опасных инфекций в регионе. С.В.Суворов, А.А.Вольферц и М.М.Воронкова впервые в стране дифференцировали туляремию как нозологическую единицу, доказали эпидемичность Нижнего Поволжья по этой инфекции, описали клинику и лабораторную диагностику заболевания [26]. В 1926 г. в с. Яндыки было открыто противочумное отделение Астраханской лаборатории.

В 1930–1950 гг. сформировались организационные основы эпидемиологического надзора за чумой: в структуре противочумных подразделений появились станции, отделения и сезонные противоэпидемические отряды. В 1935 г. Астраханская лаборатория была реорганизована в противочумную станцию и перешла в ведение Народного комиссариата здравоохранения СССР. В этом же году открывается противочумное отделение в с. Енотаевка, в 1938 г. – на станции Досанг, а в 1950 г. – в г. Харабали. В 1930–1950 гг. станция значительно укрепляется кадрами врачей и зоологов. Развивается материально-техническая база учреждения: строятся здания, расширяется гужевой, появляется автомобильный и речной транспорт. В противочумной практике начинает использоваться малая авиация. В этот период противочумная станция разрабатывает и проводит профилактические мероприятия по чуме, холере и другим особо опасным инфекциям на территории Астраханской, Ростовской, Калмыцкой и Западно-Казахстанской областей.

Под руководством института «Микроб», совместно со специалистами Астраханской, Гурьевской и Уральской противочумных станций в 50-е годы был разработан приманочный метод борьбы с песчанками, в том числе с использованием авиации [1, 17, 20]. Позитивный опыт борьбы с малыми сусликами и мелкими песчанками позволил резко снизить эпизоотическую активность закрепленной территории очагов и соответственно эпидемический потенциал. За разработку и внедрение эффективных методов борьбы с песчанками сотрудники станции О.И.Вугмейстер, Н.И.Калабухов и Н.Н.Тропин были удостоены звания лауреатов Государственной премии. В это же время начинают разрабатываться методы специфической профилактики чумы [14, 18]. В очагах чумы проводятся исследования по фауне грызунов и их эктопаразитов [5, 19]. На фоне активизации эпизоотий чумы в 50–60-е годы под руководством М.И.Леви на станции впервые стали изучаться иммунологические методы диагностики чумы с последующим внедрением их в широкую практику эпизоотологического обследования природных очагов чумы. Уникальные эксперименты А.И.Штельмана, посвященные исследованиям популяций малых песчанок, позволили определить их значение в эпизоотологии чумы [28, 29].

В 1970–1975 гг. на фоне эпидемических вспы-

шек холеры на юге европейской части страны Астраханская противочумная станция возглавила лабораторную службу по диагностике, лечению и профилактике холеры. Специалисты принимали непосредственное участие в ликвидации вспышек этого заболевания в регионе.

В 1970–1990 гг. специалисты станции принимали участие в разработке и внедрении в практику серологических методов исследования проб на чуму и холеру, что дало возможность повысить результативность проводимых диагностических исследований. В практике работы противоэпидемических отрядов для оперативной доставки лабораторного материала, грузов и людей на всей территории станции используются самолеты АН-2 и вертолеты К-26. Особого внимания в этот период заслуживают разработки новых методов учета грызунов, работы по картографированию поселений сусликов, малых песчанок, изучению пространственной структуры и ландшафтной приуроченности эпизоотий чумы. Исследования зоологов Г.Б.Постникова, Б.С.Варшавского, О.К.Дробинского, А.И.Дмитриева, В.Л.Скиртачева, А.А.Кузнецова, А.Н.Матросова, Э.Л.Тихомирова и др. позволили вести поиски эпизоотий чумы и наблюдение за популяциями носителей и переносчиков чумы более направленно [2, 4, 6, 12, 15, 16, 21, 22, 25, 27]. Опытные научно-исследовательские изыскания по вопросам борьбы с грызунами позволили объективно оценить эффективность авиационно-приманочного метода дератизации и отказаться от широкомасштабных обработок в природных очагах чумы [11, 13]. Специалисты станции провели большую работу по изучению неорганизованного туризма, что было чрезвычайно важно для оценки риска заражения населения в природных очагах чумы и туляремии. Были начаты исследования природной очаговости вирусных инфекций. В частности, с участием специалистов станции была расшифрована этиология нового риккетсиоза, названного в дальнейшем Астраханской пятнистой лихорадкой [7].

В тяжелые 90-е годы станция сумела сохранить костяк опытных и квалифицированных специалистов, проводила все мероприятия по профилактике чумы и других опасных инфекций в зоне своей деятельности. Площади обследуемых на чуму природных очагов несколько сократились: восточные участки Волго-Уральского междуречья стали контролироваться противочумными учреждениями Казахстана. Несмотря на это на станции велись научно-исследовательские работы по изучению факторов очаговости чумы и других опасных инфекций [9].

В настоящее время Астраханская противочумная станция является одним из наиболее крупных противочумных учреждений России. Эпидемиологический надзор за чумой и другими опасными природно-очаговыми инфекционными болезнями осуществляется на территории площадью 68700 кв. км. в административных границах Астраханской области, части Волгоградской области и Республики Калмыкия.

Большой объем работы проводится станцией по оказанию консультативной, методической и практической помощи учреждениям Роспотребнадзора, органам управления здравоохранения субъектов Российской Федерации по вопросам санитарной охраны территории, организации и проведения профилактических и противоэпидемических мероприятий при возникновении чумы и других особо опасных инфекционных болезней, их лабораторной диагностики, соблюдения требований безопасности работ с микроорганизмами I–II групп патогенности.

Станция является региональным центром мониторинга за возбудителями инфекционных болезней I–II групп патогенности.

На станции функционирует отдел подготовки лаборантов, на базе которого проводятся курсы первичной специализации и усовершенствования лаборантов-бактериологов по особо опасным инфекциям.

В настоящее время штат Федерального казенного учреждения здравоохранения «Астраханская противочумная станция» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека составляет 248 единиц, в том числе 54 специалиста с высшим образованием. Ученую степень кандидата наук имеют 5 сотрудников станции, 80 % врачей, зоологов и лаборантов имеют высшую и первую квалификационную категорию.

Лаборатории и отделы станции и противочумных отделений укомплектованы современным оборудованием, позволяющим использовать как классические методы лабораторного анализа, так и передовые методы экспресс-диагностики (ПЦР в режиме реального времени, иммуноферментный анализ, люминесцентная микроскопия). Наличие современного навигационного и информационно-коммуникационного оборудования позволяет внедрять в практику эпидемиологического надзора ГИС-технологии.

Вся практическая и научная деятельность учреждения на протяжении многих лет неразрывно связана с Российским научно-исследовательским противочумным институтом «Микроб», который с момента своего основания оказывал и оказывает станции всестороннюю научно-методическую и практическую помощь. В разные годы большую консультативную помощь оказывали профессор, доктор биологических наук Ю.К.Эйгелис, кандидат медицинских наук А.И.Кологоров, доктор медицинских наук С.Н.Дальвадянц, доктор биологических наук А.А.Кузнецов.

За 110 лет существования Астраханской ПЧС сменилось несколько поколений специалистов и обслуживающего персонала [10]. В стенах учреждения сформировались и долгие годы трудились такие талантливые организаторы здравоохранения, как эпидемиологи С.В.Констансов, Н.Н.Клодницкий, Е.И.Нагулевич, Е.И.Новикова, Ф.В.Горбунов, П.М.Кучеров, А.Ф.Оптякова, А.А.Рожков, И.Я.Журавлев, В.С.Буркин, А.А.Илюхин, А.К.Рогаткин,

В.А.Кабин, Б.Л.Агапов, В.А.Лещук. Большой вклад в оперативную работу станции в разные годы внесли зоологи – заведующие лабораториями П.И.Зинин, А.А.Рожков, С.С.Марышев, Б.С.Варшавский, Т.А.Козлова, В.П.Осипов, В.А.Бондарев. На Астраханской противочумной станции были воспитаны квалифицированные кадры ученых: доктора наук Н.И.Калабухов, В.С.Замараев, А.А.Кузнецов, А.И.Дмитриев, А.Н.Матросов, кандидаты наук С.В.Суворов, А.И.Штельман, В.С.Буркин, А.А.Илюхин, В.Г.Мацуга, А.В.Пилипенко, Е.И.Новикова, А.К.Рогаткин, Ю.А.Штельман, З.С.Павленко, С.В.Андросова, В.И.Журавлев, К.И.Деревянченко, Н.Н.Тропин, Б.С.Варшавский, Э.А.Сувернева, В.Л.Скиртачев, Т.А.Козлова, Н.З.Настюков, Э.Л.Тихомиров, М.М.Шилов, В.И.Касаткин, Н.И.Морозкин, В.П.Булычев. Заслуживает глубокого уважения самоотверженный труд врачей и зоологов станции, долгие годы обеспечивающих здоровье населения в регионе: В.Т.Товстухи, А.В.Гненюка, П.М.Малькова, Н.М.Бондаренко, Ю.В.Бондаренко, В.Н.Нежневой, А.И.Яценко, Н.М.Яценко, В.Е.Муромцева, В.И.Мазурова, Т.В.Петрушиной, С.С.Соломатина, В.А.Чуринова, П.Ф.Трещилина, А.Г.Перервы, Б.М.Паршина, Т.П.Мацуги, Т.А.Богдановой, С.А.Богданова, Л.И.Товстуха, О.Л.Васильковой, Т.П.Давыдовой, Г.Г.Чивилевой, Н.Г.Путиной, Г.И.Мальковой, Э.Б.Духовской, В.К.Синцова, С.М.Голосовского, В.С.Манжиевой, Т.С.Ким, Л.И.Голубевой, В.Л.Голубева, А.А.Глотова, И.А.Бахтигозина, В.К.Чехонина, Т.А.Бочарниковой, В.В.Дубровина, В.П.Бунинной, П.С.Дубягина, А.А.Рожкова, Р.Н.Варшавской, В.В.Ларина, Л.И.Беляевой, Л.В.Мешеряковой, Н.И.Асанова и др.

Труд многих работников станции по борьбе и профилактике особо опасных инфекций отмечен правительственными наградами и почетными званиями. Нынешнее поколение чумологов состоит из высококвалифицированных ветеранов и молодых специалистов, принимающих эстафету своих опытных коллег [10].

В юбилейный год станция, как структурная единица Роспотребнадзора, бережно хранит и чтит традиции отечественной медицины и неуклонно развивает свой потенциал, внося вместе с другими учреждениями службы посильный вклад в обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения страны.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бочарников О.Н., Карпузиди К.С., Климченко И.З., Тер-Вартанов В.Н., Тинкер И.С., Шиликин А.К., Ширяев Д.Т. Опыт работ по ликвидации энзоотии чумы в очаге Северо-Западного Прикаспия. В кн.: Природная очаговость и эпидемиология особо опасных инфекционных заболеваний. Саратов; 1959. С. 235–46.
2. Варшавский Б.С., Буркин В.С., Илюхин А.А., Оптякова А.Ф., Бондарев В.А., Зурилина Р.С., Матросов А.Н., Сувернева Э.А., Тропин Н.Н., Чикризов Ф.Д. Материалы по распространению и численности серой крысы в Астраханской области. В кн.: Экология и медицинское значение серой крысы (*Rattus norvegicus* Berk.). М.; 1983. С. 28–30.
3. Деминский И.А. Чума в Астраханской губернии за 10 лет

(1899–1909 гг.). В кн.: Тр. съезда участн. противочумн. мероприятий в Астраханской губернии и Уральской области. Астрахань; 1910. С. 3–63.

4. *Дмитриев А.И.* Некоторые данные к палеогенезу природного очага чумы Северо-Западного Прикаспия. В кн.: Эпидемиология и эпизоотология чумы. Саратов; 1980. С. 23–8.

5. *Дойников А.В., Деревянченко К.И., Казанцева Ю.М., Чернова Н.И.* Блохи грызунов песчаной зоны левобережья Астраханской области. Сб. трудов Астраханской противочумн. станции. Астрахань; 1955. 1:302–55.

6. *Дробинский О.К.* Анализ текущего состояния популяций песчанок и блох в Волго-Уральских песках в связи с проблемой прогнозирования эпизоотий чумы. Пробл. особо опасных инф. 1972; 3:21–6.

7. *Кабин В.В., Ветлугина К.Ф., Андросова С.В. и др.* О новом заболевании риккетсиозной этиологии в Астраханской области. В кн.: Итоги и перспективы профилактики особо опасных инф. Астрахань; 1989. С. 56–7.

8. *Клодницкий Н.Н.* Чума верблюдов и значение ее в эпидемиологии Астраханской чумы. В кн.: Тр. съезда по борьбе с чумой и сусликами. Самара; 1914. С. 335–49.

9. *Козлова Т.А., Попов Н.В., Кузнецов А.А.* Влияние гидрологических показателей на эпизоотическую активность Прикаспийского песчаного очага чумы. Деп. в ВНИИТИ, 25.02.94. № 467-В.94. Саратов, Астрахань; 1994. 8 с.

10. *Кологоров А.И., Кутырев В.В., Кабин В.В.* Вклад специалистов Астраханской противочумной станции в теорию и практику борьбы с особо опасными инфекциями. В кн.: Природно-очаговые особо опасные инфекции на юге России, их профилактика и лабораторная диагностика. Астрахань; 2001. С. 1–5.

11. *Кузнецов А.А., Новохатка А.Д.* Опыт количественной оценки противозооотической эффективности борьбы с носителями чумы в Волго-Уральских песках. Деп. во ВНИИМИ МЗ СССР № 5394–82. Саратов; 1982. 21 с.

12. *Кузнецов А.А., Эйгелис Ю.К., Вариавский Б.С., Дмитриев А.И., Дубровин В.В., Касаткин В.И., Матросов А.Н., Рожков А.А., Смиртачев В.Л.* Определение численности мелких песчанок и эффективности борьбы с ними методом пунктов учета в Волго-Уральских песках. В кн.: Эпизоотология и профилактика природно-очаговых инфекций. Саратов; 1982. С. 59–64.

13. *Кузнецов А.А., Матросов А.Н.* Влияние истребительных мероприятий на размножение и смертность малых песчанок Волго-Уральских песков. В кн.: Вопросы природной очаговости и эпидемиологии особо опасных инфекций. Саратов; 1985. С. 62–7.

14. *Лалазаров Г.А.* Экспериментальное изучение неотложной специфической профилактики первичной легочной чумы. Тр. Астраханской противочумн. станции. 1958; 2:109–27.

15. *Матросов А.Н., Эйгелис Ю.К., Кузнецов А.А.* Опыт использования аэрофотоматериалов для сопряженного зоологического и ландшафтного картографирования. Современные аспекты профилактики зоонозных инфекций. 1984; 1:39–41.

16. *Матросов А.Н., Эйгелис Ю.К., Кузнецов А.А., Ерофеев А.В., Чекашов В.Н.* Структура зонального ландшафта запада Волго-Уральского песчаного очага чумы. В кн.: Природная очаговость и профилактика зоонозов. Саратов; 1987. С. 3–10.

17. *Миронов Н.П.* О кратности обработок земель от сусликов с целью ликвидации чумного очага в Северо-Западном Прикаспии. Тр. Рост.-н/Д противочумн. ин-та. 1957; 13:17–50.

18. *Новикова Е.И., Гурьева Е.П.* Опыт прививки людей ассоциированной вакциной из живой противочумной EV и убитой тривакцины ТАВ. Тр. Астраханской противочумн. станции. 1958; 2:144–54.

19. *Новикова Е.И., Тропин Н.Н., Деревянченко К.И.,*

Рожков А.А., Штельман А.И., Гусева Н.А., Павлова А.А. Эпизоотологический очерк Аксарайских песков в районе стыка Западно-Казахстанской, Гурьевской и Астраханской областей (по районированию 1952 г.). Тр. Астраханской противочумн. станции. 1958; 2:26–54.

20. *Постников Г.Б., Концев В.В., Дубягин П.С., Тарасов И.А., Тормасин Е.С.* Некоторые особенности авиационного способа борьбы с полуденными и гребенчиковыми песчанками. Тр. Астраханской противочумн. станции. 1958; 2:203–36.

21. *Постников Г.Б., Ротшильд Е.В., Бунин В.А., Давыдов Е.Н., Иргискин С.И., Лушников В.И., Шукашева С.И., Пилипенко А.В.* Пространственная структура эпизоотий чумы среди гребенчиковых и полуденных песчанок в песках Волго-Уральского междуречья. В кн.: Экология и медицинское значение песчанок фауны СССР. М.; 1977. С. 341–3.

22. *Постников Г.Б., Соловьев И.С., Ротшильд Е.В., Чиркозов Ф.Д.* Численность песчанок и эпизоотии чумы среди них на небольшом участке Волго-Уральских песков. В кн.: Вопр. природ. очаговости и эпидемиол. особо опасных инф. Саратов; 1985. С. 42–9.

23. *Рогаткин А.К.* История создания и деятельности Астраханской противочумной станции. Астрахань; 1991. 20 с.

24. *Рогаткин А.К., Букаева И.Н.* Некоторые исторические вехи существования Астраханской противочумной станции в вековом пути противочумной службы. В кн.: Природно-очаговые особо опасные инфекции на юге России, их профилактика и лабораторная диагностика. Астрахань; 2001. С. 5–10.

25. *Смиртачев В.Л., Беляева Л.И., Мещерякова Л.В.* Размножение полуденных и гребенчиковых песчанок в естественных и искусственно разреженных популяциях. В кн.: Эпидемиология и профилактика природно-очаговых инф. Саратов; 1981. С. 117–22.

26. *Суворов С.В., Вольферц А.А., Воронкова М.М.* Туляремиеподобные заболевания в пределах СССР. II. Чумоподобные лимфадениты в районе Астрахани. Вестн. микробиол., эпид. и паразитол. 1928. С. 293–9.

27. *Тихомиров Э.Л.* Некоторые особенности энзоотии чумы в Прикаспийском Северо-Западном (Прикаспийском песчаном) очаге чумы. В кн.: Природная очаговость, микробиол. и профил. зоонозов. Саратов; 1989. С. 16–22.

28. *Штельман А.И.* Опыт проверки эффективности реакции нейтрализации антител при эпизоотологическом обследовании на чуму. В кн.: Матер. юбил. конф. Уральской противочумн. станции. Уральск; 1964. С. 356–8.

29. *Штельман А.И., Рожков А.А.* Некоторые вопросы экспериментальной чумы у полуденных и гребенчиковых песчанок. Сб. трудов Астраханской противочумн. станции. 1955; 1:5–25.

Authors:

Kabin V.V., Agapov B.L. Astrakhan Plague Control Station. Kubanskaya St., Astrakhan, 414000, Russia. E-mail: antichum@astranet.ru

Kuznetsov A.A., Matrosov A.N. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Кабин В.В., Агапов Б.Л. Астраханская противочумная станция. 414000, г. Астрахань, ул. Кубанская, 3. E-mail: antichum@astranet.ru

Кузнецов А.А., Матросов А.Н. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 18.10.11.

Редакционный совет и редакционная коллегия научно-практического журнала «Проблемы особо опасных инфекций» поздравляют с юбилеем

Ельзу Афанасьевну Москвитину – доктора медицинских наук, заведующего отделом эпидемиологии Ростовского-наДону научно-исследовательского противочумного института,

Владимира Ивановича Илюхина – профессора, доктора медицинских наук, заслуженного деятеля науки Российской Федерации, заведующего отделом сапа и мелиоидоза Волгоградского научно-исследовательского противочумного института и желают им больших творческих успехов, здоровья и благополучия.

**О ПРОВЕДЕНИИ КРУГЛОГО СТОЛА САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ СЛУЖБ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
«ВОПРОСЫ РЕАГИРОВАНИЯ НА ЧРЕЗВЫЧАЙНЫЕ СИТУАЦИИ
САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО ХАРАКТЕРА»
В РАМКАХ VIII ФОРУМА МЕЖРЕГИОНАЛЬНОГО СОТРУДНИЧЕСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ И РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН С УЧАСТИЕМ ГЛАВ ГОСУДАРСТВ
(14 сентября 2011 г., Астрахань)**

В сентябре 2011 г. в г. Астрахани был проведен VIII Форум межрегионального сотрудничества Российской Федерации и Республики Казахстан с участием глав государств. В рамках Форума состоялся Круглый стол санитарно-эпидемиологических служб Российской Федерации и Республики Казахстан «Вопросы реагирования на чрезвычайные ситуации санитарно-эпидемиологического характера». В работе Круглого стола приняли участие представители органов государственного санитарно-эпидемиологического надзора и научно-исследовательских институтов из 15 регионов России и Казахстана.

Сопредседателями Круглого стола выступили Руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главный государственный санитарный врач Российской Федерации Г.Г.Онищенко и Председатель Комитета Государственного санитарно-эпидемиологического надзора, Главный государственный санитарный врач Республики Казахстан Ж.М.Бекшин.

Участники обсудили актуальные вопросы международного сотрудничества, направленного на противодействие угрозам, связанным с возникновением и трансграничным распространением вспышек опасных инфекционных болезней. Обсуждены конкретные предложения по созданию системы совместного реагирования на чрезвычайные ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения трансграничного характера, предусматривающей информационный обмен и алгоритм ответных действий; совершенствования эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями и санитарной охраны территории; совершенствования нормативно-методической базы в области предупреждения и ответных действий на чрезвычайные ситуации санитарно-эпидемиологического характера, гармонизации ее с Международными медико-санитарными правилами (2005 г.).

В рамках VIII Форума проведено развертывание специализированной противоэпидемической бригады (СПЭБ) ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт».

**РЕШЕНИЕ МЕЖВЕДОМСТВЕННОГО СОВЕЩАНИЯ
ПО ПРОБЛЕМАМ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ОХРАНЫ
ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(19–20 октября 2011 г., Астрахань)**

В соответствии с Планом основных организационных мероприятий Роспотребнадзора на 2011 г. (п. 1.4.60.) и во исполнение Приказа Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 652 от 07.07.2011 на базе ФКУЗ «Астраханская противочумная станция» проведено Межведомственное совещание по проблемам санитарной охраны территории Российской Федерации (Пленум Координационного научно-го совета (КНС) по санитарной охране территории Российской Федерации).

В совещании приняли участие представители учреждений Минздравсоцразвития России, Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Российской академии медицинских наук, Российской академии сельскохозяйственных наук, Минобороны России, МЧС России, Федерального медико-биологического агентства, 57 человек из 26 органов и учреждений.

Согласно утвержденной программе совещания специалисты профильных научных и практических

учреждений страны рассмотрели следующий перечень вопросов санитарно-эпидемиологической охраны территории Российской Федерации:

1. Эпидемиологический надзор за особо опасными инфекционными болезнями.
2. Диагностика, профилактика и лечение особо опасных инфекционных болезней.
3. Биомедицинские аспекты особо опасных и других инфекционных болезней.
4. Холера и патогенные для человека вибрионы.
5. Биологическая безопасность и противодействие биотерроризму.

Проведено обсуждение и утверждение отчетных за 2011 г. и плановых на 2012 г. материалов КНС.

Участники совещания констатируют, что в 2011 г. эпидемиологическая обстановка по особо опасным и другим инфекционным болезням в Российской Федерации остается нестабильной.

Обстановка по чуме в мире остается напряженной. Наиболее неблагоприятная ситуация складывается в странах Африканского континента.

Заболевания чумой зарегистрированы в 2011 г. в Ливии и на Мадагаскаре. На севере Мадагаскара отмечена крупная вспышка чумы, в результате которой умерло 49 человек. Общее число больных составило 310 человек. В США (штат Нью-Мексико) зарегистрированы 2 случая бубонной чумы.

За 7 мес. 2011 г. на территории Российской Федерации эпизоотии чумы зарегистрированы в Горно-Алтайском, Тувинском горном, Восточно-Кавказском горном и Центрально-Кавказском природных очагах чумы на площади 487,5 км², выделено 11 штаммов возбудителя чумы.

На территории Республики Казахстан эпизоотии чумы выявлены в 11 природных очагах чумы (Предустюртском, Устюртском, Арыкумско-Дариялытакирском (Зааральском), Мангышлакском, Приаральско-Каракумском, Кызылкумском, Мойынкумском, Таукумском, Прибалхашском, Восточно-Приалакольском, Илийском межгорном). Выделен 381 штамм возбудителя чумы, эпизоотическая площадь составила 19900 км².

В настоящее время в мире наблюдается устойчивое ухудшение эпидемиологической обстановки по холере.

В октябре 2010 г. крупная эпидемия холеры зарегистрирована на Гаити, и в настоящее время не имеет тенденции к завершению. На 25 сентября 2011 г. общее число заболевших составляет 457582, в том числе 6477 летальных.

В Доминиканской Республике зарегистрировано 17784 случаев заболевания холерой и 135 смертельных исходов. Заболевания зарегистрированы в Венесуэле – более 450. Завозные случаи выявлены в Мексике, Испании, США, Канаде и Чили.

Эпидемии и вспышки холеры в настоящее время регистрируются во многих странах Африки, в Иране, Афганистане, Пакистане, Индии.

В мае 2011 г. отмечена вспышка холеры в Мариуполе Донецкой области Украины, завершившаяся 29 августа, во время которой было зарегистрировано 32 случая заболевания холерой и 22 случая вибриононосительства. У всех инфицированных выделен токсигенный холерный вибрион *V. cholerae* eltor серовара Огава. Кроме Мариуполя, заболевание холерой отмечено в поселке Калинино Волновахского района Донецкой области.

Крупная вспышка острой кишечной инфекции, вызванной шиготоксинпродуцирующей кишечной палочкой *E. coli* O104:H4, зарегистрирована в 2011 г. в Германии с завозом инфекции в другие страны Европейского региона и в США. В общей сложности из 16 стран Европы и Северной Америки сообщили о 4075 случаях инфекции (с летальным исходом – 50 случаев), развитие гемолитико-уремического синдрома (HUS) имело место в 857 случаях.

За 8 месяцев 2011 г. по сравнению с аналогичным периодом 2010 г., в Российской Федерации отмечается рост заболеваемости впервые выявленным бруцеллезом – на 16,3 %; клещевым вирусным

энцефалитом – на 12,4 %, клещевым боррелиозом (болезнь Лайма) – на 31,6 %. Отмечено снижение заболеваемости геморрагическими лихорадками – в целом на 24,9 %, в том числе по ГЛПС на 24,4 %. Зарегистрировано 98 случаев Крымской геморрагической лихорадки, 84 случая лихорадки Западного Нила. В сентябре-начале октября 2011 г. продолжают регистрировать заболевания лихорадкой Западного Нила, наибольшее число отмечено в Волгоградской (58 случаев) и Воронежской (38 случаев) областях.

Зарегистрировано снижение заболеваемости сибирской язвой (2 случая против 17 в 2010 г.), туляремией – в 2,3 раза, бешенством (7 случаев против 11 в 2010 г.), малярией – на 18,0 %.

Вспышка полиомиелита, вызванного диким полиовирусом отмечена в Китайской Народной Республике – на 22 сентября 2011 г. зарегистрировано 10 случаев заболевания, в том числе один – с летальным исходом. В 2011 г., по данным ВОЗ, ухудшилась эпидемиологическая ситуация по заболеваемости полиомиелитом в Пакистане, кроме существующей передачи дикого полиовируса 1-го типа, зарегистрирован единственный в Азии случай инфицирования диким полиовирусом 3-го типа (штаммом, находящимся на грани ликвидации в Азии).

В связи с сохраняющейся угрозой заноса, возникновения и распространения опасных и особо опасных инфекций, связанной с неблагоприятной эпидемиологической ситуацией в мире, наличием стойких природных очагов особо опасных инфекций на территории Российской Федерации и сопредельных государств приоритетными направлениями деятельности учреждений КНС в 2011 г. являлись:

- реализация решений саммита стран «Группы восьми» (Санкт-Петербург, 16–17 июля 2006 г.) в области борьбы с инфекционными болезнями;

- нормативно-методическое сопровождение внедрения Международных медико-санитарных правил (2005 г.) на территории Российской Федерации;

- реализация распоряжения Правительства Российской Федерации № 1426 от 02.10.2009 г. «О выделении в 2009–2012 гг. средств федерального бюджета на проведение научно-исследовательских работ, разработку новых средств диагностики и профилактики тропических болезней, развитие международного сотрудничества»;

- решение проблемы обеспечения биологической безопасности в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)»;

- реализация отраслевой научно-исследовательской программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» на 2011–2015 гг.;

- совершенствование эпидемиологического надзора за особо опасными инфекционными болезнями;

- создание отвечающих современным требованиям средств диагностики и профилактики особо опасных инфекционных болезней в соответствии с сетевым графиком разработки и внедрения препаратов для диагностики и профилактики особо опасных инфекционных болезней.

Решение данных проблем невозможно без фундаментальных и прикладных разработок по эпидемиологии, микробиологии и иммунологии особо опасных инфекционных болезней, активной научной поддержки практической деятельности по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации.

Участники совещания отмечают существенный вклад Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации в научное и организационно-методическое обеспечение разработки профильных проблем на международном, федеральном и региональном уровнях.

В соответствии с Планом основных организационных мероприятий Роспотребнадзора на 2011 г., Планом КНС по обеспечению гармонизации национальной нормативно-методической базы с Международными медико-санитарными правилами (2005 г.) и Планом КНС по разработке и переработке нормативно-методических документов по санитарной охране территории Российской Федерации и эпидемиологическому надзору за ООИ на 2011 г. специалистами учреждений Координационного научного совета разработано 26 нормативно-методических документов, из них 8 – утверждены на федеральном уровне, 16 проектов документов представлено в Роспотребнадзор, из них 2 документа межгосударственного уровня.

В рамках деятельности Координационного совета по проблемам санитарной охраны территорий СНГ переработано Соглашение о сотрудничестве в области санитарной охраны территорий государств-участников СНГ (утверждено Советом глав правительств государств-участников СНГ 31 мая 2001 г., Минск)

Активно продолжается работа по совершенствованию стратегии и тактики эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями.

Разработана методология реализации Международных медико-санитарных правил (2005 г.) на национальном уровне, осуществлено ее внедрение на территории Российской Федерации.

Разработана и нормативно закреплена оптимальная с точки зрения Международных медико-санитарных правил (2005 г.) и Санитарных правил и норм «Санитарная охрана территорий государств-участников Содружества Независимых Государств» (утверждены на XVII заседании Совета по сотрудничеству в области здравоохранения СНГ 3–4 июня 2005 г., Душанбе, Республика Таджикистан) система санитарной охраны таможенной территории Таможенного союза (ЕврАзЭС).

Создана система мобильных структурно-функциональных комплексов санитарно-эпидемиологического профиля экстротерриториального назначения (СПЭБ), предназначенных для оказания помощи структурам здравоохранения санитарно-эпидемиологического и лечебно-профилактического профиля, действующим по территориальному принципу, по предупреждению и ликвидации чрезвычайных ситуаций санитарно-эпидемиологического характера, возникающих самостоятельно и в условиях стихийных бедствий и антропогенных катастроф (гуманитарных, техногенных, биотеррористических);

Обоснована необходимость участия СПЭБ в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения в таких крупных международных мероприятиях, как саммит АТЭС – 2012 г. во Владивостоке, XXVII Всемирная универсиада – 2013 г. в Казани, зимняя Олимпиада – 2014 г. в Сочи.

Обоснована необходимость участия СПЭБ в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения в рамках сотрудничества Российской Федерации и Республики Казахстан по вопросам реагирования на чрезвычайные ситуации санитарно-эпидемиологического характера.

Определены актуальные научно-практические направления сотрудничества Российской Федерации и Республики Казахстан в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения, в том числе в отношении совершенствования эпидемиологического надзора за конкретными опасными инфекционными болезнями на приграничных территориях.

Получено практическое подтверждение эпидемиологических прогнозов по чуме, холере, Крымской геморрагической лихорадке, Лихорадке Западного Нила и др. особо опасным инфекционным болезням, составленных на 2011 г.

Завершены работы по созданию и развертыванию ГИС-сервера для опытной эксплуатации Системы поддержки принятия управленческих решений (СППР) в Приволжском федеральном округе.

Завершены разработки базы данных «Риски в области биологической безопасности в субъекте Российской Федерации на платформе Arc GIS», поддержанные подачей заявки в Роспатент на получение свидетельства.

Разработан технический образец компьютерной программы «Оценка степени эпидемической опасности сочетанных природных очагов чумы и других опасных инфекционных болезней бактериальной, риккетсиозной и вирусной этиологии».

Завершены разработки фрагмента компьютерной программы «Система поддержки принятия управленческих решений», подкрепленные подачей заявки в Роспатент на получение свидетельства.

Подготовлен проект монографии «Санитарная охрана территории Российской Федерации в современных условиях».

Создана электронная карта природных очагов чумы государств-участников СНГ.

Разработан электронный паспорт природного очага чумы.

Проведено (членами Координационного научного совета) обсуждение актуальных вопросов и перспективных направлений их решения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения в современных условиях на:

- заседании Круглого стола санитарно-эпидемиологических служб Российской Федерации и Республики Казахстан, проведенного в рамках VIII Форума межрегионального сотрудничества Российской Федерации и Республики Казахстан с участием глав государств (14 сентября 2011 г., Астрахань);

- совещании глав служб государств-членов ШОС, отвечающих за обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия (14 октября 2011 года, Москва,);

- Международном Форуме «ЦРТ-6 в Восточной Европе и Центральной Азии» в рамках участия Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по вопросам роли России как донора программ помощи для борьбы с инфекционными болезнями странам Восточной Европы и Центральной Азии (10–12 октября 2011 года, Москва).

Продолжены работы по реализации распоряжения Правительства Российской Федерации № 1426, по унификации алгоритмов эпидемиологического надзора за тропическими и др. забытыми инфекциями бактериальной и вирусной этиологии, актуальными для стран Центральной Азии и Африки, и разработке современных средств их диагностики и профилактики.

Осуществлялась реализация «Сетевого графика разработки и внедрения препаратов для диагностики и профилактики особо опасных инфекционных болезней». В 2011 г. количество зарегистрированных препаратов по сравнению с 2010 г. увеличилось в 2,6 раза. Обеспеченность зарегистрированными препаратами этапа индикации возбудителей особо опасных бактериальных инфекционных болезней составляет 75–100 %. Разработаны и зарегистрированы препараты для диагностики сапа и мелиоидоза. Зарегистрированными препаратами полностью обеспечены молекулярно-генетические исследования, в том числе ПЦР в режиме реального времени для диагностики чумы, туляремии, сибирской язвы, бруцеллеза, холеры (РосНИПЧИ «Микроб», ВолгоградНИПЧИ, СтавНИПЧИ, ИркутскНИПЧИ, ЦНИИЭ).

В комиссии по нормированию Роспотребнадзора рассмотрены и утверждены четыре методических указаний: «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики чумы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней» (НИПЧИ, ПЧЦ, ФЦГиЭ, ГИСК им. Л.А.

Тарасевича); «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики туляремии для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней» (НИПЧИ, ПЧЦ, ФЦГиЭ, ГИСК им. Л.А.Тарасевича, ГНЦ ПМБ); «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики сибирской язвы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней» (НИПЧИ, ПЧЦ, ФЦГиЭ, ГИСК им. Л.А.Тарасевича), «Порядок организации и проведения (стандарт) лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней» (ПЧЦ, ФЦГиЭ, «ГИСК им. Л.А.Тарасевича», ГНЦ ПМБ).

Издано «Руководство по вакцинопрофилактике особо опасных инфекций» (48 ЦНИИ, ГИСК им. Л.А.Тарасевича, НИПЧИ и ГНЦ Роспотребнадзора).

Впервые показана возможность усиления иммунных и протективных свойств поверхностных антигенов возбудителя мелиоидоза при их инкапсулировании в липосомы и использовании в схеме иммунизации совместно с препаратами рекомбинантных цитокинов и пептидным иммуномодулятором бестим (ВолгоградНИПЧИ).

Определены оптимальные компонентные составы прототипов химических сибиреязвенных вакцин, выяснены особенности их взаимодействия со структурами врожденного и адаптивного иммунитета макроорганизмов (РосНИПЧИ «Микроб»).

Продолжены работы по разработке и реконструкции технологических линий по производству противохолерной вакцины, а также по регистрации отечественной противохолерной вакцины с целью использования за рубежом.

Предложена модель для определения адгезивного потенциала и комплекс методов для выявления токсигенных вариантов не O1/не O139 серогрупп на основе ферментации многоатомных спиртов и адгезивной активности *in vitro* (РостНИПЧИ).

Получены новые данные о реализации системы активатор плазминогена-плазмин у холерного вибриона O1 и O139 серогрупп. Впервые изучены распространенность факторов персистенции и степень их выраженности у холерных вибрионов, роль в адаптации к условиям среды обитания (РостНИПЧИ).

Показана перспективность использования ПЦР-анализа генов антибиотикорезистентности в составе интегронов и SXT элемента для молекулярно-эпидемиологического мониторинга и типирования штаммов возбудителя холеры (ВолгоградНИПЧИ).

Разработаны и направлены для регистрации базы данных: «Оперативный эпидемиологический анализ», «VNTR-генотипы возбудителя холеры в формате карманного компьютера».

Издан аннотированный библиографический указатель «Холера и патогенные для человека вибрионы» за 2010 год.

Оформлен четвертый выпуск Каталога бактериофагов и тест-штаммов патогенных для человека

вибрионов и иерсиний.

Продолжены работы, направленные на решение проблем обеспечения биобезопасности и противодействия биотерроризму – от создания терминологической базы и формирования идеологии научных исследований до решения конкретных задач.

Разработаны и утверждены на федеральном уровне:

Методические указания «Лабораторная диагностика мелиоидоза» (Роспотребнадзор, ВолгоградНИПЧИ), «Лабораторная диагностика сапа» (ВолгоградНИПЧИ).

Разработаны проекты методических указаний «Лабораторная диагностика особо опасных микозов» (Роспотребнадзор, ВолгоградНИПЧИ), методических рекомендаций «Типовой оперативный план противоэпидемических мероприятий потенциально опасного объекта в случае выявления больного сотрудника с подозрением на заболевание, вызванное микроорганизмами I–II групп патогенности» (РосНИПЧИ «Микроб», ГНЦ ВБ «Вектор», ИркутскНИПЧИ, СтавНИПЧИ, ГНЦ ПМБ), «Нормы штата госпитальной базы и методика расчета коечного фонда на случай возникновения очага чумы и холеры» (РосНИПЧИ «Микроб», РостНИПЧИ, ИркутскНИПЧИ, ПЧЦ, СтавНИПЧИ), «Методические рекомендации по принятию управленческих решений и координации межведомственного взаимодействия комиссии по чрезвычайным ситуациям и санитарно-противоэпидемической комиссии при предупреждении и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения на уровне субъекта Российской Федерации» (РосНИПЧИ «Микроб», ГНЦ ВБ «Вектор», СтавНИПЧИ, ИркутскНИПЧИ).

Сформирован «Сводный перечень НМД и ИМД по вопросам биобезопасности, требующим разработки или переработки в 2012–2013 гг. (ВолгоградНИПЧИ, РосНИПЧИ «Микроб», ПЧЦ, СтавНИПЧИ, РостНИПЧИ, ИркутскНИПЧИ, ГНЦ ПМБ).

Разработана математическая модель локальной эпидемии гриппа и модель распространения эпидемии между регионами России и другими странами СНГ (ГНЦ ВБ «Вектор»).

Продолжается выпуск реферативного сборника «Биологическая безопасность».

Издана книга «Биологическая безопасность. Термины и определения» (второе дополненное издание).

По результатам НИР в Роспатенте зарегистрировано 20 патентов, оформлено 6 заявок на изобретения.

На заседаниях пленума КНС рассмотрены материалы о выполнении плана НИР и внедрения результатов исследований в практику, а также документы на планируемые научные темы и план внедрения результатов НИР на 2012 г.

В рамках КНС в 2011 г. выполнялось 128 отраслевых тем. Завершено в 2011 г. 20 НИР, выполняемых

по отраслевым заданиям, в том числе по проблемным комиссиям КНС: ПК 48.01 – 3, ПК 48.02 – 4, ПК 48.03 – 5, ПК 48.04 – 6, ПК 48.05 – 2. Все информационные карты на завершённые темы рекомендованы к утверждению.

Для внедрения в практику здравоохранения в 2011 г. разработано 171 наименование научной продукции.

На заседаниях проблемных комиссий КНС рассмотрены 21 регистрационная карта на темы, планируемые к исполнению с 2012 г. По ПК 48.01 – 6, рекомендовано включить в план 6, ПК 48.02 – 2, рекомендовано включить в план 2; ПК 48.03 – 4, рекомендовано – 4; ПК 48.04 – 5, рекомендовано – 5; ПК 48.05 – 4, рекомендовано – 4. Всего в план НИР на 2012 г. рекомендовано включить 21 тему. Планируемые НИР являются актуальными, отличаются научной новизной и современным методическим уровнем. По тематике КНС в 2012 г. будет выполняться 108 тем.

Для включения в план внедрения результатов НИР в практику в 2012 г. на федеральном, региональном и учрежденческом уровнях представлено 121 предложение, которые прошли экспертную оценку, скорректированы и приняты к исполнению.

Совещание отмечает, что все выполняемые в рамках координирующей деятельности совета научно-исследовательские работы соответствуют направлениям, обозначенным в утвержденном Президентом России концептуальном документе «Основы государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2010 г. и дальнейшую перспективу» (от 04.12.2003 г., № Пр-2194), решениям саммита «Группы восьми» (Санкт-Петербург, 15–17 июля 2006 г.), направленным на борьбу с инфекционными болезнями.

На основании результатов рассмотрения широкого круга специальных вопросов, посвященных проблемам санитарно-эпидемиологической охраны территории Российской Федерации, совещание решило:

1. Продолжить участие в реализации решений саммита стран «Группы восьми» (2006, 2007, 2008 г.) и стратегии ВОЗ по внедрению Международных медико-санитарных правил (2005 г.) до 2014 года в части научного обеспечения модернизации лабораторных сетей, сил оперативного реагирования на ЧС санитарно-эпидемиологического характера на национальном и международном уровне (ВОЗ, СНГ, ШОС, ЕврАзЭС, АТЭС и др.) и развития внутриведомственного и межведомственного взаимодействия в этой сфере национальной безопасности.

2. Обеспечить реализацию отраслевой научно-исследовательской программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» на 2011–2015 гг. и федеральной целевой программы «Национальная система химической и

биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)» в рамках компетенции КНС:

- совершенствование научных основ эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями с использованием современных технологий,

- создание научно-обоснованных систем паспортизации и районирования территорий на основе ГИС-технологий,

- развитие информационно-аналитического и прогнозно-моделирующего направления в эпидемиологии,

- разработку и внедрение в систему эпидемиологического надзора и профилактики опасных инфекционных болезней современных алгоритмов мониторинга, методов и средств лабораторной диагностики,

- разработку современной стратегии неспецифической профилактики инфекционных болезней бактериальной, риккетсиозной и вирусной этиологии на территории Российской Федерации,

- совершенствование методов прогнозирования эпизоотической активности сочетанных природных очагов чумы и других опасных инфекционных болезней.

3. Расширять научные исследования в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения и совершенствования эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями на приграничных территориях в рамках развития сотрудничества Российской Федерации и Республики Казахстан.

4. Продолжить исследования по обеспечению модернизации технологической базы и методологической основы эпидемиологического надзора в природных очагах чумы, сочетанных с другими опасными инфекционными болезнями с использованием ГИС-технологий.

5. Одобрить проекты нормативно-методических документов по санитарной охране территории Российской Федерации и эпидемиологическому надзору за чумой и другими ООИ в соответствии с Планом основных организационных мероприятий Роспотребнадзора и Планом внедрения результатов НИР в практику здравоохранения КНС на 2011 г.

6. Продолжить работу по усовершенствованию нормативно-методической базы по вопросам неспецифической профилактики особо опасных природно-очаговых инфекционных болезней на территории Российской Федерации.

7. Обеспечить внедрение в практику проведения противоэпидемических мероприятий новых дезинфектологических технологий и препаративных форм дератизации, дезинсекции и дезинфекции.

8. Продолжить проведение приоритетных работ в рамках Сетевого графика разработки и внедрения препаратов для диагностики и профилактики особо опасных инфекционных болезней. Зарегистрировать в Росздравнадзоре 3 препарата для диагностики

чумы, 2 – туляремии, 7 – холеры, 2 – бруцеллеза, 3 – сибирской язвы, 2 – сапа и мелиоидоза, 2 – глубоких микозов, 7 – вирусных инфекций. Особое внимание уделить вопросам разработки и подготовки к регистрации препаратов для диагностики особо опасных вирусных инфекционных болезней, особо опасных микозов, тест-систем для проведения ретроспективной диагностики и диагностикумов для проведения эпизоотологического обследования природных очагов чумы.

9. Определить срок устранения задолженности по выполнению Сетевого графика за 2011 г. для ГНЦ ПМБ, Ставропольского НИПЧИ, и ГНЦ ВБ «Вектор» не позднее второго квартала 2012 г.

10. Продолжить работу по паспортизации коллекций штаммов микроорганизмов и их антигенов, с использованием современных методических подходов.

11. Референс-центрам обеспечить выполнение приказа Роспотребнадзора № 88 «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней» (17.03.2008) в части представления эпидемически значимых штаммов ООИ для депонирования в государственных коллекциях патогенных бактерий и вирусов.

12. Активизировать модернизацию научной работы на базе инновационных разработок, шире использовать высокопроизводительные инструменты и приборы.

13. Продолжить разработку ресурсосберегающих технологий, применяемых при проведении НИОКР, и внедрение их в практику производства МИБП.

14. Усилить межведомственное взаимодействие институтов Роспотребнадзора, НИИ Россельхоз академии Минсельхоза при решении вопросов планирования и выполнения НИР, а также реализации мероприятий, направленных на борьбу с болезнями, общими для человека и животных.

15. Осуществлять дальнейшую кооперацию и сотрудничество научно-исследовательских институтов Роспотребнадзора и РАМН при планировании и выполнении НИОКР в рамках Федеральных программ и распоряжений Правительства Российской Федерации.

16. Одобрить отчет о ходе выполнения плана работы Координационного научного совета в 2011 г.

17. Одобрить итоги выполнения плана НИР, плана внедрения результатов НИР в практику здравоохранения на 2011 г. и рекомендовать представленные ИК по завершенным на 2011 г. темам к утверждению. **Одобрить и направить в Роспотребнадзор и РАМН основные достижения учреждений КНС в 2011 г.**

18. Утвердить план НИР на 2012 г., включающий 108 тем, из них 21 вновь планируемая. Включить 121 предложение в план внедрения результатов НИР в практику здравоохранения на 2012 г. Считать выполнение плана КНС обязательным.

19. В связи с переходом противочумных учреж-

дений к новому типу во исполнение Федерального закона № 83 от 08.05.2011 г. обеспечить подготовку:

- проектов государственных заданий бюджетных и казенных учреждений и их выполнение;
- экономических обоснований по планируемым в 2012 году НИР, срок предоставления в КНС 1 месяц.

20. Одобрить и направить в Роспотребнадзор предложения КНС к Плану основных организационных мероприятий Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на 2012 г.

21. В соответствии с решением Межведомственного совещания по проблемам санитарно-эпидемиологической охраны территории Российской Федерации в 2010 г. (Ставрополь) провести на базе ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» в 2012 г. следующие мероприятия:

- XI Межгосударственную научно-практическую конференцию «Современные технологии в совершенствовании мер оперативного реагирования и ответных действий на чрезвычайные ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения»;

- XI заседание Координационного совета по проблемам санитарной охраны территорий государств-участников СНГ от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней;

- Межведомственное совещание по проблемам санитарно-эпидемиологической охраны территории Российской Федерации (Пленум Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации).

22. Одобрить и направить в отделение профилактической медицины Российской академии медицинских наук основные направления развития научных исследований, выполняемых в рамках Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации на 2012 г.

23. Одобрить изменения в составе КНС и его проблемных комиссий и направить в Роспотребнадзор на утверждение.

24. Направить отчет о работе Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации в 2011 г. в Роспотребнадзор и РАМН.