

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 2(108)

июнь · 2011

САРАТОВ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ :

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ :

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

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

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

© Федеральное государственное учреждение здравоохранения
Российский научно-исследовательский противочумный
институт «Микроб», 2011

June 2011, Issue 108

Problems of Particularly Dangerous Infections

Scientific and Practical Journal
Issued quarterly. Founded in 1968

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

Editor-in-Chief

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

Editorial Board

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

Editorial Council

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

Editorial Office Address:

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

Подписной индекс в каталоге «Почта России» – 24687

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

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

Пробл. особо опасных инф. Июнь 2011. Вып. 108. 1–86
Редактор Т.А.Докалина. Технический редактор Т.К.Меркулова. Перевод на английский Т.Б.Караваевой, Н.А.Лушиной

Подписано в печать 16.05.11. Формат 60×88 1/8. Бумага мелованная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 10,5. Гарнитура Таймс. Заказ 589
Журнал отпечатан в ООО «ИППО/ЛиТ-XXI век». 410012, Саратов, Б. Казачья, 79/85

СОДЕРЖАНИЕ

Кутырев В.В., Попов Н.В., Ерошенко Г.А., Меркулова Т.К. Чума на о. Мадагаскар 5

Эпидемиология, биобезопасность

Бойко А.В., Малюкова Т.А., Тихомирова Л.А., Юсупова З.С., Ляпин М.Н., Топорков А.В. Оценка профессиональной подготовленности персонала, допускаемого к работе с патогенными биологическими агентами I–II групп 12

Варфоломеева Н.Г., Ермаков А.В., Василенко Н.Ф., Шкарлет Г.П., Малецкая О.В., Кирейцева О.А., Заикина И.Н., Куличенко А.Н. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым вирусным инфекциям на территории Ставропольского края 16

Дубянский В.М. Оценка вероятности выявления эпизоотий чумы при минимальном уровне интенсивности эпизоотического процесса, рассчитанном путем его моделирования 19

Пчелинцева М.В., Ляпин М.Н., Ежов И.Н., Топорков А.В. Использование методологии оценки риска для обоснования комплекса мер по обеспечению биобезопасного функционирования мобильных лабораторий специализированных противоэпидемических бригад 22

Смирнов Г.Г., Медведев Н.П., Сенькин А.В. Автоматизированная стендовая установка для оценки эффективности фильтров тонкой очистки воздуха 27

Микробиология

Булгакова Е.Г., Краснов Я.М., Гаева А.В., Сухоносов И.Ю., Анисимова Л.В., Гусева Н.П., Новичкова Л.А., Кутырев В.В. Особенности проявления признака пигментации и структурные различия генов hms-оперона у штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* разного происхождения 30

Гаева А.В., Булгакова Е.Г., Сухоносов И.Ю., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Кутырев В.В. Идентификация и внутривидовое типирование штаммов чумного микроба с определением их потенциальной вирулентности методом ПЦР 36

Платонов М.Е., Евсеева В.В., Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Чиркова Е.В., Дентовская С.В., Куличенко А.Н., Анисимов А.П. DFR-типирование штаммов *Yersinia pestis* из природных очагов СНГ 42

Тетерятникова Н.Н., Захарова И.Б., Подшивалова М.В., Романова А.В., Лопастейская Я.А., Викторов Д.В., Алексеев В.В. Молекулярная детекция интегров класса I у *Burkholderia pseudomallei* 46

Шашкова А.В., Горяев А.А., Смирнова Н.И. Строение и функциональная роль CRISPR-системы бактерий 49

CONTENTS

Kutyrev V.V., Popov N.V., Eroshenko G.A., Merkulova T.K. Plague in Madagascar 5

Epidemiology, Biosafety

Boiko A.V., Malyukova T.A., Tikhomirova L.A., Yusupova Z.S., Lyapin M.N., Toporkov A.V. Evaluation of Professional Qualification of the Personnel Authorized for Work with Pathogenic Biological Agents of I–II Groups 12

Varfolomeeva N.G., Ermakov A.V., Vasilenko N.F., Shkarlet G.P., Maletskaya O.V., Kireitseva O.A., Zaikina I.N., Kulichenko A.N. Epidemiological Situation on Natural Focal Viral Infections in the Territory of the Stavropol Region 16

Dubyanskii V.M. Evaluation of Probability of Plague Epizooties Detection at the Minimal Level of Epizootic Process Intensity Measured Using Its Modeling 19

Pchelintseva M.V., Lyapin M.N., Ezhov I.N., Toporkov A.V. Application of Risk Assessment Methodology for Substantiation of Measures Complex on Provision of Safe Functioning of Mobile Laboratories of Specialized Anti-Epidemic Teams 22

Smirnov G.G., Medvedev N.P., Sen`kin A.V. Automated Bench-Top Device for Evaluation of Air Fine Purification Filters Efficiency 27

Microbiology

Boolgakova E.G., Krasnov Ya.M., Gaeva A.V., Sukhonosov I.Yu., Anisimova L.V., Guseva N.P., Novichkova L.A., Kutyrev V.V. Peculiarities of Pigmentation Expression and Structural Differences of hms Operon Genes in *Y. pestis* and *Y. pseudotuberculosis* Strains of Diverse Origin 30

Gaeva A.V., Boolgakova E.G., Sukhonosov I.Yu., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Kutyrev V.V. Identification and Intraspecific Typing of Plague Microbe Strains with Their Potential Virulence Determination Using PCR 36

Platonov M.E., Evseeva V.V., Efremenko D.V., Kuznetsova I.V., Chirkova E.V., Dentovskaya S.V., Kulichenko A.N., Anisimov A.P. DFR-Typing of *Yersinia pestis* Strains from the CIS Natural Foci 42

Teteryatnikova N.N., Zakharova I.B., Podshivalova M.V., Romanova A.V., Lopasteiskaya Ya.A., Viktorov D.V., Alekseev V.V. Molecular Detection of Class I Integrons in *Burkholderia pseudomallei* 46

Shashkova A.V., Goryaev A.A., Smirnova N.I. Structure and Functional Role of Bacterial CRISPR System 49

Иммунология

Бугоркова С.А., Бугоркова Т.В., Кутырев В.В. Принципы количественной морфологической оценки безопасности противохолерных вакцин 53

Дубровина В.И., Коновалова Ж.А., Николаев В.Б., Войткова В.В., Татарников С.А., Мазепа А.В., Марков Е.Ю., Попова Ю.О., Юрьева О.В. Особенности влияния липополисахарида туляремийного микроба разных подвигов на метаболическую активность фагоцитов *in vitro* 57

Диагностика

Кибирев Я.А., Дармов И.В., Логинова М.А., Маракулин И.В., Чухланцев Д.А., Дормидонтова Т.И., Кузнецов С.Л., Кузнецовский А.В. Разработка тест-системы для типирования штаммов *V. cholerae* с помощью VNTR-анализа 61

Мазрухо А.Б., Шелохович А.И., Харабаджаян Г.Д., Карбышев Г.Л., Терентьев А.Н., Кругликов В.Д., Григоренко Л.В., Агафонова В.В., Савельева И.К., Симакова Д.И., Сокиркина О.Г., Булахова О.Г., Егоренкова И.С. Оценка биологических показателей новой селективно-дифференциальной среды для выделения холерных вибрионов (СЭДХ-М) по результатам лабораторных испытаний 64

Уткин Д.В., Куклев В.Е., Ерохин П.С., Осина Н.А. Применение методов спектроскопии для индикации и идентификации патогенных биологических агентов 68

Щербакова С.А., Найденова Е.В., Билько Е.А., Водина Е.А., Логунова Т.Е., Потемина Л.П., Кутырев В.В. Выявление специфических антител к арбовирусам в сыворотках крови людей, проживающих на территории Саратовской области 72

Биотехнология

Абрамова Е.Г., Кочкалова Н.Н., Никифоров А.К., Бутырский А.Ю., Иванов Ю.В., Синицына Н.В., Михеева Т.А., Минаева Л.Н., Галкина М.В., Савицкая Л.В., Генералов С.В., Киреев М.Н., Шарапова Н.А. Получение лиофилизированного препарата антирабического иммуноглобулина и исследование его основных свойств 75

Аленкина Т.В., Зинина О.С., Антонычева М.В., Вахрушина Н.И., Никифоров А.К. Оптимизация стадии репродукции в технологии производства бактериофага диагностического чумного Л-413С 79

Комиссаров А.В., Еремин С.А., Алешина Ю.А., Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Белякова Н.И. Экспериментальная оценка использования метода ультрафильтрации по принципу «кросс-флоу» для концентрирования О-антигена в производстве холерной бивалентной химической вакцины 83

Правила для авторов 86

Immunology

Bugorkova S.A., Bugorkova T.V., Kutyrev V.V. Principles of Quantitative Morphometric Assessment of Cholera Vaccines Safety

Dubrovina V.I., Konovalova Zh.A., Nikolaev V.B., Voitkova V.V., Tatarnikov S.A., Mazepa A.V., Markov E.Yu., Popova Yu.O., Yur'eva O.V. Peculiarities of the Effect of the Lipopolysaccharide of Tularemia Microbe of Different Subspecies upon Metabolic Activity of Phagocytes *in Vitro*

Diagnostics

Kibirev Ya.A., Darmov I.V., Loginova M.A., Marakulin I.V., Chukhlantsev D.A., Dormidontova T.I., Kuznetsov S.L., Kuznetsovskii A.V. Development of VNTR-Based Test System for *V. cholerae* Typing

Mazrukho A.B., Shelokhovich A.I., Harabadzhakhian G.D., Karbyshev G.L., Terent'ev A.N., Kruglikov V.D., Grigorenko L.V., Agaphonova V.V., Savel'eva I.K., Simakova D.I., Sokirkina O.G., Bulakhova O.G., Egorenkova I.S. Evaluation of Biological Properties of New Selective Differential Medium for Cholera Vibrios Isolation Based on the Results of Laboratory Trials

Utkin D.V., Kouklev V.E., Erokhin P.S., Ossina N.A. Application of Spectroscopy Methods for Indication and Identification of Pathogenic Biological Agents

Shcherbakova S.A., Naidenova E.V., Bil'ko E.A., Vodina E.A., Logunova T.E., Potemina L.P., Kutyrev V.V. Detection of Specific Antibodies to Arboviruses in Blood Sera of People Living in the Territory of the Saratov Region

Biotechnology

Abramova E.G., Kochkalova N.N., Nikiforov A.K., Butyrskii A.Yu., Ivanov Yu.V., Sinitsyna N.V., Mikheeva T.A., Minaeva L.N., Galkina M.V., Savitskaya L.V., Generalov S.V., Kireev M.N., Sharapova N.A. Production of Lyophilized Preparation of Anti-Rabies Immunoglobulin and Examination of Its Main Properties

Alenkina T.V., Zinina O.S., Antonycheva M.V., Vakhrushina N.I., Nikiforov A.K. Optimization of Reproduction Stage in Technology of Production of Plague Diagnostic Bacteriophage L-413C

Komissarov A.V., Eremin S.A., Aleshina Yu.A., Vasin Yu.G., Klokova O.D., Beliakova N.I. Experimental Evaluation of Application of "Cross-Flow" Ultrafiltration Method for O Antigen Concentrating in Cholera Chemical Bivalent Vaccine Production

Instruction to Authors

В.В.Кутырев, Н.В.Попов, Г.А.Ерошенко, Т.К.Меркулова

ЧУМА НА О. МАДАГАСКАР*ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

В статье проанализированы особенности эпизоотологии и эпидемиологии чумы на о. Мадагаскар в 1898–2010 гг., выполнен анализ развития вспышек легочной чумы 2011 г. Обобщены данные литературы и собственных экспериментальных исследований, характеризующих свойства штаммов *Yersinia pestis*, выделенных на о. Мадагаскар в XX столетии. Подтверждена циркуляция здесь штаммов *Y. pestis*, представляющих собой третью ветвь иррадиации ее восточного биовара (1.ORI3). Обоснована возможность появления здесь новых вариантов с измененными свойствами, в том числе с множественной лекарственной устойчивостью.

Ключевые слова: возбудитель чумы, о. Мадагаскар, вспышки, природные, природно-антропоургические и антропоургические очаги, штаммы.

V.V.Kutyrev, N.V.Popov, G.A.Eroshenko, T.K.Merkulova

Plague in Madagascar*Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov*

Analyzed are peculiarities of plague epizootiology and epidemiology in Madagascar in 1898–2010 with special consideration to pneumonic plague outbreak development in 2011. Summarized are literature data and authors own experimental research of characteristics of *Yersinia pestis* strains isolated in Madagascar in the XX century. Confirmed is the fact that there circulate *Y. pestis* strains representing the third branch of its *orientalis* biovariant (1.ORI3) irradiation. Possibility of emergence of new variants with altered properties, including multiple drug resistance, in Madagascar is substantiated.

Key words: plague agent, the island of Madagascar, outbreaks, natural, natural-anthropurgic, anthropurgic foci, strains.

Впервые вспышка чумы зарегистрирована в 1898 г. на восточном побережье о. Мадагаскар в портовом г. Томатаве [3, 26]. Дальнейшая экспансия возбудителя чумы по территории острова детально документирована в многочисленных литературных источниках [10, 12, 14]. В 1898–2010 гг. на о. Мадагаскар собрана уникальная информация по особенностям проявления чумы в различных ландшафтно-географических условиях; установлена биоценотическая и пространственная структура природно-очаговых комплексов, эпизоотологическая и эпидемиологическая неравнозначность различных очаговых территорий; проведена их дифференциация по степени риска заражения; разработаны меры специфической и неспецифической профилактики [13, 19, 27].

Создание эффективной системы эпидемиологического надзора за чумой позволило в 30–50-е годы прошлого столетия в сотни раз снизить уровень заболеваемости (с 2–4 тыс. случаев в год в 1931–1932 гг. до 200 случаев – в 1941–1953 гг.). Однако с конца 80-х годов прошлого столетия здесь отмечена новая тенденция роста заболеваемости чумой. С 1990 г. регистрировали от 600 до 1500 случаев в год [14, 22]. С начала 90-х годов вспышки произошли в порту Махадзанга (1991, 1995–1998). В 2004–2009 гг. в Республике Мадагаскар зарегистрировано 3454 случая, включая 364 летальных (10,5 %). В сентябре 2010 г. в округе Мураманга (регион Алаотра-Мангоро) имела место вспышка (16 случаев легочной чумы, в том числе 10 летальных [23]. На этом

неблагоприятном в целом эпидемиологическом фоне в 2011 г. эпидемические осложнения отмечены с января по апрель в трех провинциях (Антананариву, Туамасина, Анциранана) Республики Мадагаскар.

Современная эпизоотология и эпидемиология чумы на о. Мадагаскар

В январе 2011 г. (первый случай 04.01.2011) имела место вспышка легочной чумы в провинции Туамасина, округ Мураманга, регион Алаотра-Мангоро), где зарегистрировано 30 случаев, из них 6 летальных [33]. Повторение развития вспышки в регионе Алаотра-Мангоро в 2011 г. свидетельствует о сохранении здесь условий для возникновения постоянных первичных заражений и слабом эпидемиологическом надзоре, следствием чего является частое проявление легочной чумы. В январе–феврале 2011 г. на севере о. Мадагаскар (провинция Анциранана, г. Амбилубе) также зарегистрирована вспышка чумы (погибло 16 человек). Первые случаи (27 января) заболевания отмечены в провинции Анциранана, административный регион Сава (в 45 км от г. Амбилубе), затем в феврале отмечены случаи заболевания и в населенном пункте Амбанья. В предшествующий период 1957–2001 гг. в г. Амбилубе и прилегающих территориях заболеваний чумой не зарегистрировано [8, 24]. В связи с этим следует считать, что причиной возникновения вспышки послужил занос инфекции из центральных районов Республики Мадагаскар. Существенно, что заболевания чумой в провинции Антананариву в январе–марте также имели место, как в столице Антананариву, так и в ее пригородах.

Следует подчеркнуть, что в связи с разработкой в 2010 г. нового месторождения сапфиров в провинции Анциранана значительно возрос приток мигрантов из центральных районов на север о. Мадагаскар. Последнее можно рассматривать в качестве основной причины заноса инфекции в городах Амбилубе и Амбанья. Вместе с тем нельзя полностью отрицать и возможность местного возникновения этой вспышки на севере страны. Тем более, что в связи с освоением нового месторождения сапфиров неорганизованными старателями контакт населения с биоценозами природных очагов здесь резко возрос [7].

В целом, в январе–феврале 2011 г. на о. Мадагаскар зарегистрировано 76 случаев заболевания чумой, в том числе 32 летальных. Летальность составила 42,1 %. Соотношение общего числа бубонных и легочных случаев составляло 65 и 35 % соответственно [34]. В марте–апреле 2011 г. общее число случаев с начала года достигло 310, в том числе 49 летальных [30]. При этом наибольшее опасение вызывает тот факт, что в двух случаях лечение антибиотиками оказалось неэффективным. Появление здесь антибиотикоустойчивых штаммов может значительно осложнить эпидемиологическую обстановку на территории острова.

Выполненный анализ эпизоотологических и эпидемиологических данных по пространственно-временным особенностям проявления чумы на о. Мадагаскар в 1898–2010 гг. позволяет считать, что в настоящее время здесь сформировался единый природно-очаговый комплекс, включающий природные, природно-антропоургические и антропоургические очаги этой инфекции (рис. 1). Однако, несмотря на то, что все выделяемые типы очагов о. Мадагаскара имеют сходную биоценотическую структуру, и наибольшее эпидемиологическое значение повсеместно имеют черная крыса *Rattus rattus* и блоха вида *Xenopsylla cheopis*, характер проявлений чумы в них существенно отличается. В частности, наибольшую эпидемиологическую опасность представляет антропоургические и природно-антропоургические очаги чумы; природные – характеризуются низкой эпидемиологической активностью. Заболеваемость бубонной формой чумы имеет место, в основном, в годы повышенной численности блох *X. cheopis* и при наличии эпизоотий чумы среди крыс *R. rattus* [28].

Подчеркнем, что основным механизмом формирования антропоургических очагов на территории о. Мадагаскар, как в XIX и XX веках, остается занос чумного микроба в популяции грызунов, обитающих на территории крупных населенных пунктов, в первую очередь портовых городов. В историческом плане этот процесс наиболее активно проходил в 1898–1907 гг. («портовая чума» в Таматаве в 1898–1900, Диего-Суарес – 1899, Мажунга – 1902 и 1907 гг.). Вторая волна «портовых вспышек» имела место в 1921–1947 гг. (Таматаве – 1921–1931, 1933, 1939–1946 гг.; Диего-Суарес – 1921, 1924, 1926–1927 гг.; Форт-Дофин – 1924–1926 гг.; Мажунга –

1924–1928 гг., Мананжари – 1925–1926, 1936–1940, 1947, Аналаве – 1926–1927, Ваомандри – 1928). Причем в качестве основной причины обострения эпидемической обстановки в портовых городах Мадагаскара в 1921–1947 гг. рассматривался занос чумы из внутренних районов страны [3, 10], где к этому времени, вероятно, уже сформировались ее природные и природно-антропоургические очаги. Косвенным подтверждением этого служит развитие в 1921 г. вспышка легочной чумы и на территории Центрального плато – в г. Тананариве (современная столица Антананариву, где эпидемические события отмечены и в 2011 г.). Третья современная волна активизации антропоургических очагов чумы имела место в 90-х годах прошлого столетия (вспышки в порту Махадзанга – 1991, 1995–1998) [9, 14].

Подчеркнем, что циркуляция чумного микроба в

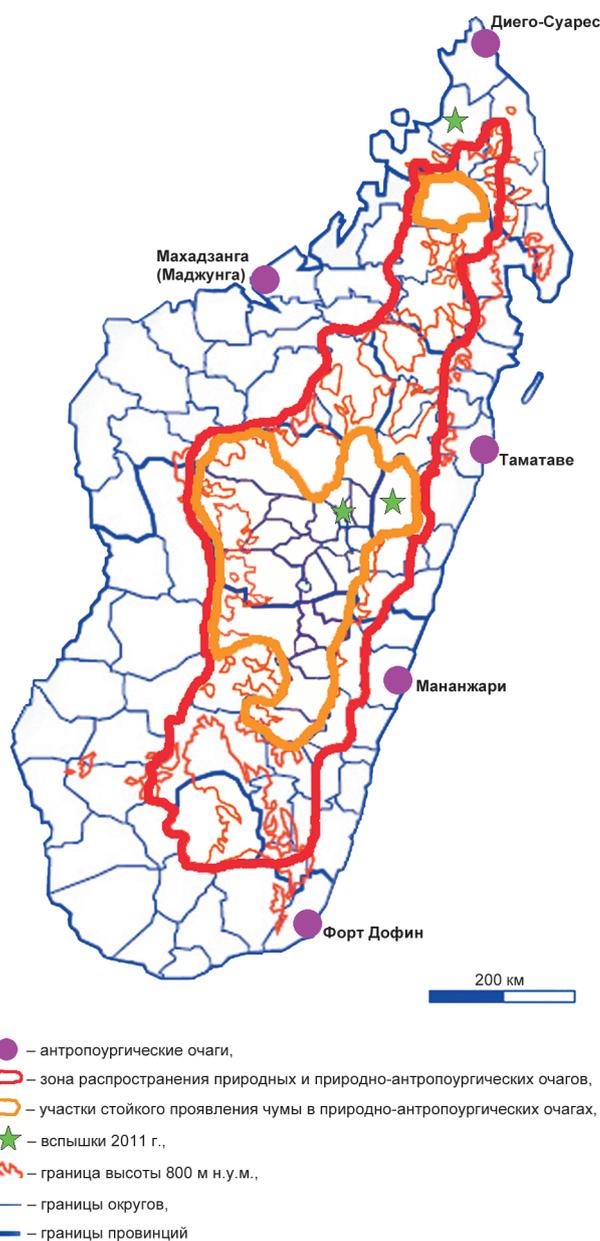


Рис. 1. Пространственное распределение антропоургических, природно-антропоургических и природных очагов чумы на о. Мадагаскар

антропоургических очагах происходит, в основном, в популяциях черной крысы *R. rattus*, хотя в порту Махадзанга отдельные случаи заражения связывают также и с серой крысой *R. norvegicus*. Здесь также отмечено вовлечение в эпизоотии чумы землероек вида *Suncus murinus*, в шерсти которых отмечены блохи *X. cheopis* [14]. *Pulex irritans*, в отличие от других регионов мира, здесь играют лишь случайную роль в эпидемиологии чумы. Заболеваемость чумой в антропоургических очагах регистрируют практически в течение всего года, хотя пик заболеваемости в портовых городах о. Мадагаскар имеет место в июле–ноябре [8]. В связи с интенсивным распространением чумы за границы антропоургических очагов, они представляют чрезвычайно высокую эпидемическую опасность. Для них характерны резкие подъемы эпидемической активности (до нескольких тысяч случаев в год), совпадающие с периодами ухудшения социально-экономических условий жизни и обнищания населения, снижением объемов профилактических мероприятий. Накопленный в 50–60-х годах прошлого столетия опыт проведения здесь вакцинации, поселковой дератизации и дезинсекции однозначно свидетельствует о высокой эффективности этих мер в плане снижения уровня заболеваемости, указывает на возможность полного оздоровления очагов этого типа [13].

Природно-антропоургические очаги чумы широко распространены в центральных, южных и северных районах Центрального плато, где они в настоящее время сформировались в предместьях крупных городов, включая и столицу Антананариву. Существенно, что в период 1953–1978 гг. случаев заболеваний чумой человека в столице не регистрировали. В 1979 г. первый случай был выявлен в одном из самых старых районов города. В 1990-х годах отмечен рост заболеваемости, и с тех пор от 10 до 25 случаев регистрируется ежегодно [14]. В многолетнем аспекте природно-антропоургические очаги чумы характеризуются постоянной эпизоотической и эпидемической активностью. Наиболее высоко эпидемически активные очаги расположены в провинциях Махадзанга, Антананариву, Фианаранцуа, Туамасина. Стойкие участки проявления чумы приурочены здесь к местам слияния сельскохозяйственных (многие населенные пункты фактически окружены рисовыми полями) и природных ландшафтов (сухая злаковая саванна мадагаскарского типа, склоны гор, долины рек (Мангоки, Цирибилихина, Манамболо, Бецибока). Межгорные долины являются оптимальными станциями для обитания черной крысы и ее блох. Территории с постоянной эпидемической активностью характеризуются высокой плотностью населения (более 100 чел. на 1 км. кв). Подчеркнем, что черная крыса *R. rattus* в условиях тропиков является полусинантропным грызуном и во влажный период обитает в жилище человека; в сухой – в открытых стациях [1]. Заболеваемость чумой регистрируют практически в течение всего года, однако вследствие выраженной сезонной концентрации крыс

в закрытых стациях во влажный сезон, максимальное число случаев приходится на сентябрь–март; минимальное – на сухой сезон (май–август) [8]. Первые случаи чаще всего отмечаются среди рисоводов и их детей, пользующихся для ночлега временными жилищами у рисовых полей. С ноября по март преобладают бубонные формы; в июне–октябре – легочные. На территории Центрального плато эндемичным видом блох на черной крысе является *Synopsyllus fonquerniei*, которая на территории побережий отсутствует. В связи с широким распространением и постоянной высокой эпидемической активностью природно-антропоургических очагов чумы, они представляют реальную постоянную угрозу для распространения инфекции в другие районы о. Мадагаскар, что и наблюдалось в 2011 г. В середине прошлого столетия, в целях снижения уровня заболеваемости чумой на территории Центрального плато, широко проводились дератизация и дезинсекция не только в эпидемических очагах, но и непосредственно на участках обнаружения зараженных чумой грызунов и блох в природных биотопах. На фоне сокращения объемов профилактических работ в 80-х годах прошлого столетия произошло значительное обострение эпидемической обстановки на о. Мадагаскар, в первую очередь, за счет роста заболеваемости в природно-антропоургических и антропоургических очагах чумы.

Природные очаги чумы о. Мадагаскар распространены, в основном, в зонах предгорий, гор и высокогорий Центрального плато (800–1500 м н.у.м. и выше), где также преобладает сухая саванна, на склонах горных и высокогорных массивов встречаются участки, покрытые лесом. Существенно, что на высоте более 1400–2000 м н.у.м. сезонная смена влажных и сухих периодов не выражена. В связи с этим в высокогорных районах, по сравнению с остальной территорией Центрального плато, сезонность в проявлениях чумы имеет несколько иной характер. Есть мнение, что природная очаговость поддерживается здесь двумя подвидами черной крысы, заселяющей как прибрежные леса (*R. rattus rattus*), так и высокое плоскогорье (*R. r. alexandinus*) [5]. Наряду с *X. cheopis*, здесь также зарегистрированы блохи *Synopsyllus estradei*, *Dinopsyllus brachypecten*, а также виды рода *Paractenopsyllus*. Мелкие населенные пункты и отдельные сельскохозяйственные фермы встречаются на склонах гор и по долинам рек. Фоновая плотность населения менее 10 чел. на 1 км. кв. Заражения носят спорадический характер. На западном побережье, где широко распространены колючие леса и кустарники, проявления чумы зарегистрированы только в границах портовых городов. Напротив, на восточном побережье, в округе Амбоситра (в административном районе Ankazomivady), штаммы *Y. pestis* выделены от черной крысы *R. rattus* и черноголового тернека *Hemicentetes nigriceps*. В 1998 г. в округе Иконго и в 2000–2001 гг. в округе Аносибе-Ан-ала имели случаи заболевания людей. Плотность населения достигает 20–49 чел. на 1 км кв.

Основываясь на результатах выполненного анализа, можно также заключить, что вспышки легочной чумы 2011 г. являются вполне закономерным следствием резкого ухудшения социально-экономической ситуации в стране после государственного переворота 2009 г., ослабления эпидемиологического надзора за чумой, сокращения объемов проводимых профилактических мероприятий. Вместе с тем подчеркнем, что в целом характер проявлений чумы на Мадагаскаре в 2011 г. соответствует установленным ранее основным закономерностям.

Свойства штаммов Y. pestis, выделенных на о. Мадагаскар

Штаммы *Y. pestis*, завезенные в 1898 г. из Индии на о. Мадагаскар во время третьей пандемии чумы, начавшейся в Китае в 1894 г., представляют собой наиболее молодую ветвь эволюции возбудителя чумы. В результате исследования 82 штаммов *Y. pestis*, выделенных на Мадагаскаре за 80-летний период, с применением современной технологии секвенирования и анализа 933 сайтов единичных вариабельных нуклеотидов (SNPs) установлено, что мадагаскарские штаммы *Y. pestis* представляют собой третью ветвь иррадиации ее восточного биовара (1.ORI3) [25]. Штаммы *Y. pestis*, относящиеся к первой ветви иррадиации (1.ORI1), получили распространение в Северной Америке; ко второй (1.ORI2) – в Европе, Южной Америке, Африке и Юго-Восточной Азии [25]. В связи с тем, что ранее на Центральном плато о. Мадагаскар предполагалось наличие древней (местной) эндемии чумы, вне зависимости от завозных случаев заболеваний в портовых городах побережья [3, 10], этот факт имеет принципиальное значение для понимания механизма формирования очагов чумы.

Также установлено, что все 82 изученных мадагаскарских штамма *Y. pestis* распадаются на два специфических кластера: 1.ORI.3.k и его производный 1.ORI.3.d [25] (рис. 2). Первый кластер существовал на Мадагаскаре уже в 1926 г., когда там был выделен штамм EV76, который стал основой для создания аттенуированной живой чумной вакцины. Другие штаммы, входящие в этот кластер, были выделены в различных географических регионах Мадагаскара, включая высокогорье и прибрежные регионы. В противоположность этому штаммы кластера 1.ORI.3.d. (производные первого кластера) ограничены небольшим регионом на высокогорье около Фианаранцуа. Проявления чумы регистрируют в этом регионе с 1933 г., и наиболее ранний штамм этого кластера был выделен в 1939 г. Все это однозначно подтверждает формирование здесь штаммов группы 1.ORI.3.d в период 1933–1939 гг. Существенно, что о значительном генетическом разнообразии мадагаскарских штаммов *Y. pestis* свидетельствуют результаты и более ранних молекулярно-генетических исследований [21, 29]. По-видимому, за относительно небольшой промежуток времени (немногим более ста лет) штамм *Y. pestis*, завезенный на территорию Мадагаскара, в

процессе адаптации к новым условиям циркуляции в различных ландшафтно-географических и экологических условиях претерпел существенные изменения. При этом установлено, что мадагаскарские штаммы *Y. pestis*, выделенные в 1939–1982 гг. от больных бубонной и легочной чумой, имели классический риботип В, который характерен для клона *Y. pestis* восточного биовара, возникшего в Китае в 1894 г. и получившего глобальное распространение во время третьей пандемии чумы [20]. Более того, в 1982, 1983 и 1994 гг. на острове были впервые выделены штаммы с новыми риботипами, обозначенными как R, Q и T, которые были изолированы на территории Центрального плато острова. Изучение этих штаммов *Y. pestis* показало, что они хорошо укоренились в своих экосистемах и имеют тенденцию к распространению на новых географических территориях, где вытесняют исходный классический штамм восточного биовара [21]. В частности, первый штамм риботипа R был выделен в 1982 г., и до 1994 г. территория распространения этого риботипа была ограничена северной частью округа Амбоситра. В 1994–1996 гг. штаммы с риботипом R выявляли уже далеко за пределами этого региона. Второй новый риботип Q был впервые зарегистрирован в 1983 г. В настоящее время штаммы этого риботипа встречаются на большой территории, занимающей западную часть субпрефектур Амбоситра и Ambohimahasoа. Третий риботип T был представлен всего 2 штаммами *Y. pestis*, выделенными в субпрефектуре Ambohimahasoа в

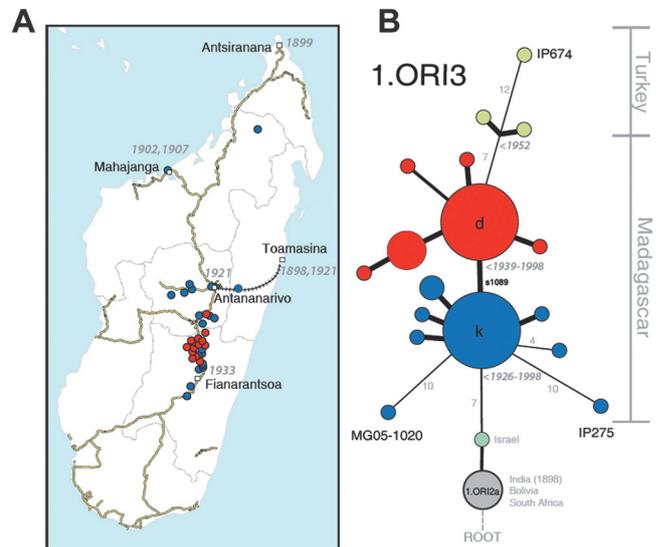


Рис. 2. Распространение чумы на Мадагаскаре [25, Supplementary information]:

А. Карта Мадагаскара, на которой указаны годы, когда чума была впервые зарегистрирована, а также места выделения 82 штаммов, окрашенные по группам. **Б.** Очаги, связанные с распространением 1OR13 из очага 1OR12.a. Голубой и красный цвета группируют два кластера очагов, которые отличаются по одному SNP (s1089). Количества других SNP вдоль основной ветви отмечены серым, за исключением случаев, когда был задействован только один SNP (толстая черная линия). Даты, отмеченные серым, – даты выделения штаммов. Три изолята с геномными последовательностями указаны черным, вакцинный штамм EV-76 принадлежал к очагу K

1994 г. Никаких различий по фенотипическим свойствам между штаммами *Y. pestis* новых и старого риботипа не выявлено (в том числе по ферментации 50 сахаров и чувствительности к сульфонамидным препаратам и антибиотикам). В связи с этим остается неясным, получают ли штаммы с новыми риботипами селективные преимущества и какова природа этих преимуществ. Однако очевидно, что укоренение в новом географическом регионе клона третьей пандемии чумы сопровождается быстрыми хромосомными перестройками, приводящими к появлению новых риботипов [21]. Это подтверждает гипотезу о том, что вариабельность различных рРНК профилей *Y. pestis* может проявиться в течение короткого времени в специфических ландшафтно-климатических условиях [20].

Нами также была исследована вариабельность хромосомных участков, содержащих гены биосинтеза рРНК, а также другие генетические особенности выделенных на Мадагаскаре штаммов *Y. pestis*, хранящихся в Государственной коллекции патогенных бактерий (РосНИПЧИ «Микроб»). В том числе был исследован штамм *Y. pestis* EV исходный (229), который был выделен на о. Мадагаскар в 1926 г. из трупа человека; вакцинный штамм EV76, полученный G.Girard и J.Robic [18, 19]; вакцинный штамм EV НИИЭГ, используемый в Российской Федерации для производства живой противочумной вакцины, а также штаммы 1/64, Madagascar, 119 из коллекции Молляре, полученные в ГКПБ в 1968 г.

Проведенное исследование показало, что по фенотипическим свойствам все 6 изученных штаммов принадлежат к восточному биоварианту возбудителя чумы. Они не ферментируют глицерин, рамнозу и мелибиозу, но редуцируют нитраты и ферментируют арабинозу. Все 6 штаммов содержат две характерные для штаммов восточного биовара мутации – делецию в 93 п.н. в гене глицерол-3-фосфат дегидрогеназы *glpD*, а также делецию единичного нуклеотида (-A) в позиции 1037 от начала гена *tcaB* комплекса инсектицидных токсинов Tc's [6], что на генетическом уровне подтверждает принадлежность этих штаммов к восточному биовару.

Проведенный нами анализ полиморфизма длин рестриционных фрагментов генов биосинтеза рРНК показал, что три изученных штамма *Y. pestis* 1/64, Madagascar, 119 относятся к II риботипу по разработанной нами ранее классификации риботипов штаммов возбудителя чумы, циркулирующих на территории Российской Федерации, ближнего и дальнего зарубежья [2]. Риботип II по нашей классификации соответствует риботипу B по классификации A.Guiyoule *et al.* [21]. По полученным нами данным штаммы группы EV – *Y. pestis* 229, EV76 и EV НИИЭГ имеют риботип, отличный от риботипа II (B) [4], который характерен для большинства выделенных в этот период на Мадагаскаре штаммов. Наличие уникального риботипа облегчает идентификацию этих вакцинных штаммов среди других

изолятов *Y. pestis*. Вакцинные штаммы группы EV содержат также большую делецию, включающую хромосомную область пигментации, что является причиной потери ими острова высокой патогенности НР1 с генами сидерофорзависимой системы потребления железа и, в конечном счете, причиной аттенуации штаммов группы EV [11].

При использовании метода IS типирования, основанного на вариабельности рестриционных фрагментов, содержащих инсерционные последовательности IS1541, IS100, IS285 G.Torrea *et al.* [29] установлено, что штаммы *Y. pestis*, выделенные на Мадагаскаре, делятся на разные группы. Один кластер составили три штамма, изолированные в округе Амбоситра в 1989–1992 г. Другие кластеры составили штаммы, которые были выделены в более ранние периоды (1946–1969 гг.) в разных регионах острова. Отмечаемое генетическое разнообразие штаммов, выявленное по данным IS типирования, может быть связано с тем, что о. Мадагаскар является одним из наиболее активных регионов по чуме в мире, и активность природных очагов способствует более быстрому накоплению генетических отличий у циркулирующих в них штаммов [29]. Кроме того, здесь существует высокая вероятность генетического обмена штаммов *Y. pestis* с энтеропатогенными бактериями, о чем свидетельствует выделение на Мадагаскаре нескольких антибиотикоустойчивых штаммов *Y. pestis* [17].

Антибиотикоустойчивые штаммы

Лечение чумы было начато с применения сульфонамида в 1938 г. и стрептомицина в 1946 г. Обычно изоляты *Y. pestis* одинаково чувствительны к лекарственным препаратам, активным в отношении грамотрицательных бактерий [15, 16]. Однако в 1995 г. на Мадагаскаре был впервые выделен клинический изолят, который имел высокий уровень устойчивости к антимикробным агентам [16, 17]. Штамм *Y. pestis* 17/95 был изолирован в районе Антананариву от 16-летнего юноши с симптомами бубонной чумы. Штамм имел высокий уровень резистентности к 8 антимикробным агентам, включая не только те, которые используются для лечения (стрептомицин, хлорамфеникол, тетрациклин) и экстренной профилактики (сульфонамид и тетрациклин) чумы, но и к ампициллину, канамицину и спектиномицину. Как было установлено, гены устойчивости к лекарственным препаратам располагались на конъюгативной плазмиде размером около 150 т.п.н., обозначенной как pIP1202 [31]. Плазмида могла с высокой частотой (около $1 \cdot 10^{-2}$) передаваться другим штаммам *Y. pestis* или *Escherichia coli* и, вероятно, была получена от энтеропатогенной бактерии [16, 17].

Второй штамм *Y. pestis* 16/95 с высоким уровнем резистентности к стрептомицину был выделен в том же году от 14-летнего подростка с бубонной чумой в районе Ampitana. Штамм *Y. pestis* 16/95 был резистентен к стрептомицину, но был чувствителен к спектиномицину и другим антимикробным агентам,

включая и те, которые применяются для лечения и профилактики чумы. Резистентность штамма обусловлена присутствием плазмиды rP1203, имевшей размер около 40 т.п.н., которая могла с высокой частотой (около $1 \cdot 10^{-1}$) передаваться другим штаммам *Y. pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis* и чуть с более низкой частотой штаммам *E. coli* [17]. Оба антибиотикоустойчивых штамма *Y. pestis* 17/95 и 16/95 отличались по ряду свойств и были выделены в разных регионах на расстоянии 80 км друг от друга. Штамм 17/95 имел типичный риботип В, в то время как 16/95 относился к новому риботипу Q, специфичному для Мадагаскара [17, 20]. Эти данные свидетельствуют о том, что два антибиотикоустойчивых штамма появились независимо друг от друга. По-видимому, они образовались в результате горизонтального переноса плазмид от других бактерий, принадлежащих семейству *Enterobacteriaceae* [16, 17]. В 1996–1997 гг. в порту Махадзанга выделены один ампициллиноустойчивый и один хлорамфениколустойчивый клинические изоляты; в столице Антананариву – один тетрациклиноустойчивый изолят от крысы и два ампициллиноустойчивых изолята от блох [16, 17, 31]. Все эти данные указывают на то, что возникновение антибиотикоустойчивых штаммов *Y. pestis* в природе не является таким уж редким событием.

Таким образом, чума, завезенная на о. Мадагаскар в 1898 г. широко распространилась по его территории, сформировав антропоургические, природно-антропоургические и природные очаги, характеризующиеся различной эпидемической опасностью. В конце XX и начале XXI веков отмечен рост эпидемической активности антропоургических и природно-антропоургических очагов, который вызвал новый значительный подъем заболеваемости. В настоящее время здесь ежегодно регистрируют около 200–300 случаев бубонной и легочной чумы. Учитывая сезонные закономерности проявления чумы на о. Мадагаскар, можно прогнозировать окончание текущего эпидемического сезона в мае 2011 г. и снижение риска заражения до конца летних месяцев [34]. Несмотря на благоприятный краткосрочный эпидемиологический прогноз на летний сезон, в сентябре–декабре 2011 г. эпидемиологическая обстановка на территории Республики Мадагаскар может вновь резко обостриться, так как на территории Центрального нагорья по-прежнему сохраняются условия для возникновения первичных заражений и распространения инфекции в другие регионы страны. Высокая эпизоотическая и эпидемическая активность очагов чумы на Мадагаскаре способствует изменению циркулирующих здесь штаммов *Y. pestis* за счет процессов горизонтального переноса генетической информации и может привести к возникновению и распространению штаммов возбудителя чумы с измененными свойствами, в том числе и с множественной лекарственной устойчивостью. Происходящее в настоящее время расширение туристических связей между Мадагаскаром и Российской

Федерацией требует пристального внимания к эпидемиологической обстановке в этом государстве и проведения тщательного анализа свойств штаммов *Y. pestis*, выделяемых на этой территории.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арутюнов Ю.И., Москвитина Э.А., Ломов Ю.М., Мишанькин Б.Л., Волохонская Н.Л. Некоторые особенности эпидемических проявлений чумы на Мадагаскаре. Пробл. особо опасных инф. 2001; 2(82):61–8.
2. Ерошенко Г.А., Павлова А.И., Куклева Л.М. и др. Генотипирование штаммов *Yersinia pestis* на основе варибельности генов биосинтеза рННК. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 3: 6–10.
3. Козакевич В.П., Варшавский С.Н., Лавровский А.А. Природная очаговость чумы на Мадагаскаре. Пробл. особо опасных инф. 1973; 1:26–32.
4. Кутырев В.В., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Виноградова Н.А. Сравнительная генетическая характеристика вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV и его предполагаемых «вирулентных производных». Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2009; 4: 50–6.
5. Геронов В.М., Малхазова С.М., Тикунов В.С. Региональная география чумы. В кн.: Итоги науки и техники. Серия Медицинская география. М.: ВИНТИ; 1991. Т. 17. 230 с.
6. Одинокоев Г.Н., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М. и др. Анализ варибельности генов комплекса инсектицидных токсинов у штаммов *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis*. Генетика. 2011; 47(1):10–7.
7. Топорков В.П., Попов Н.В., Кедрова О.В. Оценка эпидемической обстановки по чуме на территории Республики Мадагаскар в 2011 году. [Сайт] Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»; 12.04.2011 [дата обращения 12.04.2011]. 10 с. <http://www.microbe.ru/files/Madagascar2011.pdf>
8. Atlas de la peste a Madagascar [Internet]. Madagascar Institut Pasteur de Madagascar; 2006 [cited 28 Mar 2011]. 53 p. Available from: <http://www.pasteur.mg/IMG/pdf/Atlas-Peste.pdf>
9. Boisier P., Rasolomaharo M., Ranaivoson G., Rasoamanana B., Rakoto L., Andriamahafazafy B., Chanteau S. Urban epidemic of bubonic plague in Mahajanga, Madagascar. Epidemiological aspects. Trop. Med. Int. Health. 1997; 2:422–7.
10. Brygoo E.R. Epidemiologie de la peste à Madagascar. Arch. Inst. Pasteur Madagascar. 1966; 35:9–147.
11. Boolgakova E., Pelludat C., Zoodina I. et al. Complementation of *Yersinia pestis* EV76 with the yersiniabactin «core» of *Yersinia enterocolitica*. In: Microbiology 2000: United Congress of GSHM, ASHMPM and SGAM. Munich, Germany, March 12–16, 2000. BioSpectrum. 2000; Spec.:178.
12. Coulanges P. Situation de la peste à Tananarive, de son apparition en 1921 à sa résurgence en 1979. Arch. Inst. Pasteur de Madagascar. 1979; 56:9–35.
13. Champetier De Ribes G., Rasoamanana B., Randriambeloso J., Rakoto L., Rabeson D., Chanteau S. La peste à Madagascar: données épidémiologiques de (1989) à (1995), et programme national de lutte, Cahiers Santé, de l'AUPELF-UREF. 1997; 7:53–60.
14. Chanteau S., Ratsifasoamanana L., Rasoamanana B. et al. Plague, a reemerging disease in Madagascar. Emerg. Infect. Dis. 1998; 1(4):101–4.
15. Frean J., Klugman K.P., Arntzen L., Bukofzer S. Susceptibility of *Yersinia pestis* to novel and conventional antimicrobial agents. J. Antimicrob. Chemother. 2003; 52(2):294–6.
16. Galimand M., Carniel E., Courvalin P. Resistance of *Yersinia pestis* to antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother. 2006; 50:3233–6.
17. Galimand M., Guiyoule A., Gerbaud G. et al. Multiple antibiotic resistance in *Yersinia pestis* mediated by a self-transferable plasmid. N. Engl. J. Med. 1997; 337:677–80.
18. Girard G., Robic J. Vaccination pesteuse par germs vivants (virus-vaccin E.V.). Trois années de l'application a Madagascar. Bull. Acad. Med. 1938; 120:54.
19. Girard G. L. Immunité dans l'infection pesteuse. Acquisitions apportées par 30 années de travaux sur le souché de Pasteurella pestis (Girard et Robic). Biol. Med (Paris). 1963; 52(6):631–731.
20. Guiyoule A., Grimont F., Itean I. et al. Plague pandemics investigated by ribotyping of *Y. pestis* strains. J. Clin. Microbiol. 1994; 32:634–41.
21. Guiyoule A., Rasoamanana B., Buchrieser C. et al. Recent emergence of new variants of *Yersinia pestis* in Madagascar. J. Clin. Microbiol. 1997; 35:2826–33.
22. Human Plague in 1996. Wkly Epidemiol. Rec. 1998; 73(47):366–9.
23. Human plague: review of regional morbidity and mortality 2004–2009. Wkly Epidemiol. Rec. 2010; 85(6):40–5.

24. Institute Pasteur de Madagascar. Plague, pneumonic – Madagascar. ProMed-mail [Internet]. 21 Feb 2011 [cited 25 Feb 2011]. Archive Number 20110221.0563. Available from: <http://www.promedmail.org>
25. Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J. et al. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. *Nat. Genet.* 2010; 42(12):1140–3. DOI:10.1038/ng.705. [Supplementary information. Available from: <http://www.nature.com/ng/journal/v42/n12/extref/ng.705-S1.pdf>]
26. Pollitzer R. Plague. WHO Monograph Series no. 22. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1954. 698 p.
27. Robic J. Trente années de lutte contre la peste a Madagascar. *Revue Coloniale de Medecine et de Chirurgie.* 1954; 26:92–102.
28. Tollenaere C., Duplantier J.-M., Rahalison N. et al. AFLP genome scan in the black rat (*Rattus rattus*) in Madagascar: detection genetic markers undergoing plague-mediated selection. *Mol. Ecology.* 2011; 20:1026–38.
29. Torrea G., Chenal-Francois V., Leclercq A., Carniel E. Efficient tracing of global isolates of *Yersinia pestis* by restriction fragment length polymorphism analysis using three insertion sequences as probes. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:2084–92
30. UNICEF launches new campaign to stop the spread of pneumonic plague in Madagascar. Updated: 20 Apr 2011 [Cited 20 Apr 2011]. Available from: http://www.unicef.org/infobycountry/madagascar_58308.html
31. Welch T.J., Fricke W. F., McDermott P. F. et al. Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. *PLoS One.* 2007; 2(3):e309.
32. World Health Organization. Regional Humanitarian Health Update. Eastern and Southern Africa. September and October 2010. Pneumonic plague. [Internet]. Nov 2010 [cited 25 Mar 2011]. Available from: <http://ochaonline.un.org/OchaLinkClick.aspx?link=ocha&docId=1177567>
33. World Health Organization. Regional Humanitarian Health Update. Eastern and Southern Africa. January 2011. Pneumonic plague in Madagascar. [Internet]. Feb 2011 [cited 25 Mar 2011]. Available from: <http://ochaonline.un.org/OchaLinkClick.aspx?link=ocha&docId=1178973>
34. World Health Organization. Regional Humanitarian Health Update. Eastern and Southern Africa. February 2011. Update on Pneumonic plague in Madagascar [Internet]. Mar 2011 [cited 25 Mar 2011]. Available from: <http://ochaonline.un.org/OchaLinkClick.aspx?link=ocha&docId=1192247>

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

1. Arutyunov Yu.I., Moskvitina E.A., Lomov Yu.M., Mishan'kin B.L., Volokhonskaya N.L. [Some peculiarities of plague epidemic manifestations in Madagascar]. *Probl. Osobo Opasn. Inf.* 2001; 2(82):61–8.
2. Eroshenko G.A., Pavlova A.I., Kukleva L.M., Shavina N.Iu., Kutyrev V.V. [Genotyping of *Yersinia pestis* strains on the basis of variation of ribosomal rRNA biosynthesis genes]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2007; 3:6–10.
3. Kozakevich V.P., Varshavskii S.N., Lavrovskii A.A. [Plague natural locality in Madagascar]. *Probl. Osobo Opasn. Inf.* 1973; 1:26–32.
4. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Shavina N.Iu., Vinogradova N.A. [Comparative genetic characteristic of vaccine strain of *Yersinia pestis* EV and its putative “virulent derivatives”]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2009; 4:50–6.
5. Neronov V.M., Malkhazova S.M., Tikunov V.S. [Regional plague geography]. In: [The Results of Science and Technique. Medical Geography Series]. M.: VINITI; 1991. V. 17. 230 p.
6. Odnokov G.N., Eroshenko G.A., Krasnov Ia.M., Guseva N.P., Kutyrev V.V. [Analysis of insect toxin complex gene variability of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains]. *Genetika.* 2011 Jan; 47(1):10–7.
7. Toporkov V.P., Popov N.V., Kedrova O.V. [Assessment of plague epidemic situation in the territory of the Republic of Madagascar]. [Internet]. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 12 Apr 2011 [cited 12 Apr 2011]. 10 p. Available from: <http://www.microbe.ru/files/Madagasc2011.pdf>

Authors:

Kutyrev V.V., Popov N.V., Eroshenko G.A., Merkulova T.K. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

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

Поступила 14.04.11.

УДК 616.91/98:350.08

А.В.Бойко, Т.А.Малюкова, Л.А.Тихомирова, З.С.Юсупова, М.Н.Ляпин, А.В.Топорков

ОЦЕНКА ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ ПОДГОТОВЛЕННОСТИ ПЕРСОНАЛА, ДОПУСКАЕМОГО К РАБОТЕ С ПАТОГЕННЫМИ БИОЛОГИЧЕСКИМИ АГЕНТАМИ I–II ГРУПП

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

В работе представлен впервые разработанный алгоритм оценки уровня профессиональной подготовленности персонала, допускаемого к работам с патогенными биологическими агентами I–II групп. Определены содержание, требования к организации и порядок оценки показателей, определяющих наличие профессиональных знаний и навыков, необходимых для безопасного, качественного и эффективного выполнения должностных обязанностей.

Ключевые слова: биологическая безопасность, патогенные биологические агенты I–II групп, профессиональная подготовленность, риск нарушения профессиональной подготовленности.

A.V.Boiko, T.A.Malyukova, L.A.Tikhomirova, Z.S.Yusupova, M.N.Lyapin, A.V.Toporkov

Evaluation of Professional Qualification of the Personnel Authorized for Work with Pathogenic Biological Agents of I–II Groups

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov

Presented is the algorithm of assessment of the level of professional qualification of the personnel authorized for work with pathogenic biological agents of I–II groups, developed for the first time. Determined are the essence, requirements for organization and order of assessment of the indices that predict the presence of occupational knowledge and skills necessary for safe, high-quality and effective execution of professional duties.

Key words: biological safety, pathogenic biological agents of I–II groups, professional qualification, risk of professional qualification disturbance.

Обеспечение биобезопасности функционирования учреждений, осуществляющих разные виды деятельности с использованием патогенных биологических агентов (ПБА) I–II групп, в значительной степени зависит от профессиональной надежности персонала. Одним из ведущих компонентов профессиональной надежности является профессиональная подготовленность работников [2].

Профессиональная подготовленность (ПП) – это совокупность показателей, определяющих наличие профессиональных знаний и навыков, необходимых для безопасного, качественного и эффективного выполнения должностных обязанностей [2].

Оценка уровня профессиональных знаний и навыков, необходимых для выполнения определенной работы и/или группы работ, предполагает выбор оптимального подхода к проведению оценки ПП.

Оценка профессиональной подготовленности в учреждениях, осуществляющих деятельность с ПБА, необходима в том числе для обеспечения биологической безопасности работ и функционирования учреждения. В связи с этим одними из основных требований, определяющих допуск к работе с ПБА, является подготовка на соответствующих курсах и сдача зачета по знанию положений действующих нормативных и методических документов, регламентирующих обеспечение биобезопасности работ с ПБА [1].

Вместе с тем в национальных нормативах по

безопасности работ и профессионального образования отсутствуют положения о необходимости проведения количественной оценки подготовленности, а также методология и методики количественной оценки класса подготовленности и риска нарушения подготовленности.

Целью работы является разработка подхода, позволяющего формализовать оценку уровня подготовки специалиста, количественно оценить класс подготовленности каждого сотрудника и риск ее нарушения.

Материалы и методы

Уровень ПП персонала и риск его снижения можно определить при помощи тестирования и метода экспертных оценок.

Тестовые задания разрабатывают с использованием дифференцированного подхода к оценке знаний и навыков различных категорий работников: дезинфекторов, лаборантов, врачей-бактериологов, научных сотрудников, руководителей (подразделения, учреждения). Одним из вариантов организации и проведения автоматизированного процесса обучения и контроля знаний по вопросам биобезопасности является разработанная «Комплексная программа самообучения и контроля знаний правил биологической безопасности работ с патогенами I–II групп» [4]. База данных программного комплекса «Биобезопасность:

правила работы с патогенными микроорганизмами в вопросах и ответах» [3] содержит вопросы, предусматривающие освоение действующих санитарных правил [1, 6, 7] и инструкций учрежденческого уровня.

Возможно проведение экспертами устного зачета с целью оценки знания работником положений действующих нормативных и методических документов, регламентирующих биобезопасность при работе с ПБА, его профессионального мышления, умения анализировать имеющуюся информацию и решать конкретные задачи при работе с патогенами (диагностические, тактические, организационные).

Заключение об уровне ПП работника принимает эксперт на основании обобщения результатов тестирования/зачета и оценки выраженности качеств, описанных в табл. 2.

Результаты и обсуждение

Разработан алгоритм определения уровня профессиональной подготовленности персонала, допускаемого к работам с патогенными биологическими агентами I–II групп, и риска его снижения. С этой целью использован ранее предложенный подход [5], позволяющий формализовать оценку уровня подготовки специалиста, и с помощью методов математической обработки результатов тестирования или экспертной оценки количественно оценить класс подготовленности сотрудника и риск нарушения подготовленности.

Уровень профессиональной подготовленности работника определяют на основании результатов тестирования и/или устного зачета и экспертной оценки ряда качеств сотрудника.

При разработке тестовых заданий использован дифференцированный подход к обучению и контролю знаний специалистов разного профиля и уровня допуска [3, 4]. Комплекс вопросов разделен на семь основных групп: вопросы общего характера, для работников бактериологических лабораторий, зоолого-паразитологических, вирусологических, эпидемиологических подразделений, для административных работников разного уровня, для персонала здравпункта и изолятора.

Внутри каждой группы (кроме административных работников и вопросов общего характера) выделено по три подгруппы вопросов в соответствии с тремя уровнями допуска к работе с ПБА:

I – по обязанностям врача, научного сотрудника;

II – по обязанностям лаборанта;

III – по обязанностям дезинфектора.

В каждую подгруппу включены вопросы, определяющие знание требований обеспечения биобезопасности общего характера и специальные, необходимые при выполнении конкретных должностных обязанностей. Для каждого вопроса разработаны по три варианта ответов, один правильный и несколько отвлекающих (дистракторов). Наличие нескольких вариантов ответов делает усвоение материала бо-

лее наглядным и логичным. Такие тестовые задания основаны на использовании теоретических знаний и практических навыков, правильных стандартных действиях, прописанных в нормативных, методических и инструктивных документах. Для каждого правильного ответа устанавливается 1 балл, для неверного – 0 баллов. Для выбора ответа на каждый вопрос предусмотрено по 1 мин.

В тестовых заданиях определены приоритетные вопросы. При неверном ответе на любой приоритетный вопрос результаты тестирования аннулируются. По окончании автоматизированного контроля [4] на экран выводятся результаты: количество правильных ответов; вопросы, на которые даны неверные ответы; время, затраченное на проведение контроля; количество набранных баллов.

Предусмотрены два режима работы комплексной программы – обучающий и контролирующий [4]. Оценка ПП проводится в контролирующем режиме программы. Уровень ПП оценивают с учетом классификационных признаков (табл. 1).

Тестовый экзамен засчитывается, если соискатель правильно ответил не менее чем на 70 % тестовых заданий.

Определение класса ПП с использованием устного зачета по знанию правил безопасной работы проводит эксперт с учетом градации подготовленности (табл. 1) и определяет соответствующий ранг (балл).

Экспертную оценку качеств работника, допускаемого к манипуляциям с ПБА, проводят в соответствии с материалами табл. 2.

Заключение об уровне ПП работника эксперт принимает на основании обобщения результатов тестирования/зачета и оценки выраженности качеств, описанных в табл. 2, с последующим определением ранга (балла) согласно классификационным характеристикам (табл. 1).

Полученные сведения имеют как самостоятельную ценность, так и являются одним из критериев, используемых при оценке надежности профессиональной деятельности работников. Вместе с тем для разработки и принятия административных решений с целью профилактики нарушения надежности профессиональной деятельности работников необходимо оценивать риск снижения отдельных составляющих ее компонент, в т.ч. риск снижения ПП.

Таблица 1

Градация профессиональной подготовленности и их оценка

Результаты тестовых заданий, %	Уровень	Ранг (баллы)
90–100	Высокий	1
80–89	Выше среднего	2
70–79	Средний	3
-	Ниже среднего	4
Меньше 70 или неверные ответы на приоритетные вопросы теста	Низкий	5

Риск снижения ПП оценивают в три этапа: оценка вероятности реализации риска; оценка уровня риска нарушения ПП; оценка уровня риска с позиции социальной допустимости.

Оценка вероятности реализации риска. Вероятность реализации риска (Р) оценивается экспертами с использованием качественного описания, характеризующего насколько близка к реализации возможность нерегламентированных действий работника при снижении его ПП (табл. 3), и переводится в соответствующие баллы.

Оценка уровня риска нарушения ПП работника. С этой целью используется матрица рисков. Подход позволяет по сочетанию характеристик «уровень профессиональной подготовленности – вероятность реализации риска» оценить уровень риска нарушения подготовленности (табл. 4). По таблице определяют ячейку, расположенную на пересечении полученных ранее значений ПП и Р. Полученный показатель соответствует одному из уровней риска (УР): 1 – игнорируемый, 2 – незначительный, 3 – умеренный, 4 – существенный, 5 – критический.

Например, если уровень ПП работника оценивают как «выше среднего» (ПП = 2 балла), вероятность возникновения нарушений в профессиональной деятельности как «игнорируемая» (Р = 1 балл), то по матрице риска это соответствует «игнорируемому риску» нарушения ПП (УР = 1). Если при той же профессиональной подготовленности у эксперта

есть свидетельства о случаях не реализации работником полученных знаний и навыков в практической деятельности (Р = 4 балла), то это повышает риск нарушения до «существенного» (УР = 4).

Оценка уровня риска с позиции социальной допустимости. Оценка осуществляется экспертом в соответствии с классификационными характеристиками:

- приемлемыми (УР ≤ 2) можно считать уровни риска 1 (игнорируемый) и 2 (незначительный). При этом уровень ПП может изменяться от «среднего» до «высокого», а вероятность реализации риска от «игнорируемой» до «мало вероятной»;

- социально допустимым (УР = 3) является уровень риска 3 (умеренный риск). При этом уровень ПП может изменяться от «высокого» до «ниже среднего» уровня, а вероятность реализации риска – от «игнорируемой» до «вероятной»;

- социально недопустимыми (4 ≤ УР ≤ 5) являются уровни риска 4 (существенный) и 5 (критический). Это соответствует изменению уровня ПП от «низкого» до «ниже среднего», а вероятности реализации риска – от «вероятной» до «почти возможной».

Уровень ПП и риск его нарушения оценивают в плановом порядке: один раз в два года с целью оформления допуска к работе с ПБА [1]; по окончании цикла лекций по безопасности работ с ПБА и самостоятельного изучения требований нормативных документов при обучении на курсах профессиональной переподготовки по специальностям «бактериология» и «эпидемиология» с освоением методов безопасной работы с возбудителями особо опасных инфекций; в случае прямых или косвенных данных о допущенных работником нарушениях на основании распоряжения (приказа) руководителя организации. Кроме того, при перерывах в работе более 6 месяцев необходимо проводить внеплановую оценку ПП.

Таким образом, использование предлагаемого алгоритма позволяет организовать контроль (в т.ч. оперативный) знаний правил биологической безопасности работ с ПБА у персонала; получать информацию для принятия решений по повышению уровня ПП работника(ов); повысить качество

Таблица 2

Качества работника, используемые для оценки ПП

Оцениваемые качества	Уровень оцениваемого качества	Шифры ответов
Уровень теоретических знаний и компетентности	Высокий	1
	Выше среднего	2
	Средний (требует совершенствования)	3
	Низкий (недостаточный)	5
Скорость овладения профессиональными навыками	Высокий	1
	Выше среднего	2
	Средний (требует совершенствования)	3
	Низкий (недостаточный)	5
Ошибки в работе	Не допускал ошибок	1
	Допускал незначительные ошибки	2
	Неоднократно	3
	Регулярно	5
Уровень приверженности принципам культуры безопасности и производственным инструкциям	Высокий	1
	Выше среднего	2
	Средний (требует совершенствования)	3
	Низкий (недостаточный)	5
Стремление к совершенствованию профессионального мастерства	Активно совершенствуется в работе	1
	Собственной инициативы не проявляет	2
	Стремится уклониться	3
	Отказывается от совершенствования	5

Таблица 3

Градация вероятности реализации риска при нарушении ПП: описание и оценка

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

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

Матрица рисков

Вероятность реализации риска (P)	Уровни профессиональной подготовленности (ПП)				
	Высокий (1 балл)	Выше среднего (2 балла)	Средний (3 балла)	Ниже среднего (4 балла)	Низкий (5 баллов)
Игнорируемая (1 балл)	1	1	2	3	4
Слабовероятная (2 балла)	1	2	3	4	4
Маловероятная (3 балла)	2	3	3	4	4
Вероятная (4 балла)	3	4	4	4	5
Почти возможная (5 баллов)	4	4	4	5	5

обучения правилам биобезопасности работ с ПБА; получить базовые данные для оценки надежности профессиональной деятельности работника(ов) и включения в паспорт безопасности учреждения; повысить эффективность обеспечения биобезопасности учреждения; повысить эффективность управления организацией.

Необходимо отметить, что многие виды деятельности с ПБА включают работы с одновременным использованием микроорганизмов I–II и III–IV групп патогенности. Следовательно, актуальным является совершенствование тестовых программ [3, 4] путем включения положений действующих нормативных, методических и инструктивных документов по безопасности работ с ПБА III–IV групп.

Работа выполнена по государственному контракту № 51-Д от 29.06.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)»

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безопасность работ с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). Санитарные правила. СП 1.3.1285-03. Бюл. норм. и метод. док. Госсанэпиднадзора. 2003; 3(13):61–144.
2. Ипатов П.Л., Мартенс В.К., Сорокин А.В., Бобров А.Ф., Басов В.И. Профессиональная надежность персонала АЭС: Концепция и технология количественной оценки, практика управления. Саратов; 2003. 232 с.
3. Ляпин М.Н., Малукова Т.А., Филимонов Е.С. и др. База данных «Биобезопасность: правила работы с патогенными микроорганизмами в вопросах и ответах». RU ОБПБТ. 2006; 2(55):89.
4. Ляпин М.Н., Малукова Т.А., Филимонов Е.С. и др. Комплексная программа самообучения и контроля знаний правил биологической безопасности работ с патогенными биологическими агентами I–II групп. RU ОБПБТ. 2005; 4(53):90.
5. Малукова Т.А., Бобров А.Ф., Щепланов В.Ю. и др. Методологические основы оценки надежности профессиональной деятельности персонала, работающего с микроорганизмами I–II групп патогенности. Пробл. особо опасных инф. 2010; 1(103):37–43.
6. Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического за-

ключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека I–IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами. Санитарно-эпидемиологические правила. СП 1.2.1318-03. М.: Минздрав России; 2003. 39 с.

7. Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности. Санитарные правила. СП 1.2.036-95. М.: Госкомсанэпиднадзор России; 1996. 80 с.

8. Сухов Д.Н. Социальная психология безопасности. М.: АCADEMi A; 2002. 315 с.

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

1. [Sanitary and Epidemiological Regulations “Safety of Work with the Microorganisms of I–II Pathogenicity (Hazard) Groups”: SR 1.3.1285-03], Bul. Norm. Method. Dok. Gossanepidnadzor. 2003; 3(13):61–144.
2. Ipatov P.L., Martens V.K., Sorokin A.V., Bobrov A.F., Basov V.I. [Occupational Reliability of APS personnel: Conception and Technology of Quantitative Assessment, Management Practice]. Saratov; 2003. 232 p.
3. Lyapin M.N., Malyukova T.A., Filimonov E.S. et al. [Data Base “Biosafety: rules of work with pathogenic microorganisms in questions and answers”]. RU OBPBT. 2006; 2(55): 89.
4. Lyapin M.N., Malyukova T.A., Filimonov E.S. et al. [Integrated program of self-training and knowledge testing as regards biosafety rules of work with pathogenic biological agents of I–II groups]. RU OBPBT. 2005; 4(53):90.
5. Malyukova T.A., Bobrov A.F., Scheblanov V.Yu., Tikhomirova L.A., Boiko A.V., Toporkov A.V. [Methodological background of the assessment of reliability of the professional activity of the personnel working with PBA of pathogenicity groups I–II]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; 1(103):37–43.
6. [Sanitary and Epidemiologic Regulations “Order of Issue of Sanitary and Epidemiological Conclusion on Possibility of Carrying out Work with Human Infectious Diseases Agents of I–IV Groups of Pathogenicity (Hazard), Gene-Engineering Microorganisms, Poisons of Biologic Origin and Helminths”: SR 1.2.1318-03]. M.: Minzdrav RF; 2003. 39 p.
7. [Sanitary Regulations “Order of Registration, Storage, Transfer and Transportation of the Microorganisms of I–II Pathogenicity Groups”: SR 1.2.036-95]. M.: Goskomsanepidnadzor RF, 1996. 80 p.
8. Sukhov D.N. [Social Psychology of Safety]. M.: ACADEMi A; 2002. 315 p.

Authors:

Boiko A.V., Malyukova T.A., Tikhomirova L.A., Yusupova Z.S., Lyapin M.N., Toporkov A.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Бойко А.В., Малукова Т.А., Тихомирова Л.А., Юсупова З.С., Ляпин М.Н., Топорков А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 17.02.11.

Н.Г.Варфоломеева¹, А.В.Ермаков², Н.Ф.Василенко¹, Г.П.Шкарлет¹, О.В.Малецкая¹,
О.А.Кирейцева¹, И.Н.Заикина¹, А.Н.Куличенко¹

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ОБСТАНОВКА ПО ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫМ ВИРУСНЫМ ИНФЕКЦИЯМ НА ТЕРРИТОРИИ СТАВРОПОЛЬСКОГО КРАЯ

¹ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»,

²Управление Роспотребнадзора по Ставропольскому краю

Ландшафтно-географические и климатические особенности Ставропольского края, высокая численность клещей и комаров, разнообразный видовой состав диких млекопитающих и птиц, развитое животноводство и инфраструктура создают благоприятные условия не только для циркуляции арбовирусов и хантавирусов, но и возможности развития заболеваний инфекциями вирусной этиологии, вызывающими в ряде случаев серьезные эпидемические осложнения. В настоящее время на территории Ставропольского края активно функционирует природный очаг КГЛ, кроме того, выявлено наличие возбудителей лихорадки Западного Нила, клещевого энцефалита, лихорадки Батаи и антител к ним, а также возбудителя геморрагической лихорадки с почечным синдромом.

Ключевые слова: природно-очаговые арбовирусные инфекции, антигены, антитела, иксодовые клещи, орнитофильные комары, Крымская геморрагическая лихорадка, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом.

N.G.Varfolomeeva, A.V.Ermakov, N.F.Vasilenko, G.P.Shkarlet, O.V.Maletskaaya, O.A.Kireitseva, I.N.Zaikina,
A.N.Kulichenko

Epidemiological Situation on Natural Focal Viral Infections in the Territory of the Stavropol Region

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Rosпотребнадзор Administration in the Stavropol Region

Landscape-geographical and climatic peculiarities of the Stavropol Region, high abundance of mosquito and ticks, the diversity of wild mammal and bird species, developed agriculture and infrastructure create favorable conditions for circulation of arboviruses and hantaviruses, emergence of cases of viral infections, which sometimes cause serious epidemic complications. CHF natural focus actively functions in the territory of the Stavropol Region at present. Detected is presence of West Nile fever, tick-borne encephalitis, Batai fever agents and specific antibodies, as well as hemorrhagic fever with renal syndrome agent.

Key words: natural focal arboviral infections, antigens, antibodies, ticks, ornithophilous mosquito, Crimean hemorrhagic fever, hemorrhagic fever with renal syndrome.

Ставропольский край занимает центральную часть Предкавказья, западную часть Прикаспийской низменности и, частично, северные склоны Большого Кавказа [4]. Интенсивное развитие санаторно-курортного комплекса, туристическо-рекреационной инфраструктуры вызывает большой приток туристов в данный регион. Это обуславливает повышенные требования к обеспечению противоэпидемической безопасности населения. Климатические особенности Ставропольского края с его ландшафтным разнообразием, обилием иксодовых клещей, орнитофильных комаров, процессами антропогенного влияния на экосистемы создают благоприятные условия для формирования природных очагов вирусных инфекций, что определяет необходимость изучения циркуляции их возбудителей на территории края.

В настоящее время на территории Российской Федерации установлена циркуляция ряда арбовирусов, относящихся к II группе патогенности (опасности) и известных как возбудители природно-очаговых, острых лихорадочных заболеваний человека с трансмиссивным, а иногда и контактным путем заражения. Арбовирусы («arthropod – borne») – экологическая группа вирусов, передающихся путем биологи-

ческой трансмиссии восприимчивым позвоночным кровососущими членистоногими переносчиками [2]. Борьба, а часто и этиологическая расшифровка вспышек арбовирусных инфекций, затрудняется огромным антигенным разнообразием возбудителей, одновременной циркуляцией различных вирусов и необходимостью лабораторного подтверждения диагноза, отсутствием специфических средств лечения и профилактики [3].

Среди природно-очаговых арбовирусных инфекций на территории края лидирующее место занимает Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ), о чем свидетельствует высокая заболеваемость людей и ежегодное выявление возбудителя в клещах, комарах, крови сельскохозяйственных животных, органах птиц и диких мелких млекопитающих. Природный очаг КГЛ на территории края активизировался в 1999 г. после длительного перерыва. В период с 1999 по 2009 год зарегистрированы 492 больных, что составляет 36,9 % от всех больных, выявленных в Южном федеральном округе.

В результате эпизоотологического мониторинга на территории Ставропольского края за этот период собраны и исследованы 85669 экз. иксодовых клещей. Антиген вируса КГЛ выявлен в 353 пробах

иксодовых клещей десяти видов: *Hyalomma marginatum*, *H. scupense*, *Dermacentor marginatus*, *D. reticulatus*, *Rhipicephalus rossicus*, *Rh. bursa*, *Rh. sanguineus*, *Haemaphysalis punctata*, *Boophilus annulatus*, *Ixodes ricinus*, что составило 4,4 % от числа всех исследованных проб. Антиген вируса ККГЛ обнаружен в 46 пробах органов диких грызунов и птиц (2,5 %). Выявлены специфические антитела в сыворотках крови сельскохозяйственных животных (4,0 %) и сыворотках крови доноров (4,7 %). Циркуляция возбудителя КГЛ установлена практически на всей территории края.

В настоящее время остается актуальной проблема лихорадки Западного Нила (ЛЗН) в связи с постоянным расширением ареала этой инфекции. Вспышки и даже единичные случаи ЛЗН требуют особого внимания, что отражено в Международных медико-санитарных правилах ВОЗ (2005). Сезонные миграции птиц способствуют трансконтинентальному переносу вируса ЛЗН.

В Ставропольском крае, в связи с обострившейся эпидемиологической обстановкой по ЛЗН в соседних регионах, проведение эпидемиологического и эпизоотологического мониторинга начато с 2004 г. Эпизоотологическим обследованием были охвачены территории 16 административных районов края, в том числе краевой центр. В течение последних пяти лет на наличие вируса ЛЗН исследовано 3573 экз. орнитофильных комаров и 4914 экз. клещей. Методом ОТ-ПЦР РНК вируса ЛЗН выявлена в 14 пробах суспензий комаров рода *Aedes* (6,0 %) и 13 пробах клещей *Hyalomma marginatum* (2,9 %). Методом ИФА антиген вируса обнаружен в 25 пробах головного мозга птиц и мышевидных грызунов (2,9 %).

С целью обнаружения специфических антител к вирусу ЛЗН ретроспективно исследованы 268 сывороток крови больных людей с лихорадками неясной этиологии. Выявлены девять положительных проб, из них четыре – с высокими титрами (1:6400–1:12800). При исследовании положительных проб на авидность оказалось, что высокотитражные сыворотки содержали низкоавидные антитела, свидетельствующие о недавно перенесенной болезни. Но поскольку специфическая лабораторная диагностика на ЛЗН в крае не проводится, зарегистрированные случаи заболевания отсутствуют. Для оценки уровня естественной иммунизации населения исследовались сыворотки крови доноров, при этом из 1302 проб положительными оказались 21 (1,6 %).

Очаги клещевого вирусного энцефалита (КВЭ) широко распространены в умеренной климатической зоне Евразии, от Дальнего Востока до Западной Европы. Резервуаром вируса КВЭ являются иксодовые клещи и грызуны. Прокормителями клещей являются крупные и мелкие млекопитающие, птицы. Ставропольский край располагает всеми условиями для возникновения заболеваний клещевым энцефалитом. Так, в регионе существует типичный ландшафт, характерный для природных очагов КВЭ – это

лиственные и смешанные хвойно-лиственные леса, пойменные луга по берегам рек, берега озер и рек, лесные просеки и др., создающие условия обитания иксодовых клещей – переносчиков вируса клещевого энцефалита.

Антиген вируса клещевого энцефалита (КЭ) обнаружен в 62 пробах иксодовых клещей *I. ricinus*, *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *Haem. punctata* из 831 исследованной, что составило 7,5 %. Положительные пробы выявлены в восьми районах края и Ставрополе. Специфические антитела к вирусу КЭ выявлены в пяти пробах сывороток крови доноров (2,2 %). Случаи заболевания КЭ в крае не зарегистрированы из-за отсутствия лабораторной базы.

В последние годы показано широкое распространение в России лихорадки Батаи. Мониторинг, проведенный в последние годы, привел к изоляции вируса лихорадки Батаи в различных поясах европейской части РФ, в том числе Ростовской, Волгоградской, Саратовской, Астраханской областях и Краснодарском крае [1].

Исследование 370 сывороток крови овец, собранных на территории Ставропольского края в 2008–2009 гг., позволило выявить специфические антитела к вирусу Батаи в 17 пробах (4,6 %). При исследовании комаров положительные пробы отсутствовали. В 2010 г. антиген вируса Батаи обнаружен в 7 пробах головного мозга птиц, что составило 10,6 % от общего количества исследованных проб, в том числе: 6 проб от грачей и 1 – от речной крачки. Положительной была также 1 проба клещей *Rh. rossicus* из 16 исследованных.

Другая группа вирусов – хантавирусы – циркулирует среди позвоночных животных, преимущественно среди грызунов, без участия кровососущих членистоногих. К ней относится, в частности, возбудитель геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС).

В Ставропольском крае в период с 2006 по 2009 год нами проведено эпизоотологическое обследование ряда районов, в результате которого установлена циркуляция возбудителя ГЛПС. Антиген хантавируса выявлен в 58 пробах суспензий легких грызунов, что составило 5,7 % от всего количества исследованных проб. Положительные пробы распределились следующим образом: желтобрюхая мышь (*Apodemus fulvipectus*) – 14 (8,2 % от всего количества животных этого вида); мышь малая лесная (*A. uralensis*) – 1 (3,1 %); домовая мышь (*Mus musculus*) – 16 (5,9 %); тамарисковая песчанка (*Meriones tamariscinus*) – 11 (13,6 %); обыкновенная полевка (*Microtus arvalis*) – 12 (7,0 %); общественная полевка (*M. socialis*) – 3 (3,6 %); белозубка малая (*Crocidura suaveolens*) – 2 (18,1 %); землеройка-белозубка (без определения вида) – 1 (2,5 %). Совпадение положительных результатов проб, исследованных методами ИФА и ОТ-ПЦР, отмечено в пяти случаях (8,6 %). Положительные пробы выявлены в 8 из 10 обследованных районов края.

До настоящего времени территория Ставропольского края считается эндемичной по хантавирусам, поэтому исследования клинического материала на ГЛПС не проводятся. Тем не менее, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что на территории края циркулируют хантавирусы. При этом основным резервуаром вируса ГЛПС является желтобрюхая мышь. В связи с этим необходимо дальнейшее проведение исследований с использованием молекулярно-генетических методов для установления серо-генотипа хантавируса.

Таким образом, на территории Ставропольского края активно функционирует природный очаг КГЛ. Кроме того, выявлено наличие возбудителей лихорадки Западного Нила, клещевого энцефалита, лихорадки Батаи и антител к ним, а также возбудителя ГЛПС. Все это определяет необходимость систематического обследования территории края в отношении природных очагов вирусных инфекций, в связи с постоянным повсеместным расширением ареала их возбудителей. Не менее важной задачей является готовность лечебно-профилактических учреждений края к проведению клинической лабораторной диагностики, направленной на выявление случаев заболевания населения природно-очаговыми вирусными инфекциями. Необходимо создание лабораторной базы для проведения качественной лабораторной диагностики с целью идентификации этиологического агента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Колобухина Л.В., Львов Д.Н. Лихорадка Батаи. В кн.: Медицинская вирусология. М.: Медицинское информационное агентство; 2008. С. 527–31.
2. Львов Д.К., Клименко С.М., Гайдамович С.Я. Арбовирусы и арбовирусные инфекции. М.; 1989. 335 с.
3. Львов Д.К., Колобухина Л.В. Вирусные (арбовирусные) инфекции с трансмиссивной передачей. В кн.: Медицинская вирусология. М.: Медицинское информационное агентство; 2008. С. 493–4.
4. Шальнев В.А. Ландшафты Северного Кавказа: Эволюция и современность. Ставрополь; 2004. 265 с.

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

1. Kolobukhina L.V., L'vov D.K. [Batai Fever]. In: [Medical Virology]. M.:MIA; 2008. P. 527–31.
2. L'vov D.K., Klimenko S.M., Gaidamovich S.Ya. [Arboviruses and Arboviral Infections]. M.:Meditsyna; 1989. 335 p.
3. L'vov D.K., Kolobukhina L.V. [Viral (Arboviral) Transmissible Infections]. In: [Medical Virology]. M.:MIA; 2008. P. 493–4.
4. Shal'nev V.A. [Landscapes of the North Caucasus: Evolution and Modernity]. Stavropol; 2004. 265 p.

Authors:

Varfolomeeva N.G., Vasilenko N.F., Shkarlet G.P., Maletskaya O.V., Kireitseva O.A., Zaikina I.N., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. Sovetskaya St., 13–15, Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Ermakov A.V. Rospotrebnadzor Administration in the Stavropol Region. Stavropol.

Об авторах:

Варфоломеева Н.Г., Василенко Н.Ф., Шкарлет Г.П., Малецкая О.В., Кирейцева О.А., Заикина И.Н., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Ермаков А.В. Управление Роспотребнадзора по Ставропольскому краю. Ставрополь.

Поступила 22.12.10.

В.М.Дубянский

ОЦЕНКА ВЕРОЯТНОСТИ ВЫЯВЛЕНИЯ ЭПИЗООТИЙ ЧУМЫ ПРИ МИНИМАЛЬНОМ УРОВНЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ЭПИЗООТИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА, РАССЧИТАННОМ ПУТЕМ ЕГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»

На модели чумного эпизоотического процесса в поселении больших песчанок (*Rhombomys opimus*) показано, что эпизоотия чумы может развиваться при низком уровне эпизоотического контакта. При этом величина эпизоотического участка и количество «зараженных» колоний будет слишком мало для выявления эпизоотии при стандартном эпизоотологическом обследовании.

Ключевые слова: чума, эпизоотия, модель, контакт.

V.M.Dubyanskii

Evaluation of Probability of Plague Epizooties Detection at the Minimal Level of Epizootic Process Intensity Measured Using Its Modeling

Stavropol Anti-Plague Research Institute

Using model of plague epizootic process in great gerbils (*Rhombomys opimus*) settlements, authors showed that plague epizooty could develop at low level of epizootic contact. In this case the size of epizootic site and the number of "infected" colonies were expected to be insufficient to detect epizooty by standard epizootologic examination.

Key words: plague, epizooty, model, contact.

Моделирование чумного эпизоотического процесса в поселениях больших песчанок (*Rhombomys opimus* Licht., 1823 – *Rodentia, Cricetidae*) на ЭВМ позволяет проверять количественные параметры эпизоотии, недоступные для непосредственного наблюдения в природе [7]. Однако известна только одна более или менее успешная попытка создания подобной модели [7, 9]. Ее авторы показали перспективность этого направления, но разработанная ими модель имела ряд существенных ограничений [1]. Интенсивное развитие современных геоинформационных технологий и дистанционного зондирования дают возможность моделирования чумного эпизоотического процесса на качественно ином уровне [4]. На основе этих технологий создана модель, позволяющая в качестве параметра использовать реальную структуру пространственной конфигурации поселений большой песчанки. Модель позволяет эффективно применять различные математические приемы для исследования закономерностей эпизоотического процесса в требуемом числе повторностей экспериментов и изучать различные характеристики эпизоотии чумы.

В данном случае целью экспериментов на модели были поиск минимального уровня эпизоотического контакта, при котором возможен длительно текущий эпизоотический процесс, а также оценка вероятности обнаружения такого процесса при стандартном эпизоотологическом обследовании в реальных условиях.

Подробные описания параметров и особенностей работы модели приведены в предыдущих публикациях [4]. Поэтому в данной статье даны только

самые необходимые сведения и понятия, используемые при моделировании чумного эпизоотического процесса.

Математическая основа модели – вероятностный клеточный автомат (ВКА) [2]. В модели используется принцип ВКА с применением процедуры Монте-Карло.

Колония в модели – дискретная единица эпизоотического процесса. «Зараженной» является любая колония, в которой есть возбудитель чумы (независимо от места его конкретной дислокации), и он может быть передан на другие колонии (опять же независимо от конкретного механизма передачи).

При работе модели использовали следующие основные понятия:

Цикл заражения – период, в течение которого вновь «зараженная» колония большой песчанки приобретает способность «заражать» соседние норы.

Вероятность успеха передачи – вероятность успеха однократной попытки передачи чумного микроба с «зараженной» колонии на «незараженную».

Коэффициент заражения колоний – количество попыток заражения соседних колоний одной «заражающей» колонией за один цикл заражения. Термин аппроксимирует коэффициент заражения и коэффициент передачи в понимании авторов публикаций [5, 7].

Уровень (величина) эпизоотического контакта – величина вероятности успеха передачи и коэффициента заражения, при которых происходит передача возбудителя от колонии к колонии. В понятиях трансмиссивной теории этот показатель наиболее близок к предложенному А.А.Кузнецовым (1997 г.).

Материалом для работы послужили данные о параметрах чумного эпизоотического процесса, отобранные при анализе литературы, результаты экспериментов на модели и полевые наблюдения, в том числе собственные. Такие параметры, как распределение и плотность колоний большой песчанки, рассчитаны на примере ключевого участка, расположенного в Прибалхашском очаге чумы. Фотография участка сделана со спутника QuickBird с разрешением 0,6 м на 1 пиксель. Непосредственно на местности учет обитаемости и плотности колоний большой песчанки велся с применением маршрутно-колониального и площадочного методов. Учтено более 600 колоний.

Для моделирования использовался снимок участка поселения 2×2 км. Плотность обитаемых колоний большой песчанки на моделируемом участке колеблется около 2,0 на 1 га, количество колоний – 550. Площадь эпизоотического пятна рассчитывалась по крайним положениям «зараженных» колоний.

Неслучайность событий оценивали по теореме Байеса [6]. Неслучайность результатов эксперимента составила 0,999 при уровне надежности 0,001. Вероятность успеха передачи увеличивали от 0,1 до 1,0 с шагом 0,05. Одновременно коэффициент заражения последовательно уменьшали, начиная со значения «10» с шагом равным единице. Показатели интенсивности эпизоотического процесса при наименьшем значении коэффициента заражения при каждом шаге вероятности успеха передачи фиксировали в таблице. Для пространственного анализа использовались инструменты ГИС ArcView 9.2. Общее количество расчетов превысило 2000.

Показателем интенсивности эпизоотического процесса считался процент «зараженных» колоний после условного модельного года. Расчеты вероятностей проводили по формуле распределения Пуассона [8].

Результаты проведенных экспериментов показали, что минимальные показатели эпизоотического процесса достигнуты при вероятности успеха передачи равном 0,35 и коэффициенте заражения равном двум. Это и есть минимальный уровень эпизоотического контакта для моделируемого участка. Минимальный процент «зараженных» колоний, при котором эпизоотический процесс успешно развивается – 3,27, т.е. 18 одновременно «зараженных» колоний на исследуемом участке. Минимальная вероятность успеха передачи, при которой гарантированно развивается эпизоотический процесс, равна 0,2, при коэффициенте заражения равном пяти. Коэффициент заражения играет важную роль: чем он меньше, тем

более высокая вероятность успеха передачи требуется для развития эпизоотического процесса. Фактически два этих показателя находятся в обратной связи. Непрерывная трансмиссия чумного микроба осуществляется при минимальном значении коэффициента заражения (равном единице) только при высокой (> 0,7) величине вероятности успеха передачи.

Минимальные значения вероятности успеха передачи и коэффициента заражения, полученные в экспериментах, оказались неожиданно низкими. В понятиях трансмиссивного механизма передачи чумного микроба в модели получается, что для устойчивого развития эпизоотического процесса достаточно, чтобы в течение десяти дней большая песчанка с «зараженной» колонии дважды забегала на соседние «незараженные» колонии и каждый раз переносила некоторое количество блох, инфицированных чумным микробом. При этом в соседней колонии хотя бы у одной большой песчанки может развиваться бактериемия с вероятностью 0,35 и с последующим заражением некоторого количества блох. Расчетные данные весьма близки к цифрам, полученным опытным путем ранее [9]. Отметим, однако, что механизм эпизоотического процесса в нашей модели весьма упрощен, в него не вошла множественность путей передачи чумного микроба. Поэтому вероятно, что в природе эпизоотический процесс может протекать с еще более низкими показателями эпизоотического контакта.

Имея модельные данные об интенсивности и экстенсивности эпизоотического процесса, получаем возможность рассчитать вероятность обнаружения эпизоотии чумы при минимальном эпизоотическом контакте. Как показали эксперименты, интенсивность и экстенсивность эпизоотического процесса весьма вариабельны при одном и том же уровне вероятности успеха передачи и коэффициента заражения. Это в значительной мере связано с распределением колоний в пространстве. В таблице представлены результаты двух из 121 успешных опытов с минимальной и максимальной величиной эпизоотического пятна, полученных при неизменных параметрах модели.

Вероятность совпадения участка обследования с участком эпизоотии рассчитана при условии, что эпизоотическое пятно одно на сектор. Понятно, что при реальном обследовании гарантированно обнаружить эпизоотию с моделируемыми параметрами довольно сложно, так как даже при работе на эпизоотологических стационарах количество проб в секторе не достигало сотни.

Также необходимо иметь в виду, что в ряде случаев обнаружение эпизоотии с якобы низкими

Расчет вероятности обнаружения моделированной эпизоотии при минимальном уровне эпизоотического контакта

№ теста	Площадь эпизоотического пятна, га	Вероятность обнаружения эпизоотии при стандартном обследовании (1 проба на сектор, 10 колоний в пробе)	Количество проб, необходимых для совпадения хотя бы одной с эпизоотическим пятном с вероятностью 0,99/0,95	Количество колоний, которые должны быть исследованы в пробе, для обнаружения хотя бы одной инфицированной с вероятностью 0,99/0,95
1	43	0,0042	1072/697	11/7
2	167	0,0164	276/180	12/8

показателями зараженности грызунов может быть обусловлено тем, что проба только частично совпала с эпизоотическим пятном. Например, в опыте № 2 (таблица) реальная зараженность колоний составляет 45%. Допустим, было обследовано 10 колоний, и чумной микроб был обнаружен только в одной из них. Следовательно, зараженность будет считаться равной 10%. Исходя из полученной информации, мы будем считать, что зарегистрировали эпизоотию с вероятностью выявления 0,0047, т.е. близкой к минимально возможной, рассчитанной на модели. На самом деле при истинной 10% зараженности колоний эпизоотия вряд ли была бы выявлена вообще.

Таким образом, чумной эпизоотический процесс при заданной плотности обитаемых колоний может развиваться при весьма низком уровне эпизоотического контакта. Достаточно, чтобы контакт между колониями осуществлялся хотя бы два раза в декаду, с вероятностью успешной передачи чумного микроба 0,35.

Для передачи чумного микроба между колониями, видимо, более важна частота контактов, чем вероятность успешной передачи чумного микроба во время каждого из этих контактов.

Моделирование развития чумного эпизоотического процесса позволяет оценить разрешающую способность реального обследования очаговой территории. Стандартное эпизоотологическое обследование имеет недостаточную интенсивность и экстенсивность, чтобы выявлять эпизоотии, текущие при низких показателях эпизоотического контакта. Следовательно, отрицательный результат обследования может быть обусловлен не только действительным отсутствием на обследуемой территории эпизоотий чумы, но и низкой интенсивностью эпизоотического процесса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурделов Л.А. Источники, причины и последствия кризиса в эпизоотологии чумы. Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане. 2001; 3:20–5.
2. Грабовский В.И. Клеточные автоматы как простые модели сложных систем. Усп. совр. биологии. 1995; 115(4):412–8.

3. Дубянский В.М., Абдулина В.З., Классовский Н.Л., Айкимбаев А.М., Поле С.Б., Темиралиева Г.А. и др. Опыт создания электронной базы эпизоотологических данных на основе первичной документации эпидотрядов. Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане. 2001; 3:299–301.

4. Дубянский В.М., Бурделов Л.А. Компьютерная модель чумного эпизоотического процесса в поселениях большой песчанки *Rhombomys opimus*: описание и проверка адекватности. Зоол. журн. 2010; 89(1):79–87.

5. Литвин В.Ю., Карулин Б.Е., Водоморин Н.А., Охотский Ю.В. Радиоизотопное моделирование эпизоотийных ситуаций и стохастическая модель эпизоотии туляремии в омете. В кн.: Фауна и экология грызунов. М.: Изд. МГУ; 1980. Т. 14. С. 63–84.

6. Райфа Г. Анализ решений. М.: Наука; 1977. 407 с.

7. Солдаткин И.С., Родниковский В.Б., Руденчик Ю.В. Опыт статистического моделирования эпизоотического процесса при чуме. Зоол. журн. 1973; 52(5):751–6.

8. Солдаткин И.С. О некоторых приемах расчета вероятности обнаружения эпизоотий чумы при эпизоотологическом обследовании. Пробл. особо опасных инф. 1970; 1(11):3–5.

9. Солдаткин И.С., Руденчик Ю.В. Некоторые вопросы эпизоотии чумы как формы существования саморегулирующейся системы «грызун – блоха – возбудитель». В кн.: Фауна и экология грызунов. М.: Изд. МГУ; 1971. Т. 10. С. 5–29.

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

1. Burdelov L.A. [Sources, reasons and aftermaths of crisis in plague epizootiology]. Karantin. Zoonoz. Inf. Kazakhstan. 2001; 3:20–5.
2. Grabovskii V.I. [Cellular automates as simple models of complex systems]. Usp. Sovrem. Biol. 1995; 115(4):412–8.
3. Dubyanskiy V.M., Abdulina V.Z., Klassovskii N.P., Aikimbaev A.M., Pole S.B., Temiraliyeva G.A. et al. [Experience of electronic data base formation on the basis of primary documentation of epidemiologic teams]. Karantin. Zoonoz. Inf. Kazakhstan. 2001; 3:299–301.
4. Dubyanskiy V.M., Burdelov L.A. [Computer model of plague epizootic process in great gerbils (*Rhombomys opimus*) settlements: description and adequacy testing]. Zool. Zh. 2010; 89(1):79–87.
5. Litvin V.Yu., Karulin B.E., Vodomorin N.A., Okhotskii Yu.V. [Radioisotope modeling of epizootic situations and stochastic model of tularemia epizooty in stack]. In: [Fauna and Ecology of Rodents]. M.: Izd. MGU; 1980. N 14. P. 63–87.
6. Raifa G. [Analysis of Solutions]. M.: Nauka; 1977. 407 p.
7. Soldatkin I.S., Rodnikovskii V.B., Rudenchnik Yu.V. [Experience of statistic modeling of plague epizootic process]. Zool. Zh. 1973; 52(5):751–6.
8. Soldatkin I.S. [About some techniques of calculation of probability of plague epizooties detection during epizootiologic examination]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 1970; 1(11):3–5.
9. Soldatkin I.S., Rudenchnik Yu.V. [Some questions of plague enzooty as a form of existence of autoregulating system "rodent – flea – agent"]. In: [Fauna and Ecology of Rodents]. M.: Izd. MGU; 1971. N 10. P. 5–29.

Authors:

Dubyanskiy V.M. Stavropol Research Anti-Plague Institute. Sovetskaya St., 13–15, Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Об авторах:

Дубянский В.М. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: dvm-plague@rambler.ru

Поступила 08.12.10.

М.В.Пчелинцева, М.Н.Ляпин, И.Н.Ежов, А.В.Топорков

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОЛОГИИ ОЦЕНКИ РИСКА ДЛЯ ОБОСНОВАНИЯ КОМПЛЕКСА МЕР ПО ОБЕСПЕЧЕНИЮ БИОБЕЗОПАСНОГО ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МОБИЛЬНЫХ ЛАБОРАТОРИЙ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКИХ БРИГАД

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

Для обоснования мер по обеспечению биобезопасного функционирования мобильных лабораторий (МЛ) специализированных противочумных бригад (СПЭБ) применен набор рискологических методик, заимствованных из других отраслей и рекомендуемых для оценки биологической опасности и риска при работе с патогенными биологическими агентами. Полученные данные представляют основу для управления биориском при функционировании МЛ СПЭБ.

Ключевые слова: анализ риска, биобезопасность, мобильные лаборатории, СПЭБ.

M.V.Pchelintseva, M.N.Lyapin, I.N.Ezhov, A.V.Toporkov

Application of Risk Assessment Methodology for Substantiation of Measures Complex on Provision of Safe Functioning of Mobile Laboratories of Specialized Anti-Epidemic Teams

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

A set of risk assessment methods was used for substantiation of safe functioning of mobile laboratories (ML) of specialized anti-epidemic teams (SAET). The utilized methods were borrowed from diverse spheres of activity and recommended for evaluation of biological hazard and risk associated with work with pathogenic biological agents. The obtained data represent the basis for biorisk management in SAET` ML functioning.

Key words: risk analysis, biosafety, mobile laboratories, SAET.

Одним из направлений деятельности, определенной Регламентом функционирования модернизированных СПЭБ (Утв. приказом Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 22.11.2007 г. № 330), является проведение исследований материала, содержащего патогенные биологические агенты (ПБА) I–IV групп. Очевидно, что данный вид деятельности предусматривает наличие системы обеспечения биологической безопасности при выполнении диагностических работ в мобильных лабораториях. Создание рациональной и адекватной системы безопасности, как и ее нормативно-методическое обеспечение, должны базироваться на научной основе, в которой главенствующее значение придается объективной оценке опасности с использованием рискологической методологии, что закреплено «Основами государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2010 г. и дальнейшую перспективу» (утв. Президентом РФ 04.12.2003 г. Пр-2194), приказом Руководителя Роспотребнадзора «О реализации решения коллегии Роспотребнадзора от 5 февраля 2010 г. «О внедрении методологии по оценке риска»» (№ 57 от 18.02.2010 г.), концепцией федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 гг.)» (утв. распоряжением Правительства Российской Федерации от 28.01.2008 г. № 74-р) и международными рекоменда-

циями в области биобезопасности [4, 7].

Целью исследования является обоснование комплекса мер по обеспечению биобезопасного функционирования МЛ СПЭБ на основе использования методологии оценки и анализа риска.

Материалы и методы

Информационным обеспечением исследований стали материалы специализированной базы данных «Биологическая безопасность» РосНИПЧИ «Микроб» (Свидетельство об официальной регистрации базы данных № 20004620130. Зарегистрировано в Реестре баз данных 21 мая 2004 г.), содержащие профильные законодательные и нормативно-методические документы Российской Федерации, Всемирной организации здравоохранения, других неправительственных организаций и зарубежных стран, а также научные публикации.

Проанализирована техническая документация мобильной лаборатории эпидразведки и индикации на базе а/м Газель и МЛ СПЭБ на базе автошасси и пневмокарасов.

Использованы материалы Паспорта безопасности опасного объекта ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (утв. директором РосНИПЧИ «Микроб» 29 ноября 2006 г.), актов расследования аварийных ситуаций, отчетов комиссии по контролю соблюдения требований биобезопасности, журналов учета аварий и происшествий за 10 лет.

Для исследования использовался универсальный алгоритм управления риском с применением набора рискологических методик, предложенных в методических указаниях по проведению анализа риска опасных производственных объектов (РД 03-418-01. Утв. Постановлением Госгортехнадзора России от 10.07.01 № 30, введены в действие с 01.09.01 г.) и методических рекомендациях «Критерии и методы оценки биологической опасности при работе с патогенными биологическими агентами» (утв. директором ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» 22.12.2006 г.).

Методы эпидемиологической логики [5] применялись при формировании выводов о причинно-следственной связи событий.

Элементы системного подхода использовались для анализа систем.

Результаты и обсуждение

Легитимность деятельности МЛ СПЭБ подтверждена наличием санитарно-эпидемиологических заключений о возможности проведения работ с ПБА. Вместе с тем необходимость максимальной адаптации к современным международным и национальным требованиям обеспечения безопасности требует оценки устройства, оборудования и функционирования МЛ СПЭБ с позиций опасности и риска.

Методы оценки риска применимы к любому объекту, так как основаны на системном анализе.

В соответствии с методологией системного анализа, выявление потенциальных опасностей проводилось в рамках анализа системы «биобезопасность – биобезопасность», что согласуется с существующим в рискологии представлением о том, что оценка и анализ риска проводятся в соответствии с его структурными характеристиками: опасность, подверженность, уязвимость [6].

Опасность определяется наличием патогенного для человека биоагента – биобезопасность. Биобезопасности подвержен персонал МЛ, что является главной составляющей профессионального риска. Специфика биобезопасности обуславливает эпидемиологический риск вследствие возможности попадания возбудителей инфекционных болезней в окружающую среду – среду обитания человека, что требует оценки риска для персонала и для населения. Воздействие ПБА на персонал происходит постоянно при проведении манипуляций в «заразной» зоне. Наибольший риск представляют аварии при выполнении микробиологических работ в лаборатории. Основным возможным неблагоприятным последствием аварийной ситуации является риск летального исхода для персонала и населения. По данному критерию оцениваются все основные виды рисков, необходимость расчета которых закреплена в действующих нормативах.

На реализацию риска влияют как факторы, характеризующие биобезопасность, так и биобезопасность. При описании биориска функционирования МЛ СПЭБ по характеристике уязвимости опреде-

ляли факторы, при воздействии которых появляется возможность того, что система обеспечения биологической безопасности (СОББ) может не выполнить свое назначение.

Основное требование к оценке и результатам анализа риска связано с необходимостью предоставления объективной информации об авариях, их последствиях и размере ущерба. Наиболее объективной является количественная оценка. Однако модернизация СПЭБ в рамках реализации инновационного проекта проведена недавно. Соответственно собственная статистика нежелательных событий при работе отсутствует, что накладывает ограничения на определение количественных показателей биориска функционирования МЛ СПЭБ.

При анализе результатов оценки риска проводится сравнение с некой величиной, которая в рискологической терминологии обозначается как реперный показатель. Обычно в этом качестве фигурирует величина приемлемого (допустимого) риска, т.е. показатель максимального значения риска, приемлемого обществом и нормативно закрепленного. Для объектов, осуществляющих деятельность с использованием ПБА, в настоящее время нормативно установленных критериев приемлемого риска нет. В качестве реперных выбраны показатели летальных исходов для персонала и населения, определенные при паспортизации потенциально биологически опасного стационарного объекта РосНИПЧИ «Микроб». Выбор обусловлен тем, что для института данные значения соответствуют зоне контролируемого риска, являющегося пограничным показателем приемлемости.

Действующие национальные нормативные документы не содержат методик оценки биориска. Поэтому в данном исследовании использован набор применяемых в практике различных отраслей безопасности рискологических методик, выбранных из перечня нормативно-закрепленных методов анализа риска, а также из числа рекомендуемых для оценки биологической опасности и риска при работе с ПБА.

Отсутствие количественной информации предопределило приоритетный выбор качественных методов проведения оценки и анализа риска с применением упрощенных количественных методик.

Методы проверочного листа, анализа опасности и работоспособности основаны на изучении соответствия объекта действующим требованиям безопасности. Нормативные документы и международные рекомендации по обеспечению ББ содержат требования к безопасности в зависимости от опасности ПБА и проводимых с ним процедур. Поэтому на начальном этапе исследования определили степень опасности работ с ПБА, что явилось элементом качественного описания биориска функционирования МЛ СПЭБ по характеристике опасности.

Степень потенциальной опасности устанавливали по методическим рекомендациям «Критерии и методы оценки биологической опасности при работе с патогенными биологическими агентами», учиты-

вающим общепринятые факторы риска работ с ПБА, систематизированные в виде групп взаимодополняющих критериев: качество ПБА, количество ПБА, вид микробиологических процедур, позволяющих получить качественную формализованную оценку степени опасности работ и определить необходимый уровень обеспечения ББ.

Качество ПБА. Опасность (группа патогенности) биоагента (фактор риска в группе критериев «Качество ПБА») является определяющим фактором при оценке степени потенциальной опасности работ. Степень опасности работ определяли с позиций как максимальной, так и наиболее вероятной угрозы. Подобный подход оправдан методологически, а также тем, что МЛ предназначены для выполнения спектра задач, при которых персонал может столкнуться с ПБА различной опасности.

Оценка потенциальной опасности с позиций максимальной угрозы рассматривает все сценарии, реализация которых может приводить к максимальному значению показателей опасности. При этом выявляются наихудшие сценарии развития аварии и возможные последствия реализации таких сценариев, что позволяет определить максимальные потребности в проведении работ по предупреждению и ликвидации аварии и ее последствий. К недостаткам данного подхода следует отнести то, что метод не позволяет провести исследование полного множества возможных сценариев, и, следовательно, оценки потребностей в создании безопасных условий будут априори завышены. По выявленной в рамках рискологии закономерности максимальная угроза (реализация которой влечет максимальный ущерб) реализуется с минимальной частотой, а в большинстве случаев можно выделить наиболее вероятную угрозу [6].

Анализ задач СПЭБ, определенных регламентом, показал, что наибольшая угроза при работе МЛ возможна в случае расследования вспышки инфекционной болезни, вызванной микроорганизмами I группы патогенности, особенно вирусной природы, или в случае появления инфекционных болезней неясной этиологии, а также вновь возникающих или возвращающихся инфекций, либо являющихся последствием биотерракта, вызванных возбудителями, опасность которых точно неизвестна, и не исключено, что изменена в сторону повышения.

В то же время опыт использования СПЭБ показал, что наиболее частыми были выезды в очаги холеры, возбудитель которой относится к II группе патогенности. Также СПЭБ неоднократно использовалась в зоне ЧС, обусловленных стихийными бедствиями, военными конфликтами [3]. Наиболее вероятными эпидемиологическими осложнениями в местах временного размещения эвакуированного из зоны ЧС населения являются острые кишечные инфекции бактериальной и вирусной природы, острые респираторные инфекции, возбудители которых не относятся к I–II группам патогенности. Кроме того, при таких ЧС возникает необходимость санитарно-

гигиенических, токсикологических исследований воды и продуктов питания, т.е. основной объем работ МЛ СПЭБ будет осуществляться с материалом, содержащим ПБА III–IV группы. Следовательно, с позиций наиболее вероятной угрозы фактор риска не будет иметь максимального значения по критерию «качество ПБА».

Факторы риска, связанные с количеством ПБА и опасностью, возникающей при проведении манипуляций, определены исходя из анализа технологии работ, выполняемых в МЛ СПЭБ.

Количество ПБА. В МЛ осуществляется диагностическая работа, поэтому большие объемы ПБА (более 500 мл) не используются. Наибольшую опасность представляет осуществление деятельности с материалом, характеризующимся высокой концентрацией ПБА, которая возможна при бактериологическом исследовании в процессе выделения чистой культуры.

Вид микробиологических процедур. Наиболее опасным является выполнение в МЛ манипуляций, связанных с высоким риском образования аэрозоля – измельчение, центрифугирование, заражение биопробных животных.

Применение данного подхода позволило определить степень опасности, возникающей при проведении работ с ПБА в зоне дислокации СПЭБ в целом, а также отдельных структурно-функциональных элементов зоны строгого противоэпидемического режима, функциональных зон конкретного модуля, рабочих мест.

Применением метода определения степени потенциальной опасности работ установлен необходимый уровень обеспечения ББ, отвечающий набору требований, отклонения от которых могут привести к увеличению уязвимости системы обеспечения биобезопасности. Выявление отклонений осуществляли на основе метода проверочного листа. Непосредственно влияние отклонений на СОББ определяли методом анализа опасности и работоспособности. Последний позволяет получить путем прогнозирования возможные отклонения рассматриваемой системы, что представляет дополнительную информацию по идентификации опасности.

Метод проверочного листа. Результатом применения метода является ответ о полном/неполном соответствии объекта требованиям безопасности и перечень выявленных отклонений. Для целей настоящего исследования рассмотрены соответствия СОББ МЛ требованиям национальных санитарных правил [1, 2] и международным рекомендациям ВОЗ [4] по обеспечению ББ для стационарных лабораторий.

Результаты проведенного исследования показали, что комплекс инженерно-технических средств, используемый в индикационной лаборатории (ИЛ) и лаборатории особо опасных инфекций (ЛООИ) на базе автошасси максимально приближен к уровню, отвечающему требованиям международной классификации BSL-3; бактериологической (БЛ) и

санитарно-гигиенической (СГЛ) лабораторий на базе автошасси – BSL-2. Наличие боксов биологической безопасности II Б класса в БЛ и СГЛ позволяет проводить манипуляции с микроорганизмами, требующими условий BSL-3.

Инженерно-технический комплекс автоклавной на базе автошасси по таким характеристикам, как герметичность помещения; наличие системы вытяжной вентиляции, оснащенной фильтрами тонкой очистки на выходе; использование помещения для обработки стеклянной посуды в качестве тамбура, отвечает требованиям, предъявляемым к условиям BSL-3.

Таким образом, проведенный анализ показал, что в условиях наиболее вероятной угрозы, созданный инженерно-технический комплекс на базе автошасси обеспечивает безопасное функционирование МЛ СПЭБ. Условия МЛ на базе ПК в основном соответствуют требованиям, предъявляемым к BSL-2.

Формально-логический метод выявил отклонения от требований к установленным уровням биобезопасности для МЛ на базе автошасси, которые возникают при реализации максимальной угрозы, а для МЛ на базе ПК – как при максимальной, так и при наиболее вероятной угрозе. С позиций стоящих перед СПЭБ задач, в условиях, не исключающих реализацию максимальной угрозы, предпочтительным является использование МЛ на базе автошасси.

Исследование дополнено *методом анализа опасности и работоспособности*. Его применение объясняется тем, что кроме моделирования возможных отклонений системы биобезопасности (что актуально для анализа функционирования инновационного проекта), метод позволяет выявить причины отклонений и определить возможные результаты их воздействия на безопасное функционирование мобильной лаборатории.

Так, например, причиной отклонения можно считать использование СПЭБ в неполном составе. Рассматривая МК СПЭБ как единую систему, обеспечивающую биобезопасное функционирование, в случае принятия решения об использовании отдельных модулей, необходимо учитывать возникающие при этом отклонения и предусматривать дополнительные мероприятия и средства для создания СОББ адекватной потенциальной опасности, обусловленной выполнением поставленной задачи в конкретных условиях.

Другим примером причины отклонения может явиться отсутствие соответствующей подготовки персонала. МЛ являются новыми условиями для проведения работ с ПБА, оснащены современным диагностическим и защитным оборудованием, которое изготовлено по специальному проекту. Отсутствие навыков работы в новых условиях, на новом оборудовании может повысить возможность аварии при работе с ПБА и ее последствий.

Как причину отклонений следует рассматривать и вероятность реализации других видов опасности, потенциальных для зоны ЧС (химической, радиаци-

онной, пожарной и др.).

Применение вышеуказанных методов позволило сделать вывод о наличии факторов уязвимости, влияющих на обеспечение ББ при функционировании МЛ: возможность контакта персонала с ПБА различной степени опасности, в том числе максимальной; особенности дизайна и оснащения МЛ; особенности подготовки персонала; учет выбора и взаимодополняемости (комплектности) модулей; наличие других видов опасностей, сопряженных с биологической.

Таким образом, использование метода *определения степени опасности проведения работ с ПБА* позволило получить качественную оценку биориска по характеристике опасности, а использование методов *проверочного листа, анализа опасности и работоспособности* – качественную оценку биориска по характеристике уязвимости состояния СОББ.

Однако применение данных методов невозможно для анализа комбинаций событий, приводящих к неблагоприятным последствиям аварии и получения объективной количественной оценки риска. Для выявления причинно-следственных связей между этими событиями используют логико-графические методы анализа «деревьев отказов и событий».

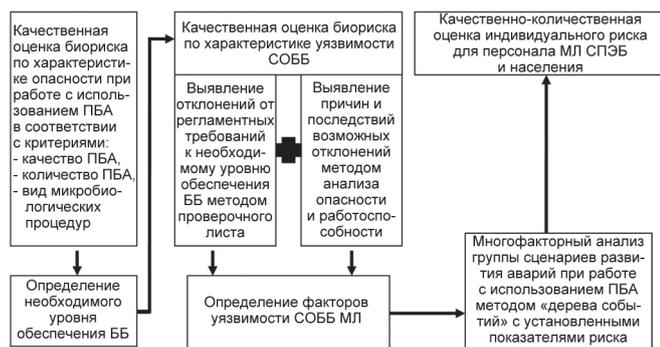
Для анализа методом «*дерева событий*» рассмотрены сценарии последствий различных аварий при работе с ПБА и вероятностные оценки, декларированные в паспорте безопасности опасного объекта ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб», что позволило провести качественно-количественную оценку риска летального исхода для персонала МЛ СПЭБ и населения.

При соблюдении основных принципов обеспечения ББ, даже при наличии факторов уязвимости, индивидуальный риск для персонала соответствует уровню контролируемого риска.

Наличие факторов уязвимости при несоблюдении основных принципов обеспечения ББ обуславливает превышение показателя индивидуального риска для персонала МЛ относительно реперного.

При оценке биориска функционирования МЛ СПЭБ как превышающего показатель, принятый в качестве реперного, следует осуществить воздействие на риск организационными мерами, направленными на его снижение, с учетом возможностей и необходимости использования оборудования и СИЗ, предназначенных для лабораторий более высокого уровня защиты, что должно быть предусмотрено действующими инструктивно-методическими документами (инструкции, стандартные операционные процедуры). При отсутствии возможности усиления обеспечения ББ воздействием является отказ от риска.

В случае оценки риска для персонала МЛ как приемлемого, разработка специальных мероприятий по его снижению не требуется. Для сохранения биориска функционирования МЛ СПЭБ на допустимом уровне необходимо выполнение текущих инженерно-технических, медико-биологических и организационных мероприятий в соответствии с требованиями основных действующих нормативов



Технология использования рискологических подходов (методов) для оценки опасности и анализа риска при проведении работ с ПБА в МЛ СПЭБ

по обеспечению ББ.

Обеспечение биобезопасности на уровне приемлемого риска для персонала направлено на уменьшение риска для населения, т.к. снижает возможность эпидемического распространения, потенциально возникающего при заболевании сотрудника лаборатории, вызванном возбудителем инфекции с которым проводилась работа, либо при аварийных ситуациях, связанных с выходом ПБА во внешнюю среду.

Современное инженерно-техническое оснащение СПЭБ, используемое оборудование, наличие систем вентиляции с фильтрами тонкой очистки в МЛ на базе автошасси, а также контролируемая дезинфекционная обработка твердых и жидких отходов снижают вероятность выхода ПБА во внешнюю среду, что соответственно уменьшает индивидуальный риск летального исхода для населения (потенциальный территориальный риск).

В результате проведенных исследований выбрана и обоснована совокупность используемых методов, которую следует рассматривать как разработку технологии оценки опасности и риска проведения работ с ПБА при функционировании МЛ СПЭБ (рисунок).

Таким образом, проведенное исследование продемонстрировало возможность использования рискологических методов для оценки потенциальной биологической опасности МЛ СПЭБ. В условиях отсутствия статистических данных и регламентированных способов оценки биологической опасности при работе СПЭБ, путем заимствования из других областей знаний и отраслей деятельности выбраны и адаптированы, с учетом специфики опасности, ме-

тоды, характеризующиеся получением преимущественно качественных показателей. Дополнительное привлечение внешней количественной информации позволило провести более объективную качественно-количественную оценку биориска для персонала и населения. Получаемые с помощью разработанной технологии данные представляют основу для принятия решений по управлению биориском.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). Санитарно-эпидемиологические правила. СП 1.3.1285-03. Бюл. норм. и метод. док. Госсанэпиднадзора. 2003; 3(13):61–144.
2. Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322-08. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2009. 75 с.
3. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Топорков А.В., Куличенко А.Н., Топорков В.П. Специализированные противоэпидемические бригады (СПЭБ): опыт работы и тактика применения в современных условиях. Probl. osobo opasnykh inf. 2008; 4(98):5–14.
4. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях. 3-е изд. Женева: ВОЗ; 2004. 190 с.
5. Черкасский Б.Л. Риск в эпидемиологии. М.: Практическая медицина; 2007. 480 с.
6. Чернова Г.В., Кудрявцев А.А. Управление рисками. М.: ТК Велби; 2003. 160 с.
7. Laboratory biorisk management standard CWA 15793:2008 (E). [cited 10 Nov 2010]. Available from: ftp://ftp.cenorm.be/PUBLIC/CWAs/workshop31/CWA15793.pdf.

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

1. [Sanitary and Epidemiological Regulations “Safety of Work with the Microorganisms of I–II Pathogenicity (Hazard) Groups”: SR 1.3.1285-03]. Bul. Norm. Method. Dok. Gossanepidnadzor. 2003; 3(13): 61–144.
2. [Sanitary and Epidemiological Regulations “Safety of Work with the Microorganisms of III–IV Pathogenicity (Hazard) Groups and Parasitic Diseases Agents”: SR 1.3.2322-08]. Bul. Norm. Method. Dok. Gossanepidnadzor. 2009; 4(38): 13–66.
3. Onischenko G.G., Toporkov A.V., Toporkov V.P., Koulichenko A.N., Kutuyev V.V. [Specialized anti-epidemic teams (SAET): the experience of work and tactics of their employment in modern conditions]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2008; 4(98): 5–14.
4. [Practical Guide on Biological Safety in Laboratory Conditions]. 3-rd Ed. Geneva:WHO; 2004. 190 p.
5. Cherkasskii B.L. [Risk in Epidemiology]. M.: Prakticheskaya Meditsina; 2007. 480 p.
6. Chernova G.V., Kudriavtsev A.A. [Risk Management]. M.: TK Velbi; 2003. 160 p.

Authors:

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

Об авторах:

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

Поступила 16.02.11.

Г.Г.Смирнов, Н.П.Медведев, А.В.Сенькин

АВТОМАТИЗИРОВАННАЯ СТЕНДОВАЯ УСТАНОВКА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ФИЛЬТРОВ ТОНКОЙ ОЧИСТКИ ВОЗДУХА*ФГУ «48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации»*

Высокая защитная эффективность фильтров (фильтр-элемент тонкой очистки, ФЭТО), используемых в системах вентиляции микробиологических лабораторий, является важным элементом обеспечения биологической безопасности. Перед их использованием предусмотрена проверка на стендовых установках. Существующие модели этих установок позволяют проверить за рабочий день не более 8 фильтров, требуют значительных физических усилий. Предлагаемая автоматизированная установка позволяет проверить до 33 фильтр-элементов за рабочую смену, значительно снижая физические нагрузки работающего персонала.

Ключевые слова: фильтр, фильтр-элемент тонкой очистки, стендовая установка, микробиологическая лаборатория.

G.G.Smirnov, N.P.Medvedev, A.V.Sen`kin

Automated Bench-Top Device for Evaluation of Air Fine Purification Filters Efficiency*Russian Federation Ministry of Defense 48 Central Research Institute*

High protective efficiency of filters (fine purification filter-element) used in microbiological laboratories ventilation systems contributes essentially to biological safety provision. Filters are to be tested at bench-top devices prior to application. The existing models of these devices allow to test no more than 8 filters per working day, and require considerable physical efforts. The proposed automated device allows to test 33 filters per working day and decreases considerably workload of the personnel.

Key words: filter, fine purification filter-element, bench-top device, microbiological laboratory.

В настоящее время как у нас в стране, так и за рубежом, значительно повысились требования к санитарной и технологической чистоте воздуха, что явилось результатом разработки обновленных стандартов и других документов [4]. Введены новые стандарты оценки качества воздушных фильтров в Европе EN 779-93 и EN 1822-98, а в России впервые принят и введен Госстандартом РФ в действие ГОСТ Р 51251-99 «Фильтры очистки воздуха», который является стандартом для фильтров очистки воздуха, устанавливаемых в системах вентиляции, кондиционирования, воздушного отопления зданий и сооружений, а также в других системах и устройствах подготовки воздуха.

Защита работающего персонала научно-исследовательских организаций при работе с возбудителями опасных и особо опасных инфекционных заболеваний является весьма актуальной проблемой. Она требует постоянного совершенствования существующих, а также разработки новых средств и методов обеспечения биологической безопасности (ББ). Первостепенное значение при этом уделяется одной из основных инженерных систем обеспечения ББ – вентиляции. Продолжаются изыскательские работы по созданию новых эффективных фильтрующих материалов с целью изготовления на их основе новых высокоэффективных фильтров тонкой очистки воздуха (ФТО). Наибольшее применение для высокоэффективной очистки воздуха находят фильтры на основе тонковолокнистых материалов из ультратон-

ких стеклянных и синтетических волокон, металло-керамики, а также базальтового супертонкого (0,1–0,4 мкм) волокна [3].

Основным методом изучения свойств фильтрующих материалов является экспериментальная оценка их защитной эффективности с помощью физико-химических и биологических индикаторов. К наиболее распространенным из них относятся кварцевые, атмосферные и синтетические пыли, аэрозоли масляного тумана, красителя метиленового синего, фуксина, флюоресцирующих веществ, йодида калия, диоктилфталата, хлорида натрия, радиоактивных веществ с размером частиц 0,05–0,8 мкм, а также аэрозоли различных тест-микроорганизмов [3, 5].

Санитарными правилами [1, 2] определено, что перед запуском в эксплуатацию фильтр должен быть проверен на проскок с использованием биологического аэрозоля (*S. marcescens*, или *E. coli*) или другим способом. В нашей организации эффективность фильтр-элементов тонкой очистки воздуха (ФЭТО) оценивают с использованием *S. marcescens* и уранина.

В микробиологической практике используют фильтры, изготовленные на основе волокнистых фильтрующих материалов, имеющие значительную поверхность фильтрации. Отечественной промышленностью серийно выпускаются высокоэффективные фильтры производительностью 1000 м³·ч⁻¹, 500 м³·ч⁻¹, 60 м³·ч⁻¹ (ФТО-1000, ФТО-500, ФТО-60) на основе фильтрующего материала ФПАН из полиакрилонитрилового волокна для очистки технологиче-

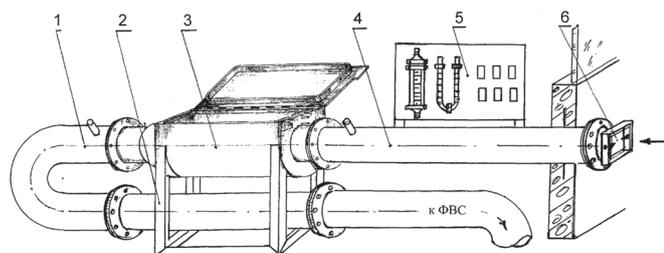


Рис. 1. Автоматизированная стендовая установка СС-1:

1 – колено; 2 – станина; 3 – корпус; 4 – воздуховоды; 5 – щит КИПиА; 6 – распылитель

ского воздуха, а также фильтр-элементы ФЭТО-750 на основе ткани Петрянова ФПП-15-9,0 из перхлорвинилового волокна для очистки вентиляционного воздуха.

Проверку эффективности ФЭТО этих типов в нашей организации осуществляют на стендовой установке СУ, разработанной С.Г.Дроздовым и соавт. [3].

Существенным недостатком данной модели является то, что сравнительно большая часть очищаемого воздуха проходит через боковую поверхность фильтрующего элемента. Автоматика отсутствует, все операции по проверке ФЭТО осуществляются вручную. Много времени тратится на крепление конуса, оценку прилегания ФЭТО к фланцу, герметичности прилегания конуса, т.е. неэффективно используется рабочее время. За рабочую смену на этой установке можно проверить не более 8 ФЭТО.

Автоматизированная стендовая установка Г.Г.Смирнова СС-1 предназначена для оценки эффективности ФЭТО, представленная на рис. 1, 2, лишена указанных выше недостатков. Она автоматизирована и позволяет осуществлять фильтрацию воздушного потока равномерно по всей поверхности ФЭТО. Установка состоит из воздуховодов 1, 4, корпуса с крышкой 3, системы автоматики 5 и узла распыла 6. Корпус стенда (рис. 2) представляет собой часть расширенного воздуховода с фланцами и крышкой. Внутри корпуса смонтированы герметизирующее уплотняющее устройство и прижимное устройство, предназначенное для прижатия ФЭТО к фланцу. Герметичность прилегания ФЭТО к фланцу определяется следующим образом: ФЭТО помещается внутрь корпуса на подставку вплотную к фланцу. Прижимным устройством ФЭТО плотно прижимается к фланцу с резиновой прокладкой. Во фланце и резиновой прокладке имеется сквозное отверстие, к которому приварен патрубок, соединенный с U-образным манометром. На манометр подается давление сжатого воздуха равное 10 кПа (1000 мм вод. столба) и через 1 мин определяется падение давления. Если падение давления воздуха в манометре составляет менее 60 Па (6 мм вод. столба), то считается, что прилегание ФЭТО к фланцу герметичное. На корпусе имеются штуцера: для подачи сжатого воздуха в уплотняющее устройство, для проверки герметичности прилегания ФЭТО к фланцу и для из-

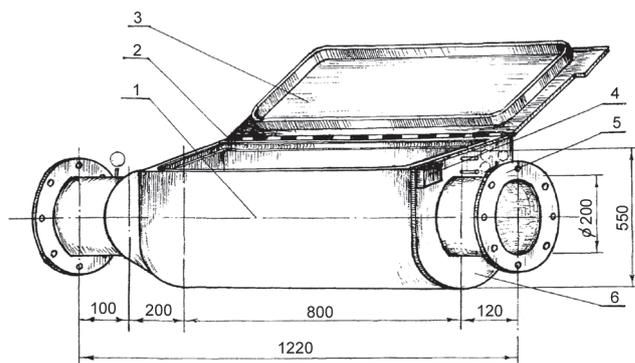


Рис. 2. Автоматизированная стендовая установка СС-1:

1 – корпус; 2 – уплотняющее устройство; 3 – крышка; 4 – концевое реле; 5 – фланцы; 6 – передняя стенка

мерения сопротивления ФЭТО. На установке СС-1 возможно проведение оценки эффективности ФЭТО-750, ФЭТО-500 и ФЭТО-1000

Проведено по 5 сравнительных испытаний по оценке эффективности фильтр-элементов на СУ и автоматизированной установке СС-1 при использовании в качестве тест-культуры *S. marcescens*, с последующей оценкой производительности этих установок за рабочую смену (6 ч). Результаты испытаний представлены в таблице.

Из анализа таблицы следует, что производительность автоматизированной стендовой установки СС-1 составляет не менее 33 ФЭТО за рабочую смену, т.е. производительность установки СС-1 по сравнению с установкой СУ увеличивается в 4 раза, с сохранением воспроизводимости по показателю коэффициента проницаемости. Автоматизированная установка рекомендована для внедрения в практику работ микробиологических лабораторий.

Результаты испытаний ФЭТО-750 на стендах СУ и СС-1 (n=10)

Алгоритм проверки ФЭТО на стенде	Время, необходимое для выполнения операции на	
	СУ	СС-1
Монтаж ФЭТО в стенд (с) не более	10	10
Установка и крепление конуса (мин) не более	10	-
Установка контрольных приборов на стенд (с) не более	20	20
Проверка герметичности соединения конуса и корпуса стенда, герметичности прилегания ФЭТО к фланцу и сопротивления ФЭТО (мин) не более	10	Прямо-показывающие приборы
Отбор проб аэрозоля, мин	10	10
Снятие контрольных приборов (с) не более	20	20
Отсоединение конуса (мин) не более	10	-
Демонтаж ФЭТО (с) не более	10	10
Итого времени на проверку 1 ФЭТО (мин) не более	41	11
Производительность стенда за 6 ч работы, шт.	8	33
Коэффициент проницаемости Кпр. (X±I ₉₅):10 ⁻⁶ %	2,6±0,3	2,5±0,2

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). СП 1.3.1285-03. Бюл. норм. метод. док. 2003; 3(13):61–144.
2. Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. СП 1.3.2322-08. Бюл. норм. метод. док. 2008; 4(38):13–66.
3. Дроздов С.Г., Гарин Н.С., Джиндоян Л.С. и др. Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях. М.: Медицина; 1987. 265 с.
4. Чупалов В.С. Воздушные фильтры. СПб.: СПГУ; 2005. 167 с.
5. Чупалов В.С. Основы оценки эффективности воздушных фильтров. В кн.: Инженерные системы. СПб.: Ассоциация «АВОК Северо-Запад»; 2008. С.14–22.

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

1. Sanitary and Epidemiological Regulations "Safety of Work with the Microorganisms of I–II Pathogenicity (Hazard) Groups" SR 1.3.1285-03].

Bul. Norm. Method. Dok. Gossanepidnadzor. 2003; 3(13):61–144.

2. [Sanitary and Epidemiological Regulations "Safety of Work with the Microorganisms of III–IV Pathogenicity (Hazard) Groups and Parasitic Diseases Agents" SR 1.3.2322-08]. Bul. Norm. Method. Dok. Gossanepidnadzor. 2009; 4(38):13–66.

3. Dроздов С.Г., Гарин Н.С., Джиндоян Л.С. et al. [Fundamentals of Safety Practice in Microbiological and Virological Laboratories]. M.: Meditsina; 1987. 265 p.

4. Чупалов В.С. [Air Filters]. SPb.: SPGU; 2005. 167 p.

5. Чупалов В.С. [Fundamentals of Air Filters Efficiency In: Engineering Systems]. SPb.: Assotsyatsiya "AVOK Severo-Zapad"; 2008. P. 14–22.

Authors:

Smirnov G.G., Medvedev N.P., Sen'kin A.V. Russian Federation Ministry of Defense 48 Central Research Institute. Kirov.

Об авторах:

Смирнов Г.Г., Медведев Н.П., Сенькин А.В. 48 ЦНИИ Минобороны России. Киров.

Поступила 13.05.10.

Е.Г.Булгакова, Я.М.Краснов, А.В.Гаева, И.Ю.Сухонос, Л.В.Анисимова, Н.П.Гусева,
Л.А.Новичкова, В.В.Кутырев

**ОСОБЕННОСТИ ПРОЯВЛЕНИЯ ПРИЗНАКА ПИГМЕНТАЦИИ И СТРУКТУРНЫЕ РАЗЛИЧИЯ
ГЕНОВ *HMS*-ОПЕРОНА У ШТАММОВ *Y. PESTIS* И *Y. PSEUDOTUBERCULOSIS*
РАЗНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

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

Проведено исследование признака пигментации у 214 штаммов чумного микроба и 68 псевдотуберкулезного микроба. Выявлено, что штаммы чумного микроба разных подвигов и псевдотуберкулезного микроба проявляют разную способность к сорбции гемина и кислых красителей. Проведен ПЦР-анализ и определение нуклеотидной последовательности генов *hms*-оперона у типовых штаммов пяти подвигов и таласской группы штаммов чумного микроба и штамма O1 серотипа псевдотуберкулезного микроба. Выявлены единичные нуклеотидные замены во всех генах оперона штаммов чумного микроба по сравнению с опероном штаммов псевдотуберкулезного микроба. Определены единичные нуклеотидные замены, перспективные для внутривидовой дифференциации штаммов чумного микроба.

Ключевые слова: чумной микроб, псевдотуберкулезный микроб, межвидовые и внутривидовые различия, *Hms*-признак, *hms*-оперон.

E.G.Boolgakova, Ya.M.Krasnov, A.V.Gaeva, I.Yu.Sukhonosov, L.V.Anisimova, N.P.Guseva, L.A.Novichkova,
V.V.Kutyrev

**Peculiarities of Pigmentation Expression and Structural Differences of *hms* Operon Genes
in *Y. pestis* and *Y. pseudotuberculosis* Strains of Diverse Origin**

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Pigmentation was examined in 214 plague microbe strains and 68 pseudotuberculosis agent strains. Plague microbe strains of different subspecies and pseudotuberculosis microbe strains demonstrated different ability of hemin and acidic dyes sorption. Genes of *hms* operon in typical *Y. pestis* strains of five subspecies and in *talassica* group strains, as well as in *Y. pseudotuberculosis* O1 serotype strains, were sequenced and analyzed using PCR. Single nucleotide substitutions were detected in all genes of the operon in plague microbe strains as compared with the operon of pseudotuberculosis agent strains. Determined were single nucleotide substitutions promising for intraspecific differentiation of plague microbe strains.

Key words: plague microbe, pseudotuberculosis microbe, interspecific and intraspecific differences, *Hms*-phenotype, *hms*-operon.

Свойство патогенных иерсиний сорбировать кислые красители и гемин (*Hms*-признак) является маркером одного из основных факторов вирулентности – хромосомной области пигментации. Этот признак кодируется генами *hms*-оперона (гены *hms* H, F, R, S) и регулируется двумя генами, расположенными на значительном расстоянии от оперона – *hms* P и *hms* T [3, 13, 14]. Наличие функционально активных *hms* генов необходимо для проявления способности образовывать биопленку и блок в преджелудке блохи [12], что обеспечивает эффективность трансмиссивного пути передачи чумного микроба. Признак пигментации и *hms* гены есть и у псевдотуберкулезного микроба, но этот микроорганизм не способен образовывать блок в преджелудке блохи [9]. На территории России, стран СНГ и Монголии в природных очагах выделяют штаммы, различающиеся по вирулентности для лабораторных животных и имеющие разную эпидемическую значимость.

По классификации, принятой в России (1985 г.), штаммы, циркулирующие в горных регионах, отно-

сят к неосновным подвидам (*hissarica*, *altaica*, *caucasica*, *ulegeica*), а штаммы из равнинных и предгорных очагов относят к основному подвиду *Y. pestis pestis* [1]. Кроме перечисленных подвигов чумного микроба, существует еще одна группа штаммов – *talassica* из Таласского высокогорного очага. Эти штаммы не представлены в классификационной схеме, но по ряду признаков их можно отнести к неосновным подвидам. Проявление признака пигментации, частота его утраты и реверсии различаются у штаммов чумного микроба разного происхождения и штаммов псевдотуберкулезного микроба. Однако причины различий не выяснены до сих пор.

Целью нашей работы было сравнение проявления признака пигментации и структурной организации *hms*-оперона у штаммов чумного микроба разного происхождения и псевдотуберкулезного микроба.

Материалы и методы

В работе были использованы 214 штаммов *Y. pes-*

tis основного, гиссарского, алтайского, кавказского, улэгейского подвидов и таласской группы из разных природных очагов стран СНГ и 68 штаммов *Y. pseudotuberculosis*. Штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий, где они хранились в лиофильно высушенном состоянии.

Культуры чумного и псевдотуберкулезного микробов выращивали в бульоне LB и на 1,5 % LB-агаре (LB-бульон, дополненный 1,5 г/л агара Difco Laboratories). При хранении культур в лабораторных условиях использовали 0,4 % LB-агар.

Наличие признака пигментации у штаммов чумного микроба определяли на разработанной нами цветной дифференциально-диагностической полусинтетической среде HmsD – hemin-storage phenotype differentiation – (0,75 % Casamino acids vitamin free (Difco Laboratories), 0,15 % сульфита натрия, 1,35 % агара (Difco Laboratories), 1 мкг бромида тиамин, 3 мг Конго красного, pH 7,2). Для изучения признака пигментации псевдотуберкулезного микроба, кроме известных сред, использовали модификацию среды HmsD (HmsD^{pstbc} – 0,35 % Casamino acids vitamin free (Difco Laboratories), 0,075 % сульфита натрия, 1,35 % агара (Difco Laboratories), 1 мкг бромида тиамин, 3 мг Конго красного, pH 7,2).

Препараты тотальной ДНК получали прогреванием бактериальной взвеси (концентрация – 10^7 – 10^8 м.к./мл) при 100 °С в дистиллированной воде в течение 30 мин с последующим центрифугированием в течение 10 мин при 12 тыс. об/мин. Реакционная смесь (25 мкл) имела состав: 10 ммоль Tris-HCl (pH 8,0); 2,5 ммоль MgCl₂, по 0,2 ммоль каждого из нуклеотидов дАТФ, дСТР, дГТР, дТТР; по 0,6 мМ каждого праймера; 5 ед. Таq ДНК-полимеразы (НИИ Генетика) и 10 мкл ДНК испытуемого штамма.

Аmplification фрагментов генов в ПЦР проводили на программируемом термостате «Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Москва) по следующей программе: 94 °С 1 мин; (94 °С – 30 с, 62–63 °С – 30 с, 72 °С – 40 с) × 25 циклов; 72 °С – 10 мин. В качестве ДНК матрицы использовали препараты ДНК штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*. Синтез олигонуклеотидных праймеров осуществляли в НПФ «Литех» (Россия) на автоматическом синтезаторе ДНК «АСМ-102U». При выборе праймеров руководствовались правилами, описанными T.Lowe *et al.* [15] и компьютерной программой «Primer Express».

Продукты амплификации анализировали в 0,9 % агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромида этидия. Электрофорез проводили в буфере ТБЕ (0,089 М трис, 0,089 моль боратная кислота, 0,002 моль ЭДТА) при силе тока 90 мА в течение 90 мин. Для документирования результатов ПЦР использовали систему гель-документации Gel Doc™EQ (BIORAD, США) с применением программы Quantity One v 4.5.1 (BIORAD, США).

В качестве маркеров молекулярных масс использовали ДНК фага λ, обработанную эндонуклеазами рестрикции *AvaII*, *EcoRI*+*HindIII*.

Автоматическое секвенирование проводили по методу F.Sanger, S.Nicklen, A.R.Coulson. Определение нуклеотидной последовательности ПЦР-образцов проводили на генетическом анализаторе модели «CEQ 8000» (Beckman Coulter, USA). В работе использовали необходимый набор реагентов и расходных материалов согласно руководству к прибору, методикам подготовки проб и постановки ПЦР с «DTCS Quick Start Kit». Для проведения секвенирования и обработки полученных результатов использовалось программное обеспечение «CEQ 8000 Series Genetic Analysis System Software v. 9/0», «MEGA 4.0».

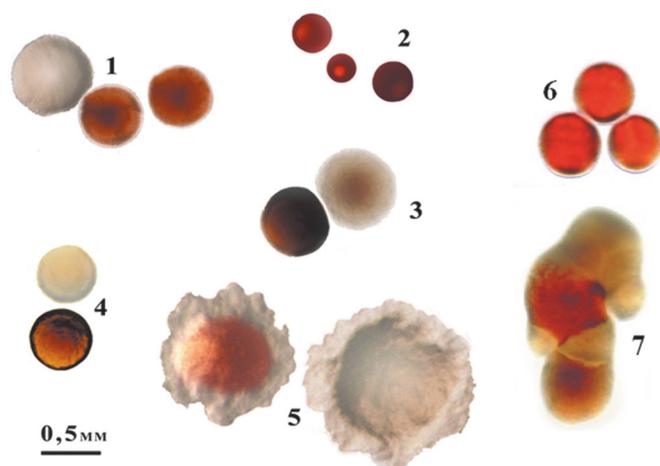
Результаты и обсуждение

Изучение признака пигментации штаммов чумного и псевдотуберкулезного микробов разного происхождения

На среде HmsD штаммы пяти подвидов и таласской группы формируют колонии, различающиеся по морфологии и интенсивности окраски. Наиболее плотные, с ровным краем и ярко окрашенные колонии образуются у штаммов кавказского подвида. Более рыхлые и розовые колонии характерны для штаммов алтайского, улэгейского, гиссарского подвидов и таласской группы. Штаммы основного подвида образуют зернистые колонии, более интенсивно окрашенные, чем колонии штаммов предыдущей группы, с волнистым бесцветным краем.

Оптимальная дифференциация пигментированных и непигментированных, а также смешанных колоний всех изученных штаммов *Y. pseudotuberculosis* наблюдается на среде HmsD^{pstbc} при температуре 15 °С. Гладкие пигментированные колонии штаммов псевдотуберкулезного микроба менее интенсивно окрашены, чем колонии штаммов чумного микроба. Среди выросших колоний преобладают колонии смешанного типа, имеющие как пигментированные, так и непигментированные сегменты (рис. 1).

Проверка признака пигментсорбции у штаммов, полученных из ГКПБ института «Микроб», показала, что 34 из 168 штаммов (≈ 20 %) основного подвида утратили способность к образованию пигментированных колоний. Самая высокая стабильность сохранения Hms признака характерна для штаммов основного подвида, выделенных в Таукумском пустынном (99 % Hms⁺ клонов у 2 штаммов; 1965–1966 гг. – годы выделения штаммов), Центрально-Кавказском высокогорном (6 штаммов – 60–90 % Hms⁺ клонов; 1998 г.), Терско-Сунженском низкогорном (5 штаммов – 60–96 % Hms⁺ клонов; 1970 г.), Кобыстанском равнинно-предгорном (6 штаммов – 98–99 % Hms⁺ клонов; 1953 г.), Мильско-Карабахском равнинно-предгорном (1 штамм – 98 % Hms⁺ клонов; 1967 г.), Джейранчельском равнинно-предгорном (2 штамма – 65–98 % Hms⁺ клонов; 1966–1967 гг.), Приараксинском низкогорном (4 штамма – 50–96 %; 1968 г.), Тувинском горном (50–90 % Hms⁺ клонов у 4 штаммов; 1971–1989 гг.). В ряде природных очагов



Дифференциация клеток чумного и псевдотуберкулезного микробов разных подвидов на среде HmsD:

- 1 – алтайский и улэгейский подвиды, 2 – кавказский подвид,
3 – таласская группа штаммов, 4 – гисарский подвид,
5 – основной подвид, 6 – *Y. pseudotuberculosis* 338Д (O1 серотип),
7 – *Y. pseudotuberculosis* A17 (O1 серотип)

(Прикаспийский Северо-Западный степной; Волго-Уральский песчаный; Зауральский, Забайкальский степные; Сарыджазский и Верхненарынский высокогорные; Устюртский, Муонкумский, Копетдагский, Приаральско-Каракумский, Каракумский пустынные; Прикаспийский и Волго-Уральский песчаные) встречались штаммы как полностью утратившие признак Hms, так и образующие разные процентные соотношения Hms⁺ и Hms⁻ клонов. Самая низкая стабильность Hms-признака наблюдалась у штаммов из Дагестанского равнинно-предгорного в 1999 г. (0 % Hms⁺ клонов у 3 штаммов), Копетдагского пустынного в 1966–1968 гг. (3 штамма – 0 % Hms⁺ клонов; 1 штамм – 20 % Hms⁺ клонов), Волго-Уральского песчаного в 1912–2001 гг. (9 штаммов – 0 % Hms⁺ клонов; 8 штаммов – 10–40 % Hms⁺ клонов), Зауральского степного в 1989 г. (3 штамма – 0 % Hms⁺ клонов, 1 штамм – 1 % Hms⁺ клонов, 1 штамм – 70 % Hms⁺ клонов). Можно было предположить, что стабильность сохранения признака пигментации связана только с длительностью хранения штаммов. Однако как для стабильно сохраняющих Hms-признак, так и для штаммов с высокой частотой его утраты, были выявлены одинаковые сроки выделения штаммов. При исследовании штаммов из Волго-Уральского природного очага среди штаммов, выделенных в 1912–1926 гг., не обнаружено ни одного пигментированного клона. В то же время штаммы, выделенные в 1928–2001 гг., при высеве образовывали только от 10 до 40 % Hms⁺ клонов. Причем повторный рассев Hms⁺ клонов приводил к появлению не более 40 % Hms⁺ клонов. Возможно, существуют неизвестные в настоящее время механизмы, приводящие к повышенной способности штаммов элиминировать эту детерминанту. Для штаммов алтайского, улэгейского, гисарского и кавказского подвидов и таласской группы определено наличие признака пигментсорбции у 100 % клонов.

Штаммы псевдотуберкулезного микроба показали очень низкую стабильность по признаку пигментации. Только 38 % штаммов при высеве из ампул лиофилизированных культур на среду HmsD_{pstbc} образовывали 1–5 % пигментированных колоний. Признак пигментации практически у всех этих штаммов был выражен значительно хуже, чем у штаммов чумного микроба и проявлялся не одновременно с появлением на агаре колоний.

Различия в стабильности сохранения и интенсивности окраски пигментированных клонов у штаммов чумного и псевдотуберкулезного микробов могут быть связаны с разным уровнем продукции протеинов, кодируемых генами *hms*-оперона. Причиной этого могут быть особенности структурной организации этих генов. Поэтому нами были рассчитаны 12 пар праймеров (табл. 1), с помощью которых был проведен ПЦР-анализ штаммов чумного и псевдотуберкулезного микробов.

ПЦР анализ штаммов чумного и псевдотуберкулезного микробов с праймерами на гены hms-оперона

Праймеры были подобраны так, чтобы ампликон, образованный с каждой парой праймеров, перекрывал от 200 до 300 нуклеотидов ампликона, образованного с последующей парой праймеров. Такое перекрывание областей ДНК позволяет уловить возможные протяженные вставки (делеции) и, при необходимости, определить нуклеотидные последовательности выбранных регионов. Размеры ампликонов варьируют от 760 до 900 п.н., что удобно для анализа как методом ПЦР скрининга, так и методом секвенирования.

В ПЦР с ДНК всех штаммов чумного микроба основного подвида, неосновных подвидов, таласской группы и псевдотуберкулезного микроба образовывались ампликоны со всеми парами праймеров. Размер ампликонов для каждой пары праймеров был идентичным у всех исследованных штаммов. Это обстоятельство послужило основанием для поиска структурных особенностей генов *hms*-оперона патогенных иерсиний методом определения нуклеотидных последовательностей.

Определение и сравнение нуклеотидных последовательностей hms-оперонов штаммов Yersinia pestis и Yersinia pseudotuberculosis, выделенных в разных географических регионах

Нуклеотидную последовательность *hms*-оперона (7651 п.н.) определили у штаммов чумного микроба основного подвида – *Y. pestis* 231 (708), *Y. pestis* KM803 (A-1822), кавказского подвида – *Y. pestis* 1146, алтайского подвида – *Y. pestis* KM683 (И-2359), улэгейского подвида – *Y. pestis* И-3069, гисарского подвида – *Y. pestis* A-1249, штамма из Таласского высокогорного очага – *Y. pestis* A-1802 (21/10) и штамма псевдотуберкулезного микроба – *Y. pseudotuberculosis* 338Д O1 серотипа. При сравнении нуклеотидных последовательностей выявлен высокий консерватизм оперона у штаммов пяти подвидов и

Последовательности олигонуклеотидных праймеров на гены региона *hms*-оперона

Пара праймеров, №	Название	Нуклеотидная последовательность (5' – 3')	Размер ампликона, п.н.
1	HMS 1, HMS 2	CGAATAGCGCGTCTGCTTATG, CGCCTTATCCGGCAATGTAG	829
2	HMS 3, HMS 4	GTTGGGATGATGATCGTGTCC, GGTAACCGTGAGGGCAAAGTC	881
3	HMS 5, HMS 6	TCAGCGTATTGTCCAGGCAA, CTTGGCGTATCGTGGTAATCG	793
4	HMS 7, HMS 8	TGGTATGGCAATGGCTTCAC, GCACAGGGCGGACATCTTT	833
5	HMS 9, HMS 10	GAAAGCGAAGCATGGTTTGC, CAGATATCACTGCGGGCG	846
6	HMS 11, HMS 12	TTCTGGCTACGCCGAGAGA, AATGCCCAAGTGATCGACAAC	847
7	HMS 13, HMS 14	GCGAGTCTACGCCAAGTGTT, CGTCGTCAAACCGCTGAGA	854
8	HMS 15, HMS 16	TTTCATCGTGTGCTCTGTCA, ACTTCTTGATCGCGCCCTG	868
9	HMS 17, HMS 18	TTACAACACTACTGCGCCCG, CAGCCTGTGCCTCTGGATCT	854
10	HMS 19, HMS 20	GAGTTAGCCGAGCGTGATCC, AGCGTTTGGCCTTCAATCC	781
11	HMS 21, HMS 22	CGTTATTGGTCCGTCATC, ATCTTTATTGCCGCTCAC	761
12	HMS 23, HMS 24	AGCAAGAATTGAAGGCCGTG, TCTCCAGTACCCTCCACA	896

таласской группы (табл. 2). Структура *hms*-оперона всех штаммов оказалась идентичной за исключением последовательности штамма кавказского подвида. У этого штамма обнаружены две нуклеотидные замены. В промоторной области *hmsH* гена штамма кавказского подвида выявлена единичная нуклеотидная замена –110-й н. А на G. Нуклеотидная замена в гене *hmsF* 779 Т/А уникальна и может служить генетической меткой штаммов *Y. pestis caucasica*. Секвенирование переменных областей этого гена у штаммов кавказского подвида из разных природных очагов (Терско-Сунженского и Приараксинского низкогорных, Ленинанканского, Зангезуро-Карабахского, Присеванского горных, Восточно-Кавказского высокогорного) выявило их идентичность. Нуклеотидная последовательность *hms*-оперона штамма *Y. pseudotuberculosis* 338Д отличалась от таковой у штаммов чумного микроба множеством нуклеотидных замен. При сравнении нуклеотидных последовательностей *hms*-оперона у штаммов чумного микроба всех подвидов, кроме кавказского, выявлено пять замен в гене *hmsH* (две из них – в промоторной области), три – в гене *hmsF*, две – в *hmsR* и одна – в гене *hmsS* по сравнению с нуклеотидной последовательностью штамма *Y. pseudotuberculosis* 338Д. У штамма кавказского подвида в промоторной области –110-й нуклеотид *hmsH* совпадает с нуклеотидом в этой позиции у штамма *Y. pseudotuberculosis* 338Д, а 779 А гена *hmsF* отличается от нуклеотида (Т) в этой позиции, характерного для штаммов остальных подвидов чумного микроба и штамма псевдотуберкулезного микроба.

Для сравнения полученных последовательностей с генетическим банком данных использовали алгоритм Blast (<http://blast.ncbi>). Нуклеотидные последовательности *hms*-оперона (табл. 2) у штаммов чумного микроба всех подвидов, кроме *Y. pestis subsp. caucasica*, идентичны последовательности штамма K1M биовара *medievalis* [6]. Штаммы CO92 биовара *orientalis* и Antiqua биовара *antiqua* [5, 16] отличаются от штамма K1M биовара *medievalis* заменой в гене *hmsR* 149 Т/Г. Штамм 91001 биовара *microtus*

[17] несет нуклеотидную замену в гене *hmsH* 1975 G/А и в гене *hmsR* 523 С/Т. Нуклеотидная последовательность оперона штамма *Pestoides F* идентична последовательности штаммов кавказского подвида [11]. Особенности нуклеотидной последовательности *hms*-оперона штамма *Angola* биовара *antiqua* [8] выявлены в двух генах: в промоторной области гена *hmsH* –131-й нуклеотид А, характерный для остальных штаммов чумного микроба, заменен на нуклеотид Т, –110-й G идентичен нуклеотиду в этой позиции у штамма кавказского подвида; в гене *hmsF* 1077-й G заменен на Т.

Проведенный анализ показывает, что внутривидовые различия *hms*-оперона чумного микроба невелики. При этом нуклеотидная варибельность в гене *hmsS* отсутствует, в гене *hmsR* варибельной оказалась одна нуклеотидная позиция, а в двух других генах варибельны две нуклеотидные позиции. Интересно, что штаммы *Y. pestis*, циркулирующие в природных очагах России и стран СНГ, независимо от подвидовой принадлежности (исключая штаммы кавказского подвида) и штамм биовара *medievalis* имеют одинаковую последовательность *hms*-оперона, у штаммов биоваров *orientalis* и *antiqua* обнаружена лишь единичная нуклеотидная замена. Несколько большая варибельность выявлена у зарубежных штаммов, близких по многим свойствам штаммам неосновных подвидов (91001, *Angola*, *Pestoides F*), и штаммов кавказского подвида.

Нуклеотидные последовательности штаммов *Y. pseudotuberculosis* O1 серотипа 338Д и IP 32953, представленной в GenBank [4], полностью совпали. Нуклеотидная последовательность *hms*-оперона высоковирулентного штамма *Y. pseudotuberculosis* IP 31758 [7] (более дальнего «родственника» *Y. pestis*), вызывающего Дальневосточную скарлатиноподобную лихорадку, отличается от таковой у штаммов 338Д и IP 32953. Причем нуклеотиды в позициях 1511, 1777, 1974 гена *hmsH*; 438, 461 гена *hmsF*; 408, 453, 459 гена *hmsS* отличаются как от аналогичных нуклеотидов в оперонах всех изученных штаммов

Вариабельность генов *hms*-оперона патогенных иерсиний

Штамм	Источник нуклеотидной последовательности	<i>hmsH</i>															<i>hmsF</i>					<i>hmsR</i>				<i>hmsS</i>			
		Область промотора			603 н.	612 н.	636 н.	1511 н.	1774 н.	1975 н.	1977 н.	438 н.	461 н.	498 н.	779 н.	948 н.	1077 н.	1305 н.	91 н.	149 н.	393 н.	486 н.	88 н.	408 н.	453 н.	459 н.			
		-15 н.	-13 н.	-110 н.																									
<i>Y. pestis</i> biovar <i>orientalis</i> CO92	NCBI GenBank	T	A	A	A	A	A	A	C	G	C	T	T	A	T	G	G	A	T	G	C	C	G	T	A	C			
<i>Y. pestis</i> biovar <i>antiqua</i> Antiqua	NCBI GenBank	T	A	A	A	A	A	A	C	G	C	T	T	A	T	G	G	A	T	G	C	C	G	T	A	C			
<i>Y. pestis</i> biovar <i>medievalis</i> KIM	NCBI GenBank	T	A	A	A	A	A	A	C	G	C	T	T	A	T	G	G	A	T	T	C	C	G	T	A	C			
<i>Y. pestis</i> <i>pestis</i> 231, A-1822	Данная работа	T ¹	A	A	A	A	A	A	C	G	C	T	T	A	T	G	G	A	T	T	C	C	G	T	A	C			
<i>Y. pestis</i> <i>hissarica</i> (A-1249), <i>altaica</i> (И-2359), <i>ulegeica</i> (И-3069), <i>talassica</i> (A-1802)	Данная работа	T	A	A	A	A	A	A	C	G	C	T	T	A	T	G	G	A	T	T	C	C	G	T	A	C			
<i>Y. pestis</i> <i>caucasica</i> 1146	Данная работа	T	A	G ²	A	A	A	A	C	G	C	T	T	A	A	G	G	A	T	T	C	C	G	T	A	C			
<i>Y. pestis</i> Pestoides F	NCBI GenBank	T	A	G	A	A	A	A	C	G	C	T	T	A	A	G	G	A	T	T	C	C	G	T	A	C			
<i>Y. pestis</i> biovar <i>microtus</i> str. 91001	NCBI GenBank	T	A	A	A	A	A	A	C	A	C	T	T	A	T	G	G	A	T	T	C	T	G	T	A	C			
<i>Y. pestis</i> biovar <i>antiqua</i> Angola	NCBI GenBank	T	T	G	A	A	A	A	C	G	C	T	T	A	T	G	T	A	T	T	C	C	G	T	A	C			
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 338Д	Данная работа	C ³	A	G	G	C	C	A	C	G	C	T	T	C	T	T	G	G	C	T	T	C	A	T	A	C			
<i>Y. pseudotuberculosis</i> IP 32953	NCBI GenBank	C	A	G	G	C	C	A	C	G	C	T	T	C	T	T	G	G	C	T	T	C	A	T	A	C			
<i>Y. pseudotuberculosis</i> IP 31758	NCBI GenBank	C	A	G	A	A	A	<u>C</u> ⁴	<u>A</u>	G	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>C</u>	C	T	G	G	G	T	T	C	C	G	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>T</u>			

¹Обычным шрифтом обозначены нуклеотиды, характерные для всех штаммов чумного микроба.

²В заштрихованных ячейках обозначены нуклеотиды с внутривидовой вариабельностью у чумного микроба.

³Жирным шрифтом выделены нуклеотиды, характерные для штаммов псевдотуберкулезного микроба O1 серотипа.

⁴Подчеркиванием выделены нуклеотиды, характерные для штамма псевдотуберкулезного микроба IP 31758.

Y. pestis, так и *Y. pseudotuberculosis* (табл. 2). В других позициях проявляется сходство этого штамма либо со штаммами чумного микроба, либо со штаммами псевдотуберкулезного микроба O1 серотипа.

Сравнение нуклеотидных последовательностей *hms*-оперона возбудителей чумы и псевдотуберкулеза O1 серотипа показало, что эволюционный процесс патогенных иерсиний сопровождался единичными нуклеотидными заменами во всех генах оперона у штаммов чумного микроба, но практически все замены образуют кодоны-синонимы. Две замены внутри рамки считывания гена *hmsH* чумного микроба (ACG₆₀₃/ACA₆₀₃ (*Y. pseudotuberculosis*/*Y. pestis*) – Thr; ATC₆₃₆/ATA₆₃₆ – Ile); три – в гене *hmsF* (ACC₄₉₈/ACA₄₉₈ – Thr; GTT₉₄₈/GTG₉₄₈ – Val; TTG₁₃₀₅/TTA₁₃₀₅ – Leu); две – в гене *hmsR* (C₉₁TG/T₉₁TG – Leu; CGT₃₉₃/CGC₃₉₃ – Arg;) привели к образованию кодонов-синонимов. Замена GAC₆₁₂/GAA₆₁₂ в гене *hmsH* выразилась в замене одной отрицательно заряженной аминокислоты на другую Glu/Asp, а замена A₈₈TC/G₈₈TC в гене *hmsS* привела к смене гидрофобных аминокислот (Ile/Val). Таким образом, все эти нуклеотидные замены не должны были влиять на изменение стабильности и выраженности признака пигментации у штаммов чумного микроба по сравнению со штаммами псевдотуберкулезного микроба.

При анализе внутривидовой вариабельности штаммов чумного микроба обращает на себя внимание тот факт, что любая выявленная у определенного таксона(ов) замена отличает его (их) от всех остальных

сравниваемых иерсиний. Только нуклеотид –110-й G в гене *hmsH* сближает штаммы *Y. pestis* кавказского подвида и штамм Angola со штаммами псевдотуберкулезного микроба. В гене *hmsF* штаммов *Y. pestis* кавказского подвида и Pestoides F миссенс мутация CTA/CAA вызвала замену гидрофобной аминокислоты Leu на нейтральную полярную аминокислоту Gln. Подобного типа мутация произошла в гене *hmsH* штамма 91001 биовара *microtus* G₁₉₇₅CG/A₁₉₇₅CG (Ala/Thr); в гене *hmsR* – замена синонимическая ATT₄₈₆/ATC₄₈₆ (Ile). Замена 149-го нуклеотида в гене *hmsR* у штаммов биоваров *orientalis* и *antiqua* (GTC/GGC) привела к замене Val/Gly (обе гидрофобные). Как и в случае межвидовой вариабельности, выявленная внутривидовая вариабельность генов *hms*-оперона не объясняет различий в способности штаммов чумного микроба в разной степени сорбировать кислые красители.

По данным S.Forman *et al.* [10], полученным с помощью направленного мутагенеза, способность сорбировать кислые красители и образовывать биопленку у штаммов чумного микроба утрачивается при изменении в консервативных доменах Hms протеинов аминокислотных остатков на Ala: Asp 114, His 184 в протеине HmsF; Asp 176, Asp 269, Gln 305, Arg 308 в протеине HmsR; Trp 80, Tyr 83 в протеине HmsR. Снижение способности сорбировать кислые красители и образовывать биопленку происходит при замене аминокислотных остатков: Glu 281 в протеине HmsH; Trp 143 в протеине HmsF. Ни одна из

выявленных нами межвидовых или внутривидовых нуклеотидных замен не расположена в пределах кодонов указанных аминокислотных остатков. Это еще один аргумент в пользу того, что выявленные нами нуклеотидные замены не являются критическими для проявления способности патогенными иерсиниями сорбировать кислые красители и образовывать биопленку. Поэтому остается не выясненным вопрос о том, почему пигментсорбирующая способность у штаммов чумного микроба разных подвидов проявляется не в одинаковой степени и что является причиной слабой пигментсорбции у штаммов псевдотуберкулезного микроба и высокой частоты мутаций, приводящих к утрате Hms фенотипа и отсутствию способности блокировать преджелудок блох. Возможно, изучение структурной организации *hmsP* и *hmsT* поможет прояснить этот вопрос.

Обращает на себя внимание тот факт, что нуклеотидные последовательности двух штаммов O1 серотипа псевдотуберкулезного микроба имеют идентичные нуклеотидные последовательности *hms*-оперона; последовательности *hms*-оперона штаммов чумного микроба биовара *medievalis*, основного подвида, неосновных подвидов: алтайского, гиссарского, улэгейского и таласской группы штаммов полностью совпадают и отличаются от первых в основном синонимическими заменами. По-видимому, несмотря на то, что замены, выявленные у всех штаммов чумного микроба, привели к образованию кодонов-синонимов, они оказались необходимыми для освоения новых экологических ниш. В то же время, единичные нуклеотидные различия на подвиговом уровне с заменой аминокислот одного класса не оказались критическими для чумного микроба. Интересным оказался тот факт, что в промоторной области гена *hmsH* наиболее древних по происхождению штаммов *Y. pestis* кавказского подвида [2] и штамма Angola-110-й нуклеотид, в отличие от штаммов более молодых таксонов, совпадает с аналогичным нуклеотидом штаммов *Y. pseudotuberculosis*. В то же время нуклеотидная замена 149-го нуклеотида в гене *hmsR* характерна одновременно для штаммов самой молодой группы – биовара *orientalis* и древней группы – биовара *antiqua*. Однако она отсутствует у штаммов основного подвида и биовара *medievalis*, которые, по времени возникновения, находятся между первыми двумя группами, а также у всех неосновных подвидов, считающихся промежуточной формой чумного микроба. Вероятно, внутривидовые мутации определяются комплексом эколого-географических особенностей очагов циркуляции штаммов *Y. pestis*.

Выявленные нуклеотидные замены, различающие штаммы биоваров *orientalis*, *antiqua*, *medievalis*, *microtus* и штаммы кавказского подвида, предполагают возможность использования переменных областей *hms*-оперона для создания системы типирования методом мультилокусного секвенирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Апарин Г.П., Голубинский Е.П. Микробиология чумы. Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та; 1989. 90 с.
2. Бобров А.Г., Филиппов А.А. Распространенность IS285 и IS100 в геномах *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis*. Мол. генет. 1997; 2:36–40.
3. Buchrieser C., Rusniok C., Frangeul L., Couve E., Billault A., Kunst F. et al. The 102-kilobase pgm locus of *Yersinia pestis*: sequence analysis and comparison of selected regions among different *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains. Infect. Immun. 1999; 67(9):4851–61.
4. Chain P.S., Carniel E., Larimer F.W., Lamerdin J., Stoutland P.O., Regala W.M. et al. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004; 101:13826–31.
5. Chain P.S.G., Hu P., Malfatti S.A., Radnedge J., Larimer F.W., Vergez L.M. et al. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strains Antiqua and Nepal 516: Evidence of gene reduction in an emerging pathogen. J. Bacteriol. 2006; 188:4453–63.
6. Deng W., Burland V., Plunkett G., Boutin A., Mayhew G.F., Liss P. et al. Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. J. Bacteriol. 2002; 184:4601–11.
7. Eppinger M., Rosovitz M.J., Fricke W.F., Rasko D.A., Kokorina G., Fayolle C. et al. The complete genome sequence of *Yersinia pseudotuberculosis* IP31758, the causative agent of Far East scarlet-like fever. PLoS Genet. 2007; 3:1508–23.
8. Eppinger M., Worsham P.L., Nikolich M.P., Riley D.R., Sebastian Y., Mou S. et al. Genome sequence of the deep-rooted *Yersinia pestis* strain Angola reveals new insights into the evolution and pangenome of the plague bacterium. J. Bacteriol. 2010; 192(6):1685–99.
9. Erikson D.L., Jarrett C.O., Wren B.W., Hinnebusch B.L. Serotype differences and lack of biofilm formation characterize *Yersinia pseudotuberculosis* infection of the *Xenopsylla cheopis* flea vector of *Yersinia pestis*. J. Bacteriol. 2006; 188(3):1113–9.
10. Forman S., Bobrov A.G., Kirillina O., Craig S.K., Abney J., Fetherston J.D. et al. Identification of critical amino acid residues in the plague biofilm Hms proteins. Microbiology. 2006; 152:3399–410.
11. Garcia E., Worsham P., Bearder S., Malfatti S., Lang D., Larimer F. et al. Pestoides F, an atypical *Yersinia pestis* strain from the former Soviet Union. Adv. Exp. Med. Biol. 2007; 603:17–22.
12. Hinnebusch B.J., Perry R.D., Schwan T.G. Role of *Yersinia pestis* gemin storage (*hms*) locus in transmission of plague by fleas. Science. 1996; 273(5273):367–70.
13. Jones H.A., Lillard J.W., Perry R.D. HmsT, a protein essential for expression of the haemin storage (Hms+) phenotype of *Yersinia pestis*. Microbiol. 1999; 145:2117–28.
14. Kirillina O., Fetherston J., Bobrov A., Abney J., Perry R.D. 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.
15. Lowe T., Sharefkin J., Yang Sh., Dieffenbach C.W. A computer program for selection of oligonucleotide primers for polymerase chain reaction. Nucleic Acids Res. 1990; 18(7):1157–61.
16. Parkhill J., Wren B.W., Titball R.W., Holden M.T., Prentice M.B., Sebaihia M. et al. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. Nature. 2001; 413(6855):523–7.
17. Song Y., Tong Z., Wang J., Wang L., Guo Z., Han Y. et al. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001 an isolate avirulent of humans. DNA Res. 2003; 11:179–97.

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

1. Апарин Г.П., Голубинский Е.П. [Microbiology of Plague]. Irkutsk: Izdanef' stvo Irkutskogo Universiteta; 1989. 90 p.
2. Bobrov A.G., Filippov A.A. [Distribution of IS285 and IS100 in the Genomes of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*]. 1997; 2:36–40.

Authors:

Boolgakova E.G., Krasnov Ya.M., Gaeva A.V., Sukhonosov I.Yu., Anisimova L.V., Guseva N.P., Novichkova L.A., Kuttyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

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

Поступила 15.04.11.

А.В.Гаева, Е.Г.Булгакова, И.Ю.Сухонос, Л.В.Анисимова, Л.А.Новичкова, В.В.Кутырев

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ВНУТРИВИДОВОЕ ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ ЧУМНОГО МИКРОБА С ОПРЕДЕЛЕНИЕМ ИХ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ВИРУЛЕНТНОСТИ МЕТОДОМ ПЦР

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

Разработан способ идентификации и внутривидового типирования штаммов чумного микроба с определением их потенциальной вирулентности. Показана возможность внутривидовой дифференциации и определения очаговой принадлежности изученных штаммов чумного микроба в монолокусной VNTR-ПЦР и выявления основных детерминант вирулентности (области пигментации хромосомы и гены плазмиды кальцийзависимости) в мультиплексной ПЦР.

Ключевые слова: возбудитель чумы, генетическое типирование, VNTR-анализ, внутривидовые различия, детерминанты вирулентности.

A.V.Gaeva, E.G.Boolgakova, I.Yu.Sukhonosov, L.V.Anisimova, L.A.Novichkova, V.V.Kutyrev

Identification and Intraspecific Typing of Plague Microbe Strains with Their Potential Virulence Determination Using PCR

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Developed is the method of identification and intraspecific typing of plague microbe strains along with their potential virulence determination. Intraspecific differentiation and focal attribution of the examined plague microbe strains can be determined by monolocus VNTR-PCR, and main virulence determinants (chromosomal pigmentation region and calcium-dependence plasmid genes) – by multiplex PCR.

Key words: plague agent, genetic typing, VNTR-analysis, intraspecific differences, virulence determinants.

Дифференциация двух близкородственных и высокогомологических видов рода иерсиний – чумного и псевдотуберкулезного микробов важна при мониторинге природных очагов чумы. На территории стран Содружества Независимых Государств действуют 42 природных очага чумы [1]. Штаммы псевдотуберкулезного микроба имеют широкое географическое распространение, патогенны для большого круга теплокровных животных и часто выделяются от грызунов, обитающих на территориях природных очагов чумы. Несмотря на то, что эти микроорганизмы вызывают значительно различающиеся по тяжести заболевания, многие фенотипические свойства у них близки, что затрудняет их дифференциацию. В то же время и среди штаммов чумного микроба наблюдается неравнозначность по вирулентности и эпидемической значимости. Универсальной вирулентностью и большой эпидемической значимостью обладают штаммы основного подвида. Для штаммов неосновных подвигов (алтайский, гиссарский, кавказский, улэгейский) и группы таласских штаммов характерна избирательная вирулентность и низкая эпидемическая значимость. В отдельных природных очагах наблюдается совместная циркуляция штаммов основного и неосновных подвигов (Герско-Сунженский низкогорный, Приараксинский низкогорный). Кроме того, на разных стадиях эпизоотического процесса и в межэпизоотический период выделяют атипичные штаммы, лишённые некоторых детерминант вирулентности [1]. Расширение возможностей коммуникации между странами не исключает вероятность завоза и заноса

чумной инфекции. В связи с этим актуальным становится создание и усовершенствование тест-систем, позволяющих за короткий период времени идентифицировать патоген, определить его географическое происхождение и оценить потенциальную вирулентность штамма. Одним из наиболее простых методов идентификации и типирования микроорганизмов является метод, основанный на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для дифференциации штаммов возбудителя чумы от других патогенных иерсиний в настоящее время предложены варианты ПЦР [2]. Однако данные варианты метода не позволяют определять его подвиговую и очаговую принадлежность, а также его потенциальную вирулентность. До настоящего времени в литературе не встречались сведения о ПЦР-системе, обладающей способностью одновременно дифференцировать штаммы возбудителя чумы и псевдотуберкулезного микроба и проводить внутривидовое типирование штаммов чумного микроба с определением его происхождения и эпидемического потенциала.

Целью работы являлась разработка комплекса ПЦР, обеспечивающего быструю идентификацию штаммов чумного и псевдотуберкулезного микробов с одновременным внутривидовым типированием штаммов чумного микроба и определением их потенциальной вирулентности.

Материалы и методы

В работе использованы 170 штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвигов, изолиро-

ванных из природных очагов России и ближнего зарубежья, 68 штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*. Штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб». Бактерии выращивали в течение 18 ч на агаре LB (рН 7,2) при температуре 28 °С. По стандартному образцу мутности (10 ед., эквивалентному $1,0 \cdot 10^9$ м.к./мл.) готовили взвесь микроорганизмов в дистиллированной воде в концентрации $1,0 \cdot 10^7$ м.к./мл. Подготовку проб и обеззараживание тестируемых штаммов проводили по схеме, описанной в методических указаниях МУ 1.3.2569-09 «Организация работ лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». Пары праймеров рассчитывали с помощью компьютерной программы «Primer Express». Праймеры для проведения монолокусной ПЦР TAN1 (5'-TGGGCTTGAATACGGATGATG-3') – TAN2 (5'-ACAACCATGCTGACGTGGG-3'); праймеры для проведения мультиплексной ПЦР IH1 (5'-TTTACCGCAACAACATCATCC-3') – IH4 (5'-ATGGCCGCAACTATGGTG-3'); lcr6 (5'-TTGACGACAAGCGCCTAGC-3') – lcr7 (5'-CAGCTGGCAA TGGAATCCTT-3'). Реакционная смесь для первого этапа содержала: 1 х ПЦР буфер, $MgCl_2$ – 1,5 ммоль, смесь dNTP – 0,4 ммоль, праймеры TAN1 – 1,2 пмоль, TAN2 – 0,8 пмоль, Taq-полимераза – 2 ед., исследуемая ДНК – 10 мкл, вода деионизированная – до 25 мкл. Режим амплификации для образцов с праймерами TAN1–TAN2: первый цикл 94 °С – 1 мин, далее следуют 35 циклов, состоящих из шагов: при 94 °С – 30 с, 62 °С – 30 с, 72 °С – 40 с. Реакционная смесь для второго этапа исследования в объеме 25 мкл содержала: 1 х ПЦР буфер; $MgCl_2$ – 1,5 ммоль; dNTP mix – 0,4 ммоль; праймер IH1 – 3,52 пмоль; праймер IH4 – 0,645 пмоль; lcr6 – 1,5 пмоль; lcr7 – 0,59 пмоль; Taq DNA полимераза – 2 ед.; исследуемая ДНК – 10 мкл; воды до 25 мкл. Режим амплификации для образцов с праймерами IH1 – IH4 и lcr6 – lcr7: первый цикл 94 °С – 2 мин, далее – 35 циклов, состоящих из шагов: при 94 °С – 1 мин, 62 °С – 1 мин, 72 °С – 4 мин.

На гель наносили 3 мкл реакционной смеси с добавлением буфера для нанесения проб (0,25 % бромфенолового синего, 0,25 % ксилोलцианола, 30 % глицерина). Для разделения продуктов амплификации использовали 3 % агарозный гель. Время проведения электрофореза составляло 5 ч при напряжении 120 V. При проведении мультиплексной ПЦР продукты амплификации анализировали в 1 % агарозном геле. Время проведения электрофореза 60 мин при напряжении 90 V. В качестве маркеров молекулярных размеров фрагментов ДНК использовали ДНК фага λ , обработанного рестриктазой AvaII.

Результаты и обсуждение

Разработка монолокусной VNTR–ПЦР для дифференциации штаммов чумного и псевдотуберку-

лезного микробов и внутривидового типирования штаммов чумного микроба

Одним из перспективных методов молекулярно-типирования является VNTR–анализ, основанный на оценке числа варьируемых тандемных повторов. Ранее была показана высокая дискриминирующая способность данного метода при изучении штаммов чумного микроба из разных природных очагов. Для усиления разрешающей способности метода и повышения достоверности типирования обычно применяют модификации метода с использованием нескольких VNTR локусов (мультилокусный VNTR–анализ, или MLVA) [3, 4, 5, 7].

В результате проведенного BLAST–анализа *hutG*–YPO1950 региона хромосомы чумного микроба выявлена варьируемая область, расположенная в межгенном пространстве *hutG*–YPO1967. Участок *hutG*–YPO1967 находится перед областью пигментации и включает два VNTR локуса: 1 – (ATAGAAAG)_n и 2 – (CAAGTAAT)_n, GenBank, AL590842. При сравнении нуклеотидных последовательностей штаммов чумного микроба известных биоваров и псевдотуберкулезного микроба, депонированных в GenBank, обнаружена варьируемость этих локусов у штаммов, принадлежащих к разным биоварам и выделенных в разных географических регионах. Генетические формулы *hutG*–YPO1967 области штаммов разного происхождения отличаются по количеству повторов и, в ряде случаев, содержат неполные повторы (AAAG): формула штамма CO92 (биовар *orientalis*) VN 1₈2₄; штамма 6/69 (биовар *orientalis*) VN 1₅2₄; штамма KIM (биовар *medievalis*) VN 1₄2₃; штаммов Antiqua и Nepal 516 (биовар *antique*) VN 1₅2₃; штамма 91001 (биовар *microtus*) VN 1_{12+AAAG}; штамма Pestoides F1 VN 1_{12+2(AAAG)2_{14+IS285}}. У штамма псевдотуберкулезного микроба IP32953 первый локус содержит 2 повтора с единичной нуклеотидной заменой в одном из них, второй – уникальную вставку 363 п.н. и 2 повтора. Приведенные результаты выравнивания ДНК штаммов чумного микроба, представленных в GenBank, послужили основанием для исследования распространения аллелей области *hutG*–YPO1967 у штаммов чумного и псевдотуберкулезного микроба, циркулирующих на территории СНГ и Монголии. Нами рассчитана пара праймеров TAN1–TAN2, ограничивающая область между генами *porina* YPO1967 и *hutG* гистидинового оперона, приближенная к VNTR локусам.

При изучении VNTR области *hutG*–YPO1967 170 штаммов чумного микроба обнаружено 20 аллелей. Сравнение размеров фрагментов ДНК, встречающихся у штаммов различного происхождения, показало, что для штаммов каждого подвида и таласской группы характерен свой диапазон размеров (табл. 1). Так, размеры амплифицируемых фрагментов для штаммов основного подвида находятся в диапазоне 348–388 п.н., штаммов алтайского подвида – 396–420 п.н., улэгейского – 340–416 п.н., гиссарского – 448–456 п.н., кавказского – 1799–1831 п.н., таласской

Определение видовой, внутривидовой и очаговой принадлежности штаммов чумного микроба

Вид, подвид	Очаг, место выделения	Размер фрагмента ДНК с праймерами TAN1–TAN2	VN тип
<i>Y. pestis pestis</i>	Равнинно-предгорные очаги Кавказа и Закавказья, пустынные очаги Средней Азии, Прикаспийский, Волго-Уральский песчаный	348 п.н.	VN 1
	Забайкальский степной, Тувинский горный	356 п.н.	VN 2
	Аксайский высокогорный	364 п.н.	VN 3
	Верхненарынский высокогорный	372 п.н.	VN 4
	Сарыджазский высокогорный	380 п.н.	VN 5
	Сарыджазский высокогорный	388 п.н.	VN 6
<i>Y. pestis altaica</i>	Алтайский горный (Кош-Агачский район)	396 п.н.	VN 9
	Алтайский горный (Уландрик)	420 п.н.	VN 10
	Монголия, аймак Убурхангай	400 п.н.	VN 11
<i>Y. pestis ulegeica</i>	Монголия, аймак Убурхангай	416 п.н.	VN 12
	Монголия, Южно-Гобийский аймак	340 п.н.	VN 7
	Монголия, Баян-Улэгейский аймак	348 п.н.	VN 8
<i>Y. pestis</i>	Таласский высокогорный	444 п.н.	VN 13
<i>Y. pestis hissarica</i>	Гиссарский высокогорный	448 п.н.	VN 15
		456 п.н.	VN 14
<i>Y. pestis caucasica</i>	Восточно-Кавказский высокогорный	392 п.н.	VN 16
	Ленинканский горный, Терско-Сунженский низкогорный	1799 п.н.	VN 17
	Присеванский горный	1807 п.н.	VN 18
	Зангезуро-Карабахский горный	1819 п.н.	VN 19
	Приараксинский низкогорный	1831 п.н.	VN 20
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	Алматы	692 п.н.	–
	Франция	711 п.н.	–

группы – 444 п.н. Для 68 штаммов псевдотуберкулезного микроба характерны фрагменты ДНК в диапазоне 692–711 п.н. Первые шесть аллелей (348, 356, 364, 372, 380 и 388 п.н.) встречаются только у штаммов основного подвида. Самым распространенным оказался аллель размером 348 п.н. Он характерен для штаммов из равнинных очагов сусликового типа, расположенных в регионах Северного Прикаспия, Закавказья и высокогорных очагов на Центральном Кавказе, прикаспийских и закавказских очагов песчаночного типа, а также среднеазиатских пустынных очагов. Аллель 356 п.н. встречается только у штаммов из природных очагов сусликового типа Западной Сибири, а аллели 364, 372, 380, 388 п.н. у штаммов Тувинского горного и высокогорных очагов: Сарыджазского, Аксайского, Алайского.

Наибольшей вариабельностью и в то же время четкой очаговой приуроченностью отличаются аллели штаммов неосновных подвигов. На территории Алтайского горного очага циркулируют, по крайней мере, две группы штаммов: с фрагментами ДНК размером 396 (Кош-Агачский район) и 420 п.н. (урочище Уландрик). Продукты амплификации размером 400 п.н. обнаружены у штаммов алтайского подвида из Монголии (аймак Убурхангай). Три варианта аллелей выявлено и у изученных штаммов улэгейского подвида, каждый из которых характерен для определенного аймака (в Южно-Гобийском аймаке аллель 340 п.н.; в Баян-Улэгейском аймаке – 348 п.н.; в аймаке Убурхангай – 416 п.н.). Только в одном случае произошло совпадение размера фрагментов ДНК штам-

ма неосновного подвида (улэгейский подвид, Баян-Улэгейский аймак) со штаммами основного подвида (348 п.н.). При выявлении фрагмента ДНК размером 348 п.н. обязательно дополнительно учитываются результаты амплификации ДНК данного штамма в мультиплексной ПЦР для дифференциации штаммов основного и неосновных подвигов и определения их потенциальной вирулентности. Амплификация фрагмента размером 2690 п.н. с праймерами IN1–IN4 (на ген порина) свидетельствует о том, что исследуемый штамм принадлежит к основному подвиду, амплификация фрагмента размером 733 п.н. с этими праймерами говорит о принадлежности данного штамма к улэгейскому подвиду (см. ниже). Альтернативно может быть проведено секвенирование ампликонов для дифференциации штаммов из указанных очагов основного и улэгейского подвигов, поскольку в дальнейших исследованиях при секвенировании фрагментов ДНК выявлены отличия в количестве повторов первого и второго локусов у штамма улэгейского подвида по сравнению со штаммами основного подвида (неопубликованные данные). У штаммов таласской группы обнаружен один аллель (444 п.н.). Гиссарские штаммы разделились на две группы: образующие фрагменты ДНК 448 и 456 п.н. Установить их мезоочаговую принадлежность пока не представляется возможным, поскольку нет сведений о районе, в котором выделены эти штаммы. С образцами штаммов кавказского подвида из всех автономных очагов амплифицировались фрагменты размером около 1800 п.н. Исключение составляют штаммы из

Восточно-Кавказского высокогорного очага, у которых образуются фрагменты значительно меньшего размера – 392 п.н. (табл. 1). Как показано выше, у штамма *Pestoides F1* (кавказский подвид) область *hutG*–*YPO1967* содержит мобильный элемент IS285. Судя по размерам продуктов ПЦР штаммов кавказского подвида, все они, кроме штаммов из Восточно-Кавказского высокогорного очага, также несут IS285 в этой области.

При определении подвидовой и очаговой принадлежности штаммов важно точно определить размер образующегося продукта амплификации. Поэтому, кроме стандартных маркеров размеров ДНК, мы использовали наборы из фрагментов ДНК референтных штаммов чумного микроба разных подвигов из различных природных очагов, размеры которых определены секвенированием. Штаммы пронумерованы в соответствии с возрастанием размеров фрагментов ДНК, которые образуются в ПЦР с праймерами TAN1–TAN2. При составлении двух наборов маркеров, четные (M2) и нечетные (M1) образцы фрагментов ДНК вносили в разные микропробирки, а при электрофорезе в гелях наносили в разные лунки (табл. 2; рисунок, А). Это необходимо для того, чтобы фрагменты ДНК близких размеров не наслаивались друг на друга. Образцы кавказского подвида из Зангезуро-Карабахского очага и псевдотуберкулезного микроба добавляли в обе микропробирки. Очистку маркеров от реакционной смеси проводили на колонках *Sentri-Sep spin columns* (Applied Biosystems). При температуре –70 °С маркеры хранятся в течение нескольких лет.

На рисунке А представлены результаты разделения продуктов ПЦР, полученных с ДНК штаммов чумного микроба разного происхождения, в 3 % агарозном геле в трис-боратной буферной системе с использованием в качестве маркеров наборов M1

и M2. Разработанный нами экспериментальный набор маркеров в сочетании с использованием данных табл. 1 позволяет проводить точное соотнесение полученных фрагментов ДНК с видовой, подвидовой и очаговой принадлежностью.

Результаты анализа штаммов чумного микроба из 39 природных очагов и штаммов псевдотуберкулезного микроба из разных географических областей показали, что с помощью монолокусной ПЦР с праймерами TAN1–TAN2 можно дифференцировать штаммы чумного и псевдотуберкулезного микроба, определять подвиговую и, в ряде случаев, очаговую принадлежность штаммов чумного микроба.

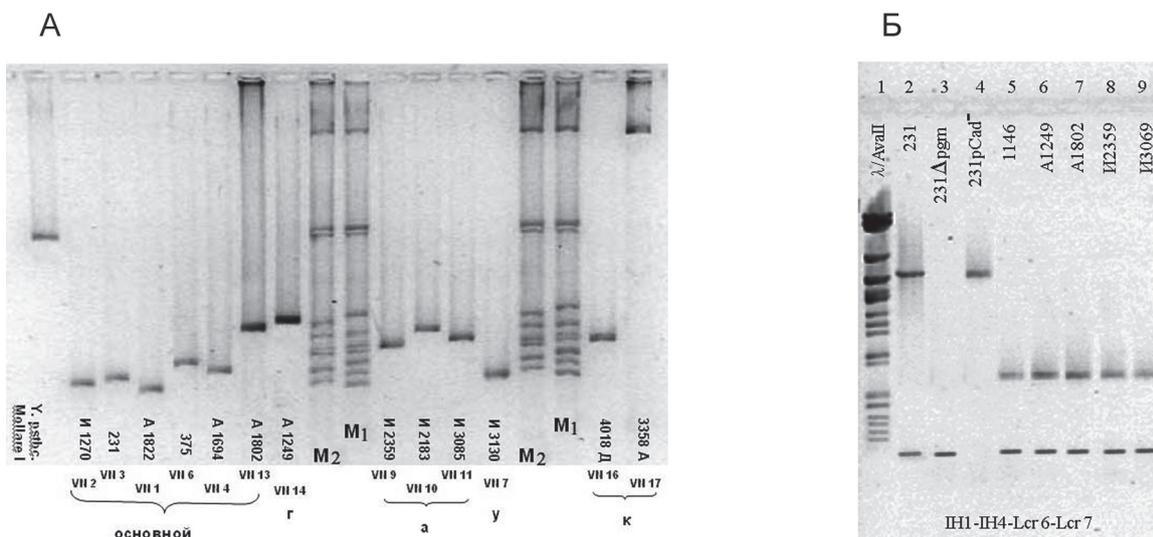
Разработка мультиплексной ПЦР для определения потенциальной вирулентности штаммов чумного микроба

Для дифференциации потенциально вирулентных и авирулентных штаммов чумного микроба разработана мультиплексная ПЦР, включающая две пары праймеров, выявляющих наличие или отсутствие основных детерминант вирулентности – области пигментации (*pgm*) и гены плазмиды кальцийзависимости (*pCad*). В качестве первой ДНК-мишени нами выбран ген порина *YPO1967*, так как структурные особенности этого гена в большинстве случаев позволяют дополнительно различать штаммы основного подвида с универсальной вирулентностью и штаммы неосновных подвигов с избирательной вирулентностью. Ген порина *YPO1967* ограничивает область пигментации со стороны *hms* локуса и у штаммов основного подвида поврежден IS100 элементом. Рекомбинация между двумя фланкирующими *pgm* область IS100 элементами приводит к делеции всей области. Отсутствие продукта в ПЦР с праймерами комплементарными концевым участкам этого гена у штаммов основного подвида свидетельствует об отсутствии *pgm* области и, следовательно,

Таблица 2

Состав наборов маркеров M1 и M2 для определения размеров продуктов амплификации, образующихся при анализе штаммов *Y. pestis* в ПЦР с праймерами TAN1–TAN2

Название штамма	Подвид	Природный очаг	Размер фрагмента, п.н.	Набор маркеров (M1, M2)
ИЗ130	Улгейский	Монголия, Южно-Гобийский аймак	340	M1
A1822	Основной	Кызылкумский пустынный	348	M2
И1270	Основной	Забайкальский степной	356	M1
231(708)	Основной	Аксайский высокогорный	364	M2
A1694	Основной	Верхненарынский высокогорный	372	M1
375	Основной	Сарыджазский высокогорный	388	M2
4018Д	Кавказский	Восточно-Кавказский высокогорный	392	M1
И2359	Алтайский	Алтайский горный	396	M2
ИЗ085	Алтайский	Монголия, аймак Убурхангай	400	M1
ИЗ069	Улгейский	«	416	M2
A1802	Таласская группа	Таласский высокогорный	444	M1
A1249	Гиссарский	Гиссарский высокогорный	456	M2
1146	Кавказский	Зангезуро-Карабахский горный	1819	M1, M2
<i>Y. pseudotuberculosis</i> A2526	-	Казахстан	642	M1, M2
<i>Y. pseudotuberculosis</i> Mollaret I	-	Париж (эталонный)	711	M1, M2



ПЦР-анализ штаммов чумного микроба разного происхождения методом VNTR-ПЦР с праймерами TAN1–TAN2, 3 % агарозный гель (А); методом мультиплексной ПЦР (Б):

- А: M1, M2 – маркеры из фрагментов ДНК референтных штаммов чумного и псевдотуберкулезного микробов, г – штамм гиссарского подвида, а – алтайского, у – улзгейского, к – кавказского, «основной» – основного подвида из разных природных очагов.
 Б: 1 – λ /AvaII; 2 – *Y. pestis pestis* 231(708) pgm⁺ pCad⁺; 3 – *Y. pestis pestis* 231 Δ pgm, pCad⁺; 4 – *Y. pestis pestis* 231 pgm⁺ pCad⁺; 5 – *Y. pestis caucasica* 1146 pgm⁺ pCad⁺; 6 – *Y. pestis hissarica* A-1249 pgm⁺ pCad⁺; 7 – *Y. pestis talassica* A-1802 pgm⁺ pCad⁺; 8 – *Y. pestis altaica* И-2359 pgm⁺ pCad⁺; 9 – *Y. pestis ulegeica* И-3069 pgm⁺ pCad⁺

об авирулентности, связанной с потерей «острова патогенности» – части *pgm* области. Ген порина штаммов неосновных подвидов не поврежден IS100 элементом. В результате отсутствия одного из фланкирующих *pgm* область IS100 элементов делеция *pgm* области у этих штаммов невозможна. Поэтому все штаммы неосновных подвидов можно считать потенциально вирулентными по этому признаку. Для выявления структурных особенностей гена YPO1967 использовали разработанные нами праймеры IN1 и IN4, фланкирующие IS100, встроенный в этот ген у штаммов основного подвида. Фрагмент ДНК, образующийся в ПЦР с ДНК вирулентных штаммов, имеет размер 2690 п.н., авирулентные штаммы основного подвида с праймерами IN1–IN4 продуктов амплификации не образуют. Фрагмент ДНК размером 733 п.н. амплифицируется у штаммов неосновных подвидов и группы штаммов основного подвида из Кызылкумского пустынного очага.

При выборе второй ДНК-мишени тестировали гены родоспецифичной плазмиды кальцийзависимости, которая имеет высокую степень гомологии у патогенных иерсиний [6]. Однако даже внутри вида *Y. pestis* имеются различия структурной организации плазмиды. Поэтому важно было выбрать последовательность, присутствующую в плаزمиде рCad штаммов всех подвидов и определяющую наличие области, ответственной за проявление вирулентных свойств. Чтобы определить область второй ДНК-мишени, проведен компьютерный анализ известных нуклеотидных последовательностей плазмиды рCad штаммов чумного микроба разных биоваров. По данным сиквенса полного генома штаммов биоваров *antiqua*, *medievalis*, *orientalis* и *microtus* ген

yopM штаммов биовара *microtus* (по сравнению со штаммами других биоваров) несет делецию 126 п.н. через 1465 п.н. после старта. Аллель гена *lcrV* штаммов того же биовара содержит делецию 16 п.н. через 969 п.н. после старта, а ген *yopN* имеет точковую мутацию у штаммов биовара *microtus*. Ген *lcrH*, отвечающий за синтез шаперона для белков Yop D, Yop B, участвующих в формировании пор при транслокации белков-эффекторов в клетку макроорганизма, оказался идентичным у штаммов всех биоваров [8]. Поиск второй пары праймеров для мультиплексной ПЦР был предпринят в области генов *yopN* и *lcrH*.

Подходящая пара праймеров не комплементарная паре праймеров IN1 и IN4, обозначенная *lcr7*–*lcr6*, выявлена при анализе последовательности гена *lcrH* и образует продукт амплификации размером 262 п.н. Специфичность полученного фрагмента подтверждена методом секвенирования. Нуклеотидная последовательность фрагментов ДНК типичных штаммов разных подвидов идентична и не отличается от аналогичных известных последовательностей штаммов биоваров *antiqua*, *medievalis*, *orientalis* и *microtus*.

Условия проведения мультиплексной ПЦР для определения потенциальной вирулентности штаммов чумного микроба подбирали на изогенной системе штамма *Y. pestis* 231 (исходный; Δ pgm, pCad⁺; pgm⁺ pCad⁺) и пяти штаммах неосновных подвидов: 1146 (*Y. pestis subsp. caucasica*), A1249 (*Y. pestis subsp. hissarica*), A1802 (*Y. pestis* таласская группа), И2359 (*Y. pestis subsp. altaica*), И3069 (*Y. pestis subsp. ulegeica*). У всех штаммов дикого типа основного подвида во всех случаях наблюдали образование фрагментов 2690 и 262 п.н., неосновных подвидов – 733 и 262 п.н. (рисунок, Б). Такие результаты указывают на то, что

изученные культуры потенциально вирулентные. Отсутствие одного или двух ПЦР продуктов указывает на потерю штаммом одной или двух основных детерминант вирулентности и, как следствие, на авирулентность штамма. Эффективность разработанного способа проверена на 170 штаммах чумного микроба всех подвидов из разных природных очагов и 68 штаммах псевдотуберкулезного микроба. Результаты тестирования четко коррелировали с паспортными данными штаммов по вирулентности, представленными ГКПБ «М».

Таким образом, комплексное использование разработанных монолокусного и мультиплексного вариантов ПЦР обеспечивает быструю и надежную идентификацию штаммов чумного микроба с определением подвидовой, очаговой принадлежности и потенциальной вирулентности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Онищенко Г.Г., Кутырев В.В.*, редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: 2004. 192 с.
2. *Савостина Е.П., Попов Ю.А., Каштанова Т.Н., Яшечкин Ю.И.* Анализ геномного полиморфизма типовых и атипичных штаммов возбудителя чумы с использованием полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2004; 1:22–6.
3. *Klevytska A.M., Price L.B., Schupp J.M., Worsham P., Wong J., Keim P.* Identification and characterization of Variable-Number Tandem Repeats in the *Yersinia pestis* genome. J. Clin. Microbiol. 2001; 39(9):3179–85.
4. *Li Y., Cui Y., Hauck Y., Platonov M., Dai E., Song Y., Guo Zh., Pourcel C., Dentovskaya S., Anisimov A., Yang R., Vergnaud G.* Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA:

insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. PLoS ONE. 2009; 4(6):e6000.

5. *Lowell J.L., Wagner D.M., Atshabar B., Antolin M.F., Vogler A.J., Keim P., Chu M.C., Gage K.L.* Identifying sources of human exposure to plague. J. Clin. Microbiol. 2005; 43:650–6.

6. *Portnoy D.A., Wolf-Watz H., Bolin I., Beeder A.B., Falkow S.* Characterization of common virulence plasmids in *Yersinia* species and their role in expression of outer membrane proteins. Infect. Immun. 1984; 43:108–14.

7. *Pourcel C., Andre-Mazeaud F., Neubauer H., Ramiise F., Vergnaud G.* Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. BMC Microbiol. 2004; 4:22.

8. *Zhou D., Tong Z., Song Y., Han Y., Pei D., Pang X., Zhai J., Li M., Cui B., Qi Z., Jin L., Dai R., Du Z., Wang J., Guo Z., Wang J., Huang P., Yang R.* Genetics of metabolic variations between *Yersinia pestis* biovars and the proposal of a new biovar, microtus. J. Bacteriol. 2004; 186 (15):5147–52.

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

1. *Onishchenko G.G., Kutyrev V.V.*, editors. [Plague Natural Foci of Caucasus, Precaspian Region, Central Asia and Siberia]. M.: Meditsina; 2004. 192 p.

2. *Savostina E.P., Popov Yu.A., Kashtanova T.N., Yashchkin Yu.I.* [Analysis of genomic polymorphism of typical and atypical strains of the plague pathogen using polymerase chain reaction with universal primers]. Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. 2004; 1:22–6.

Authors:

Gaeva A.V., Boolgakova E.G., Sukhonosov I.Yu., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

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

Поступила 01.04.11.

М.Е.Платонов¹, В.В.Евсеева¹, Д.В.Ефременко², И.В.Кузнецова², Е.В.Чиркова¹, С.В.Дентовская¹,
А.Н.Куличенко², А.П.Анисимов¹

DFR-ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* ИЗ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ СНГ

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

²ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»

С помощью DFR-типирования [6] набора из 275 штаммов *Y. pestis*, выделенных преимущественно в природных очагах чумы стран СНГ, определены «геномовары» (DFR-типы), характерные для 27 очагов. Выявлено 64 новых DFR-типа *Y. pestis* (из 96, описанных к настоящему времени) и установлено, что на территории стран СНГ и в Монголии циркулирует не менее 56 геномоваров. Показано, что все исследованные методом DFR-типирования штаммы кластеризуются в соответствии с филогенетической схемой, предложенной на основании данных сочетанного SNP- и IS100-типирования [1], и дифференцируются до уровня подвидов, популяций и даже штаммов, циркулирующих на территории определенных природных очагов.

Ключевые слова: DFR-типирование, *Yersinia pestis*.

M.E. Platonov, V.V. Evseeva, D.V. Efremenko, I.V. Kuznetsova, E.V. Chirkova, S.V. Dentovskaya,
A.N. Kulichenko, A.P. Anisimov

DFR-Typing of *Yersinia pestis* Strains from the CIS Natural Foci

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk;
Stavropol Research Anti-Plague Institute

Different region analysis (DFR-typing) was used for characterization of 275 *Y. pestis* strains isolated mainly from the CIS natural plague foci. Genomovars (DFR-types) endemic for 27 natural foci were determined. In addition to 32 genomovars described previously 64 novel *Y. pestis* DFR-types were revealed. 56 genomovars were shown to circulate in CIS and Mongolia. All strains analyzed by DFR-typing, were clustered in accordance with the phylogenetic tree proposed on the basis of combined SNP- and IS100-typing data. The discriminatory ability of the method is high enough to distinguish between subspecies, populations and even strains circulating in certain natural plague focus.

Key words: DFR-typing, *Yersinia pestis*.

Относительно недавнее возникновение и микроэволюционирование *Y. pestis* [1] объясняет низкую степень внутривидового разнообразия и затрудняет быструю и надежную фенотипическую дифференциацию отдельных штаммов патогена [2, 5], необходимую не только для целей молекулярной эпидемиологии, но и для лучшего понимания механизмов возникновения *Y. pestis* и распространения чумы. Все методы генотипирования основаны на анализе фрагментов нуклеиновых кислот, различающихся у близкородственных штаммов [4]. Внедрение в практику здравоохранения современных методов генотипирования обеспечивает получение воспроизводимых данных, позволяющих не только различать внутривидовые группы, но и отдельные штаммы *Y. pestis* и даже линии штаммов, поддерживаемые в различных лабораториях.

В геноме *Y. pestis* с помощью сравнительного анализа полногеномных последовательностей *in silico*, сравнительной гибридизации геномов с помощью технологии ДНК-микроэрезов и вычитающей гибридизации было выявлено 23 локуса, по наличию которых отличаются штаммы одного вида (different region – DFR), и была разработана технология генотипирования *Y. pestis*, основанная на учете присутствующего в штамме набора DFR. При исследовании 909 природных изолятов было показано, что на территории 13 природных очагов Китая

циркулируют штаммы 32 «геномоваров» (DFR-типов), причем для каждого очага характерен свой основной DFR-тип [6].

В настоящей публикации описано DFR-типирование набора штаммов *Y. pestis*, выделенных преимущественно в природных очагах стран СНГ и Монголии.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В работе использовали 275 штаммов *Y. pestis*. DFR-профили 205 штаммов определены в настоящем исследовании экспериментально, аналогичные данные о 48 штаммах взяты из работы [6], а DFR-профили 22 штаммов *Y. pestis* и штамма *Y. pseudotuberculosis* IP32953 получены в результате анализа *in silico* полногеномных нуклеотидных последовательностей, доступных в Интернете. Так как DFR01, DFR02 и DFR03 входят в состав плазмиды rFra [8], то для генотипирования использовали только штаммы, содержащие эту плазмиду. Бактерии выращивали на агаре Хоттингера с добавлением 1 % гемолизированной крови в течение 48 ч при температуре 28 °С. Геномную ДНК выделяли в соответствии с методическими указаниями МУ 1.3.1794-03 «Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного микроорганиз-

Результаты и обсуждение

На основании анализа DFR-профилей 275 штаммов *Y. pestis* нам удалось подразделить все исследованные к настоящему моменту изоляты на 96 DFR-типов (64 из них описаны нами впервые). На территориях стран СНГ и в Монголии циркулируют, как минимум, 56 геномоваров. DFR-профили и NJ-дендрограмма 96 геномоваров представлены на рис. 1. Большинство геномоваров вошли в состав трех кластеров: А, В и С [6], соответствующих основным ветвям 1, 2 и 0 дендрограммы, построенной M.Achtman *et al.* [1] на основании данных SNP- и IS100-типирования. Более поздняя версия SNP-дендрограммы, по данным A.Derbise *et al.* [3], представлена на рис. 2. В нашем исследовании вне кластеров остался африканский «полевочий» штамм *subsp. angola* – Angola, что может свидетельствовать как о его относительно древнем происхождении, так и об отсутствии среди анализируемых изолятов других филогенетически близких ему штаммов. Как и в публикации наших китайских коллег [6], все штаммы биовара *orientalis* (24 штамма в составе 10 геномоваров) вошли в состав кластера А/1, все штаммы биовара *medievalis* (98 штаммов в составе 29 геномоваров) – в кластер В/2, а представители биовара *microtus* (неосновные подвиды *Y. pestis* [5]) (91 штамм в составе 27 геномоваров), за исключением геномовара 85, представленного штаммом Angola, – в кластер С/0. Штаммы биовара *antiqua* (64 штамма в составе 29 геномоваров) распределились по различным ветвям кластеров А/1, В/2 и С/0.

В состав кластера В/2 входят две основные ветви (рис. 1). Одна из ветвей соответствует ветви 2.ANT на рис. 2 и представлена в основном геномоварами, циркулирующими на территориях Китая и Монголии (например, 10–13, 26–28, 62 и др.), а также геномоваром 19 – основным DFR-типом в граничащем с Китаем и Монголией природном очаге 38 и минорным для Монголии, Китая и Непала, а также удаленно расположенного Центрально-Кавказского высокогорного очага. В эту же ветвь входят минорные геномовары 57 и 59 из природного очага 1.

Вторая ветвь соответствует ветви 2.MED на

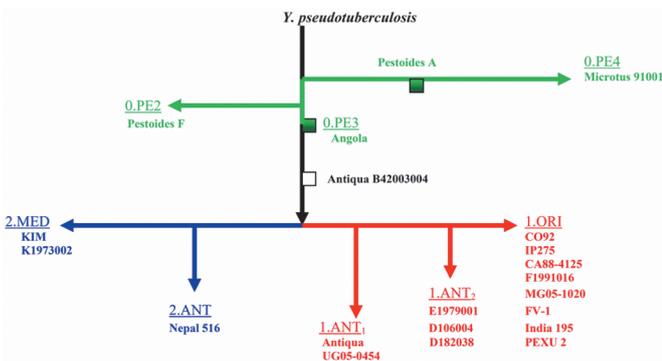


Рис. 2. Дендрограмма микроэволюции 21 штамма *Y. pestis* по данным SNP типирования [4]

рис. 2 и образована, в основном, DFR-типами, характерными для природных очагов стран СНГ. Она включает геномовар 15 – основной DFR-тип штаммов биовара *medievalis*, циркулирующих в природных очагах Средней Азии.

Все изученные нами штаммы биовара *orientalis* вошли в состав кластера А/1 и были выделены за пределами СНГ, Монголии и Китая. В этот же кластер вошли штаммы биовара *antiqua*, циркулирующие на территории Монголии (геномовар 01b (минорный DFR-тип для китайских очагов В1, С, D, G и К2) – четыре штамма, геномовар 62 – один штамм) и стран СНГ в природных очагах: 31 (основной для соседнего китайского очага А [6] геномовар 04 – один штамм), 33 (геномовар 60, отличающийся от геномовара 04 отсутствием DFR18, – один штамм) и 37 (геномовар 61 – девять штаммов, геномовар 01b – один штамм), 40 (геномовар 01b – два штамма, геномовар 04 – один штамм, геномовар 93 – один штамм, 94 – один штамм), 46 (геномовар 01b – один штамм). В состав этого кластера входят и штаммы геномовара 03 биовара *intermedium*, циркулирующие в китайском очаге В3. Кластер включает две основные ветви, одна из которых (DFR-типы: 07–09, 32–35, 56, 86–89) соответствует ветви 1.ORI на рис. 2, а остальные геномовары в составе второй ветви – 1.ANT.

Кластер С/0 формировали две основные ветви (рис. 1), одна из которых включала геномовар 90 (ветвь 0.PE2 на рис. 2), а вторая DFR-типы 14 и 80 (ветвь 0.PE4 на рис. 2).

В 0.PE2 ветвь, кроме DFR-типа 90, входили геномовары: 24 (минорный геномовар штаммов *bv. antiqua subsp. pestis* из китайского очага С; основной – для *subsp. ulegeica* (семь штаммов из Монголии) и минорный для *subsp. caucasica* (по одному штамму из очагов 5 и 7)); 63, 67, 70, 71, 74, 72, 76 (по одному штамму *subsp. caucasica* из очагов 6, 7, 4, 4, 39, 39, 5 соответственно); 64 (по одному штамму *subsp. caucasica* из очагов 6 и 7), 92 (пять штаммов из очага 39) и основной для очага 39 геномовар 73 (семь штаммов *subsp. caucasica*).

Ветвь 0.PE4 более разнообразна по входящим в нее подвидам. Сюда вошли геномовары 62, 23, 30 основного подвида биовара *antiqua* из Монголии и Китая. Большинство входящих в группу 0.PE4 штаммов биовара *microtus* обладало DFR-типом 14 – основным геномоваром китайских подвидов *qinghaiensis* и *xilingolensis*, который также оказался характерным для трех монгольских штаммов, относимых к подвиду *altaica*. В случае выявления близкого родства этих штаммов и с помощью других методов молекулярного типирования следует поставить вопрос о тщательной проверке всех коллекционных штаммов подвида *altaica*, выделенных в Монголии, на предмет их перевода в соответствующий внутривидовой таксон. Геномовар 80 – основной для штаммов подвида *altaica*, выделенных в очаге 36 (12 штаммов) и в Монголии (один штамм). К этому же

геномвару относится и единственный в нашем исследовании представитель подвида *talassica* A-1820. Штамм *Pestoides A* относится к этому же DFR-типу и, вероятно, является представителем подвида *altaica* или *talassica*. Штаммы subsp. *caucasica* геномвара 69 циркулируют в очагах 4 (два штамма), 5 (два штамма) и 7 (один штамм). Остальные входящие в ветвь 0.PE4 геномвары представлены одним – двумя штаммами подвигов *hissarica*, *altaica*, *caucasica* и *ulegeica*.

Таким образом, определение профилей 23 DFR позволило сгруппировать 275 штаммов *Y. pestis* в 96 геномваров. Для штаммов биоваров *orientalis*, *medievalis* и *microtus* характерны биовар-специфичные DFR-профили, и каждый из биоваров образует свой отдельный кластер. В то же время штаммы разных геномваров биовара *antiqua* распределены по различным ветвям кластеров A/1, B/2 и C/0. Маловероятно, что совпадение DFR-типов (03 и 24) у штаммов из географически изолированных природных очагов и разных внутривидовых групп (рис. 1) связано с их заносом с одной территории на другую. Скорее это совпадение можно объяснить независимой утратой амплифицируемых локусов или участков «посадки» праймеров и даже ошибками, допущенными при проведении коллекционной работы со штаммами. С другой стороны, совпадение DFR-типов у представителей фенотипически близких подвигов *xilingolensis* и *qinghaiensis* (DFR14), а также *altaica* и *talassica* (DFR30) [5] может свидетельствовать и об их близком генетическом родстве. Верификация полученных нами результатов с помощью других методов мультилокусного генотипирования (MLVA, CRISPR-типирование и др.) поможет ответить на эти вопросы. Косвенным подтверждением высокой разрешающей способности метода молекулярного типирования с использованием 23 DFR-локусов и корректности распределения отдельных внутривидовых групп *Y. pestis* по кластерам и отдельным ветвям дендрограммы является недавняя публикация G. Morelli *et al.* [7], в которой сходное по структуре филогенетическое дерево для 282 штаммов *Y. pestis* было построено на основании типирования по 933 SNP-локусам. И на их филограмме значительное разнообразие характерно именно для входящих в состав ветви 0 наиболее древних внутривидовых групп *Y. pestis*.

Работа выполнена по государственному контракту № 53-Д от 29.06.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

Выражаем глубокую благодарность Иркутскому научно-исследовательскому противочумному институту Сибири и Дальнего Востока за предоставленные штаммы возбудителя чумы (использованные ранее в совместных исследованиях по мультилокусному VNTR-типированию).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Achtman M., Morelli G., Zhu P., Wirth T., Diehl I., Kusecek B. *et al.* Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004; 101(51):17837–42.
2. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. Clin. Microbiol. Rev. 2004; 17(2):434–64.
3. Derbise A., Chenal-Francois V., Huon C., Fayolle C., Demeure C.E., Chane-Woon-Ming B. *et al.* Delineation and analysis of chromosomal regions specifying *Yersinia pestis*. Infect. Immun. 2010; 78(9):3930–41.
4. Foley S.L., Lynne A.M., Nayak R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. Infect. Genet. Evol. 2009; 9(4):430–40.
5. Li Y., Cui Y., Hauck Y., Platonov M.E., Dai E., Song Y. *et al.* Genotyping and phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* by MLVA: insights into the worldwide expansion of Central Asia plague foci. PLoS ONE 2009; 4(6):e6000.
6. Li Y., Dai E., Cui Y., Li M., Zhang Y., Wu M. *et al.* Different region analysis for genotyping *Yersinia pestis* isolates from China. PLoS One 2008; 3(5):e2166.
7. Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J., Eppinger M., Roumagnac P., Wagner D.M. *et al.* *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. Nat. Genet. 2010; 42(12):1140–3.
8. Zhou D., Han Y., Song Y., Tong Z., Wang J., Guo Z. *et al.* DNA microarray analysis of genome dynamics in *Yersinia pestis*: insights into bacterial genome microevolution and niche adaptation. J. Bacteriol. 2004; 186(15):5138–46.

Authors:

Platonov M.E., Evseeva V.V., Chirkova E.V., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

Efremenko D.V., Kuznetsova I.V., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. Sovetskaya St., 13–15, Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Об авторах:

Платонов М.Е., Евсеева В.В., Чиркова Е.В., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Оболенск, Московская обл. E-mail: platonov@obolensk.org

Ефременко Д.В., Кузнецова И.В., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 02.02.11.

Н.Н.Тетерятникова, И.Б.Захарова, М.В.Подшивалова, А.В.Романова, Я.А.Лопастейская,
Д.В.Викторов, В.В.Алексеев

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ИНТЕГРОНОВ КЛАССА 1 У *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI*

ФГУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт»

Для детекции интегროнов класса 1 у *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* использована ПЦР с праймерами, специфичными фланкирующим последовательностям области вставки генных кассет и 3'-консервативному сегменту интегროнов. Последовательности 3'-сегмента *In1* обнаружены у половины исследованных штаммов *B. pseudomallei*. Размер области кассетной вставки интегროнов у *B. pseudomallei* составил 2300 п.н. (1 штамм), 500 и 900 п.н. (1 штамм) и 120 п.н. (2 штамма). Секвенирование ампликонов 3'-сегмента показало наличие генов *qacEdelta1* и *sul1* – детерминант устойчивости к четвертичным аммонийным соединениям и сульфонидам соответственно.

Ключевые слова: *Burkholderia pseudomallei*, интегроны, антибиотикорезистентность.

N.N.Teteryatnikova, I.B.Zakharova, M.V.Podshivalova, A.V.Romanova, Ya.A.Lopasteiskaya, D.V.Viktorov,
V.V.Alekseev

Molecular Detection of Class 1 Integrons in *Burkholderia pseudomallei*

Volgograd Anti-Plague Research Institute

PCR with primers specific to flanking sequences of gene cassette insertion region and 3'-conservative segment of integrons was used for class 1 integron detection in *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei* and *B. thailandensis*. The sequences of *In1* 3'-conservative segment were detected in the majority of investigated strains of *B. pseudomallei*. The length of integron cassette insertion region in *B. pseudomallei* was estimated as 2300 bp (1 strain), 500 and 900 bp (1 strain) and 120 bp (2 strains). The sequence analysis of 3'-segment amplicons showed the presence of *qacEdelta1* and *sul1* – the determinants of resistance to quaternary ammonium compounds and sulfonamides, respectively.

Key words: *Burkholderia pseudomallei*, integrons, antimicrobial resistance.

Аккумуляция единичных генов антибиотикорезистентности в интегронах – генетических элементах, способных включать в свой состав экзогенные кодирующие последовательности по механизму сайт-специфической рекомбинации и обеспечивать их экспрессию, является важнейшим молекулярно-генетическим механизмом формирования множественной устойчивости к антибиотикам у ряда бактериальных патогенов [2, 5, 6].

Общими элементами структуры интегროнов, охарактеризованных к сегодняшнему дню, являются наличие гена *intI*, кодирующего интегразу семейства тирозиновых рекомбиназ, сайта рекомбинации *attI* и промоторной последовательности *Pc*, обеспечивающей транскрипцию генных кассет в составе интегрона [5, 6]. Последовательности генных кассет содержат *attC* сайт (59-be, 59 base element) – несовершенный инвертированный повтор протяженностью 57–141 п.н. с консервативными краевыми участками, служащий сайтом узнавания интеграз [5, 6]. Существующая классификация интегროнов основана на различиях в последовательностях генов *intI*; в соответствии с ней выделяют 7 классов данных генетических элементов. По характеру геномной локализации интегроны разделяют на «мобильные», входящие в состав IS-элементов, транспозонов, конъюгативных плазмид, и так называемые суперинтегроны – протяженные участки хромосом, содержащие генные

кассеты различных функциональных групп [5]. В процессы аккумуляции и горизонтального переноса генов устойчивости к антибиотикам у бактерий вовлечены преимущественно «мобильные» интегроны 1–5-го классов [5, 6].

Важным биологическим свойством патогенных буркхольдерий (возбудители мелиоидоза и сапа – *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*) является высокая природная резистентность к широкому спектру антимикробных соединений [3, 7]. Наличие этого свойства создает значительные трудности для успешного лечения вызываемых ими заболеваний. Необходимо отметить, что биологические основы полирезистентности патогенных *Burkholderia* на сегодняшний день являются малоизученными.

Исследования систем генетического обмена патогенных *Burkholderia* [1] доказывают принципиальную возможность горизонтального переноса и наследования этими микроорганизмами R-детерминант в составе мобильных генетических элементов. Очевидно, что детекция и структурно-функциональный анализ данных последовательностей является актуальным направлением исследований как в плане более полного понимания биологических основ устойчивости возбудителей мелиоидоза и сапа к антимикробным соединениям, так и в аспектах совершенствования схем лечения инфекций и создания систем геномного сканирования штаммов патогенных буркхольдерий с

Праймеры, использованные в работе

Праймер*	Последовательность 5'-3'	Мишень**
in-F	GGCATCCAAGCAGCAAGC	5'-консервативный сегмент интегროнов In1 (accession no. U12338, 1416-1433)
in-B	AAGCAGACTTGACCTGAT	3'-консервативный сегмент интегროнов In1 (accession no. U12338, 4831-4814)
qacEd1	ATCGCAATAGTTGGCGAAGT	Ген устойчивости к четвертичным аммонийным соединениям qacEdelta1 3'-консервативного сегмента интегროнов In1 (accession no. X15370, 211-230)
sul	GCAAGGCGGAAACCCGCC	Ген устойчивости к сульфонидам sul 3'-консервативного сегмента интегროнов In1 (accession no. X12869, 1360-1341)

* Праймеры синтезированы на базе НПК «Синтол» (Россия) по последовательностям, приведенным в работе L.Bass *et al.* [2].

** Указаны позиции праймеров на последовательностях интегროнов In1, представленных в Genbank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

целью решения практических задач генодиагностики, молекулярно-эпидемиологического мониторинга и прогнозирования возможных эпидситуаций, вызванных антибиотикорезистентными штаммами. Цель данной работы, таким образом, заключалась в выявлении последовательностей интегროнов класса I в геномах штаммов исследуемых видов *Burkholderia* с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и их первичной структурной характеристике.

Материалы и методы

В работе использованы 11 штаммов *B. pseudomallei*, 3 штамма *B. mallei*, 3 штамма *B. thailandensis* из коллекции ФГУЗ ВолгоградНИПЧИ. Культуры микроорганизмов выращивали на Nutrient agar (Difco) в течение 24–48 ч при 37 °С. 200 мкл бактериальной суспензии в 0,15 М NaCl (pH 7,2) плотностью $2 \cdot 10^9$ м.к./мл, инактивированной в соответствии с МУ 1.3.1794-03, смешивали с равным объемом лизирующего буфера (20 mM трис-HCl, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,2 мг/мл желатина, 0,9 % Nonidet P-40, 0,9 % Твин 20, 150 мкг/мл протеиназы К), инкубировали при 65 °С 120 мин и прогревали при 96 °С 30 мин для инактивации фермента. Далее пробы центрифугировали (10000 об./мин, 1 мин), 10 мкл супернатанта использовали при постановке ПЦР. Праймеры для ПЦР-детекции последовательностей *In1* приведены в таблице.

ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технологии, Россия) с использованием стандартных реагентов фирмы «ИнтерЛабСервис» (Россия). Область кассетной вставки *In1* амплифицировали с использованием праймеров inF–inB по программе: прогрев 95 °С 1 мин, 35 циклов (94 °С 30 с, 55 °С 30 с, 72 °С 45 с), финальная элонгация 72 °С 5 мин. Амплификацию участка 3'-консервативного сегмента *In1* (праймеры qacEd1-sul) проводили по аналогичной программе, температура отжига праймеров составляла 58 °С. Продукты ПЦР анализировали в 1,5 % агарозном геле.

Продукты амплификации секвенировали на секвенаторе ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США), используя наборы BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Результаты и обсуждение

Первичный ПЦР-скрининг интегროнов I класса с использованием пары праймеров qacEd1-sul показал присутствие последовательностей 3'-консервативного сегмента *In1* в геномах большинства исследуемых штаммов *B. pseudomallei* (рис. 1). Размер ампликонов qacEd1-sul составил порядка 800 п.н., что, в целом, соответствовало ранее полученным данным о структуре 3'-сегментов данных генетических элементов [2, 5, 6].

Последующий анализ области кассетной вставки интегროнов в ПЦР с праймерами inF-inB продемонстрировал наличие ампликонов различного размера в геномах 4 штаммов возбудителя мелиоидоза (рис. 2). В штамме *B. pseudomallei* 56830 размер области кассетной вставки интегрона составил 2300 п.н., тогда как в штамме *B. pseudomallei* C141 области кассетной вставки *In1* соответствовало 2 ампликона размером 500 и 900 п.н. Еще в двух исследованных штаммах *B. pseudomallei* размер амплифицируемого региона составил 120 п.н., что, вероятно, следует объяснять отсутствием внедренных генных кассет в структуре интегროнов у данных изолятов.

Секвенирование ампликонов qacEd1-sul и последующий анализ сиквентов на предмет наличия кодирующих участков (ORF, open reading frame) продемонстрировали 2 наиболее вероятных варианта ORF, ориентированных в направлении 5' - 3' - ис-

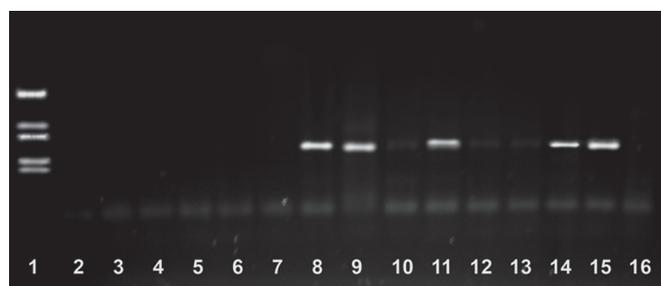


Рис. 1. Амплификация последовательности 3'-консервативного сегмента интегрона *In1* в штаммах буркхольдерий с праймерами qacEd1-sul:

1 – ДНК-маркер, 2000, 1000, 900, 700, 450 п.н.; 2 – *B. thailandensis* E251; 3 – *B. thailandensis* E264; 4 – *B. thailandensis* E299; 5 – *B. mallei* 10230; 6 – *B. mallei* B-120; 7 – *B. mallei* П-5; 8 – *B. pseudomallei* 56770; 9 – *B. pseudomallei* 57576; 10 – *B. pseudomallei* 56830; 11 – *B. pseudomallei* 111; 12 – *B. pseudomallei* 114; 13 – *B. pseudomallei* 135; 14 – *B. pseudomallei* 140; 15 – *B. pseudomallei* 107; 16 – *B. pseudomallei* 100

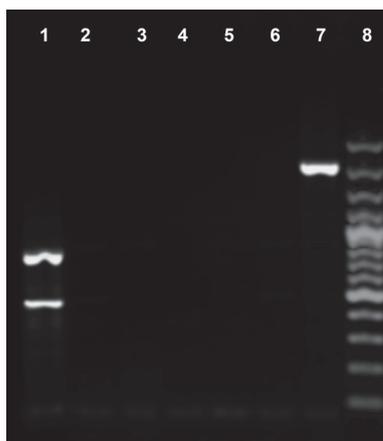


Рис. 2. Амплификация области кассетной вставки интегронов *In1* в штаммах *B. pseudomallei* с праймерами inF-inB:

1 – *B. pseudomallei* C141; 2 – *B. pseudomallei* 111; 3 – *B. pseudomallei* 114; 4 – *B. pseudomallei* 135; 5 – *B. pseudomallei* 139; 6 – *B. pseudomallei* 140; 7 – *B. pseudomallei* 56830; 8 – GeneRuler Plus леддер (Fermentas), 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 п.н.

следуемой последовательности. Дальнейший анализ обозначенных ORF с применением алгоритма BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) показал их высокую гомологию консервативным структурным компонентам 3'-сегмента интегронов класса 1 – генам *qacEdelta1* и *sulI* – детерминантам устойчивости к четвертичным аммонийным соединениям и сульфонидамидам соответственно.

Таким образом, проведенное исследование показало, что в геномах штаммов возбудителя мелиоидоза имеются последовательности интегронов класса 1. Установленный в рамках данной работы факт присутствия интегронов *In1* у *B. pseudomallei* свидетельствует о принципиальной осуществимости механизма аккумуляции и наследования генных кассет антибиотикорезистентности в составе данных генетических элементов и формировании, таким образом, штаммов с фенотипом множественной антибиотикоустойчивости. Отрицательный результат ПЦР с праймерами *qacEd1-sul* у ряда штаммов с детектированной областью кассетной вставки интегронов, возможно, опосредован вторичными рекомбинационными событиями на участках 3'-консервативного сегмента, нарушающими сайты связывания с праймерами. В частности, подобные модификации структуры 3'-консервативного сегмента *In1* были описаны у *Proteus mirabilis* [8].

Вопрос о характере геномной локализации выявленных генетических элементов требует дальнейших исследований. Отметим, что на сегодняшний день у микроорганизмов рода *Burkholderia* интегроны класса 1 были выявлены в составе конъюгативных плазмид отдельных эпидемических штаммов *B. cepacia* [4], а в исследованных нами штаммах возбудителя мелиоидоза ранее были отмечены криптические плазмиды различного размера [1]. Структурный анализ и генетическое картирование регионов кассетных вставок интегронов также являются задачами дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мерينو́ва Л.К., Анто́нов В.А., Зама́раев В.С., Викторо́в Д.В. Мобилизация криптических плазмид возбудителя мелиоидоза в гетерологичные виды микроорганизмов. Мол. генет. микробиол. вирусол. 2000; 2:37–40.
2. Bass L., Liebert C.A., Lee M.D., Summers A.O., White D.G. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 1999; 43:2925–9.
3. Brett P.J., Woods D.E. Pathogenesis of and immunity to melioidosis. Acta Trop. 2000; 74:201–10.
4. Crowley D., Daly M., Lucey B., Shine P., Collins J., Cryan B. et al. Molecular epidemiology of cystic fibrosis-linked *Burkholderia cepacia* complex isolates from three national referral centres in Ireland. J. Appl. Microbiol. 2002; 92:992–1004.
5. Fluit A.C., Schmitz F.J. Resistance integrons and super-integrons. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10:272–8.
6. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. Nature 2006; 4:608–20.
7. Vorachit M., Chongtrakool P., Arkomsean S., Boonsong S. Antimicrobial resistance in *Burkholderia pseudomallei*. Acta Trop. 2000; 74:139–44.
8. Zong Z., Partridge S., Iredell J. A *bla*VEB-1 variant, *bla*VEB-6, associated with repeated elements in a complex genetic structure. Antimicrob. Agents Chemother. 2009; 53:1693–7.

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

1. Merinova L.K., Antonov V.A., Zamaraev V.S., Viktorov D.V. [Mobilization of a cryptic plasmid from the melioidosis pathogen in heterologous species of microorganisms]. Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. 2000; 2:37–40.

Authors:

Tetryatnikova N.N., Zakharova I.B., Podshivalova M.V., Romanova A.V., Lopasteiskaya Ya.A., Viktorov D.V., Alekseev V.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute. Golubinskaya St., 7, Volgograd, 400131, Russia. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Об авторах:

Тетерятникова Н.Н., Захарова И.Б., Подшивалова М.В., Романова А.В., Лопастейская Я.А., Викторов Д.В., Алексеев В.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 09.11.10.

А.В.Шашкова, А.А.Горяев, Н.И.Смирнова

СТРОЕНИЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ CRISPR-СИСТЕМЫ БАКТЕРИЙ

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

Представлен обзор литературных данных о недавно открытой системе кластрированных, равномерно удаленных друг от друга коротких палиндромных повторов, или системе CRISPR, которая участвует в защите от проникновения чужеродной генетической информации у прокариот. Описаны особенности строения и функции CRISPR, а также предполагаемый механизм действия. Также представлены данные о наличии этой системы у возбудителей особо опасных инфекций и возможности ее использования для молекулярного типирования.

Ключевые слова: CRISPR, *cas* гены, бактериофаги, возбудители особо опасных инфекций.

A.V.Shashkova, A.A.Goryaev, N.I.Smirnova

Structure and Functional Role of Bacterial CRISPR System

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Presented is the review of literature data on the recently discovered system of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR), which takes part in the defense against penetration of alien genetic information in prokaryotes. CRISPR structural peculiarities and functions, and putative mechanism of action are described. Also presented are data on the availability of this system in particularly dangerous infections agents and on the possibility of its application for molecular typing.

Key words: CRISPR, *cas* genes, bacteriophages, agents of particularly dangerous infections.

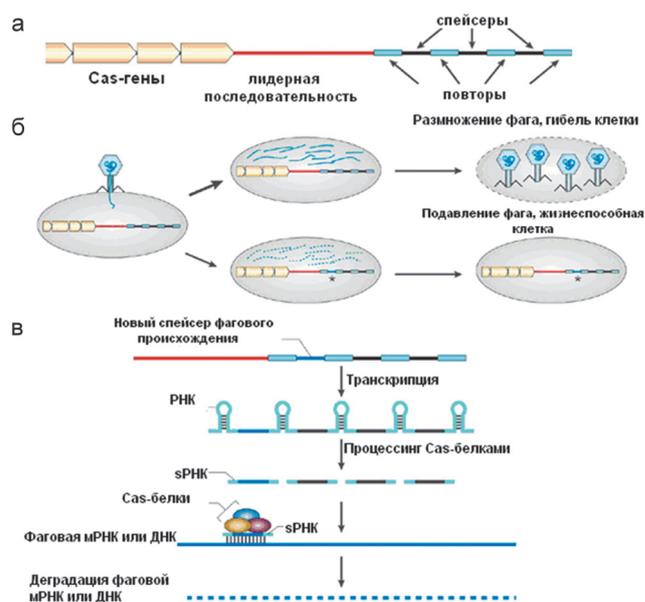
На сегодняшний день неоспоримым является тот факт, что главный вклад в эволюцию геномов прокариот вносит горизонтальный перенос генов. Между тем, приобретение нового чужеродного генетического материала может быть позитивным, негативным или нейтральным [26]. У прокариот существуют механизмы как «поощряющие» приобретение генетической информации (конъюгация, рекомбинация, трансформация и др.), так и системы защиты, ограничивающие горизонтальный перенос (системы рестрикции-модификации, сахар-неспецифические нуклеазы, abortивная инфекция и др.) [14, 30].

Кроме того, в защите от внедрения бактериофагов и конъюгативных плазмид в клетки прокариот участвуют недавно обнаруженные кластрированные, равномерно удаленные друг от друга короткие палиндромные повторы – CRISPR (от Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). CRISPR, впервые обнаруженные в 1987 году [15], сейчас найдены в секвенированных геномах 91,0 % архей и 45,0 % бактерий [9]. Между тем этот новый уникальный механизм «иммунитета» прокариот остается еще до конца невыясненным и требует более детального рассмотрения.

Строение CRISPR

Типичная CRISPR-система представляет собой каскету, состоящую из коротких уникальных участков – спейсеров размером 27–72 п.н. и разделяющих их строгих палиндромных повторов размером 24–47 п.н. (рисунок, а) [23, 24]. В одной CRISPR-касете число повторов может доходить до нескольких сотен (у *Verminephrobacter eiseniae* 249 повторов), которые всегда идентичны, однако один или несколько последних могут отличаться. Повторы

CRISPR-последовательностей высококонсервативны в пределах одного вида. Наличие коротких (5–7 п.н.) палиндромов обеспечивает возможность формирования вторичной структуры «стержень-петля» зрелой crRNA (CRISPR-RNA) [18]. Спейсерные последовательности уникальны. Около 40 % обнаруженных спейсеров имеют гомологию с известными последовательностями, представленными в GenBank, из них 75 % гомологичны нуклеотидным последователь-



Строение и функционирование CRISPR:

а – строение CRISPR/*cas*-системы; б – клетки, не несущие спейсеров фагового происхождения, погибают при заражении фагом, а клетки, содержащие в CRISPR-локусе соответствующую фагу последовательность (на рисунке отмечена звездочкой), выживают; в – возможная модель работы системы CRISPR [по 28]

ностям бактериофагов и 20 % – плазмид [3]. Часть остальных спейсеров гомологична генам, имеющим внехромосомное происхождение, или расположенным в потенциально перемещенных участках ДНК из неродственных организмов. Однако подавляющее большинство спейсеров не имеют гомологии с известными нуклеотидными последовательностями, и это может говорить об огромном разнообразии бактериофагов в природе [3].

На 5'-конце CRISPR граничат с АТ-богатыми участками, получившими название лидерной последовательности длиной до 550 п.н. [28]. Лидерные последовательности могут служить промоторами для транскрипции множества CRISPR [10]. Также считается, что эта последовательность участвует во встраивании новых спейсеров [1].

Вблизи CRISPR были обнаружены последовательности, получившие название *cas* генов (от CRISPR-associated genes) (рисунок, а). Детальный биоинформативный анализ белков, биосинтез которых кодируют *cas* гены, показал их принадлежность к 25 различным семействам [10, 16, 21], но общим для них является содержание РНК- или ДНК-связывающих доменов, типичных для нуклеаз, хеликаз, полимераз [21]. Молекулярные функции CAS белков были предсказаны на основе анализа их аминокислотных последовательностей [21], эффектов инактивации [1, 4] или структурном сходстве [8]. CRISPR в комбинации с CAS белками формирует систему CASS (от CRISPR associated system) [10, 16]. Наиболее часто встречаются от 2 до 6 *cas* генов, при этом *cas1* является универсальным маркером CRISPR/Cas системы. Белок CAS1 относится к металлозависимым эндонуклеазам ДНК без определенной специфичности к последовательности [31]. CAS2-специфическая эндорибонуклеаза [2]. Ген *cas3* кодирует белок, состоящий из нуклеазного и хеликазного доменов [21]. D.Nan и G.Krauss показана способность нуклеазного домена белка CAS3 у *Sulfolobus solfataricus* к гидролизу двуцепочечных ДНК или РНК [12]. CAS4 является *hcsB*-подобной нуклеазой [20]. Интересным является тот факт, что у нескольких бактерий *cas4* ген объединен с *cas1*, а у других ген *cas2* с *cas3*, что, возможно, свидетельствует о совместной функции белков, кодируемых этими генами [26]. Белки CAS5 и CAS6 относятся к семейству RAMP (repeat associated mysterious protein) с предсказанной возможностью связывания и разрезания РНК [5, 8, 21]. В зависимости от состава генов и последовательностей повторов все системы CRISPR разделяются на 8 подсемейств: Ecoli, Ypest, Nmeni, Aperm, Tnear, Hmani, Mtube, Dvulg [10].

Механизм действия CRISPR/CAS

Молекулярный механизм защиты CRISPR/Cas-системы еще мало изучен. В нем, как правило, выделяют три отдельные стадии: адаптация, или иммунизация, – приобретение коротких последовательностей чужеродных нуклеиновых кислот в качестве новых спейсеров; экспрессия CRISPR – формирование зре-

лых crRNA; интерференция – узнавание чужеродной ДНК/РНК и ее разрушение (рисунок, в) [26].

В работах R.Barrangou *et al.* доказано, что в ответ на инфицирование фагами *Streptococcus thermophilus* приобрел специфическую устойчивость [1]. Резистентность к фагам была обусловлена появлением новых спейсеров в системе CRISPR, которая полностью идентична инфицирующим фагам. Экспериментально показано, что приобретение новых спейсеров осуществляется со стороны лидерной последовательности [19]. Предполагается, что лидерная последовательность содержит сайты связывания CAS белков. Поскольку новые спейсеры внедряются преимущественно в 5'-области системы, CRISPR представляет собой хронологическую запись взаимодействий бактерии с мобильными генетическими элементами [26]. Это свойство CRISPR может быть использовано для типирования, выяснения происхождения и географического распространения штаммов при эпидемиологических исследованиях, так как для штаммов, выделенных на различных территориях, характерны взаимодействия с различными бактериофагами [17, 27, 30].

Процесс распознавания и интеграции новых спейсеров в настоящее время недостаточно изучен. Считается, что важную роль в процессе адаптации играют так называемые мотивы, смежные с прото-спейсером, или PAM (от proto-spacer adjacent motif) [25]. Прото-спейсером называют последовательность в фагах или плаزمиде, гомологичную спейсеру. Предшественники спейсеров выбираются после узнавания PAM. Эти мотивы, характерные для последовательностей фагов и плазмид, отсутствуют в геноме бактерии, что позволяет отличить ДНК хозяина от ДНК чужеродного агента. Мутации в PAM вирусов или плазмид приводят к потере устойчивости бактерий к этим патогенам, несмотря на сохранение последовательности вставки в CRISPR [26]. Однако в CRISPR/Cas-системах, воздействующих на РНК, эти мотивы могут отсутствовать. До сих пор экспериментально не установлено какие *cas* гены участвуют в захвате и встраивании новых спейсеров. Предполагается участие генов *cas1* и *cas4* в этих процессах [25]. Кроме того, инактивация гена *cas7* приводит к потере бактериями способности приобретать новые спейсеры [13].

Экспрессия системы CRISPR выражается в транскрипции предшественника crRNA (pre-crRNA), которая далее подвергается процессу «созревания» и превращения в crRNAs, которые служат регуляторными последовательностями.

Транскрипция CRISPR начинается с лидерной последовательности и содержит все повторы и спейсеры этой CRISPR-структуры, так называемая pre-crRNA (от poly-spacer precursor crRNA). Далее происходит связывание pre-crRNA с комплексом CAS белков Cascade (от Cas-complex for anti-virus defense). Нуклеазы этого комплекса Cascade (предположительно CAS2) разрезают транскрипт на зрелые

сrRNA. Зрелые сrRNA длиной 39–45 нуклеотидов, содержат одну последовательность спейсера, а также 8–9 нуклеотидов повтора на 5'-конце, и более гетерогенный фрагмент части повтора на 3'-конце [11, 21]. Эти части повторов необходимы для формирования структуры стержень-петля. Кроме того, фланкирующие повторы играют важнейшую роль в способности отличать чужеродную от собственной ДНК [22].

Интерференция чужеродной ДНК или РНК обеспечивается за счет взаимодействия сrRNA и комплекса Cascade, сrRNA комплементарно узнают последовательность протоспейсера, а CAS белки обеспечивают ее разрушение. Проведенные эксперименты по получению мутантных бактерий с различным содержанием CAS белков позволили предположить ключевую роль белка CAS3, так как введение в геном этого гена заметно уменьшало чувствительность бактерий к фагам [4].

Важным остается вопрос, почему не происходит разрезание непосредственно самой системы CRISPR, несмотря на комплементарность последовательности. Последние исследования показали, что важную роль в этом играет часть повтора, фланкирующая 5'-конец сrRNA. При этом решающую роль играет наличие или отсутствие комплементарности ключевых нуклеотидов их участков. Если участок не комплементарен, что наблюдается для последовательностей чужеродных агентов, нуклеиновая кислота подвергается разрушению. В случае комплементарности с ДНК хозяина, части повторов имеют полное соответствие, поэтому разрезание не происходит [22].

CRISPR у возбудителей особо опасных инфекций

Как отмечалось выше, CRISPR обнаружены в геномах практически половины известных видов бактерий. Для нас, в первую очередь, интересна распространенность CRISPR-структур среди возбудителей особо опасных инфекций. Согласно данным, представленным в CRISPRdb [9], CRISPR-структуры присутствуют в геноме возбудителей чумы, холеры и туляремии (таблица), а у возбудителей сибирской язвы, бруцеллеза и мелиоидоза обнаружены CRISPR-подобные структуры, содержащие несколько повторов и спейсеров, но не связанные с CAS белками. Следует отметить, что в CRISPRdb представлены только штаммы, геномы которых частично или полностью секвенированы и представлены в базе данных GenBank, поскольку поиск CRISPR на данный момент осуществляется в основном с помощью биоинформативных методов.

Наиболее изучены CRISPR у *Yersinia pestis*, в геноме которой обнаружены три таких структуры, причем с одинаковыми последовательностями повторов. Данные по сравнению структуры и организации спейсеров используются при исследовании филогенетических отношений штаммов, поскольку было показано, что наличие идентичных спейсерных последовательностей в аллелях CRISPR указывает на наличие общего предка и не является резуль-

татом независимых событий [7]. Исследованные с помощью MLVA филогенетические связи штаммов *Y. pestis* были подтверждены данными анализа последовательностей CRISPR-локуса [27]. Кроме того, CRISPR-система *Y. pestis* (YPa) часто используется в качестве VNTR-маркера при типировании штаммов чумного микроба [7].

Что касается возбудителя холеры, то CRISPR/Cas-система не выявлена у штаммов *Vibrio cholerae* N16961, M66-2, MJ-1236 эльтор биоваров, но обна-

Наличие CRISPR-системы в геномах возбудителей особо опасных инфекций, представленных в CRISPRdb [9] (с небольшими модификациями)

Вид, штамм	Структуры, подобные CRISPR	CRISPR
<i>Bacillus anthracis</i> str. Ames Ancestor	2	-
<i>Bacillus anthracis</i> str. A0248	3	-
<i>Bacillus anthracis</i> str. Ames	2	-
<i>Bacillus anthracis</i> str. CDC	1	-
<i>Bacillus anthracis</i> str. Sterne	2	-
<i>Brucella abortus</i> biovar 1 str. 9-941	-	-
<i>Brucella abortus</i> S19	-	-
<i>Brucella melitensis</i> biovar <i>Abortus</i> 2308	-	-
<i>Brucella melitensis</i> 16M	1	-
<i>Brucella melitensis</i> ATCC 23457	1	-
<i>Brucella suis</i> 1330	-	-
<i>Brucella suis</i> ATCC 23445	-	-
<i>Burkholderia mallei</i> ATCC 23344	-	-
<i>Burkholderia mallei</i> NCTC 10229	-	-
<i>Burkholderia mallei</i> NCTC 10247	-	-
<i>Burkholderia mallei</i> SAVP1	-	-
<i>Burkholderia pseudomallei</i> MSHR346	-	-
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 668	-	-
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106a	1	-
<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1710b	1	-
<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243	3	-
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> FSC 198	-	-
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> SCHU S4	-	-
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> WY96-3418	-	-
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>novicida</i> U112	2	2
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> FTA	-	-
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> OSU18	-	-
<i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>mediasiatica</i> FSC147	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> biovar <i>eltor</i> M66-2	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> biovar <i>eltor</i> (Mozambique) MJ-1236	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> O1 biovar <i>eltor</i> str. N16961	-	-
<i>Vibrio cholerae</i> O1 classic O395	-	1
<i>Yersinia pestis</i> Antiqua	1	3
<i>Yersinia pestis</i> biovar <i>Microtus</i> str. 91001	-	2
<i>Yersinia pestis</i> CO92	-	3
<i>Yersinia pestis</i> KIM	1	3
<i>Yersinia pestis</i> Nepal516	-	3
<i>Yersinia pestis</i> Pestoides F	-	3

ружена у *V. cholerae* O395 классического биовара. CRISPR у этого штамма расположена на второй хромосоме и состоит из 40 повторов и 39 уникальных спейсеров. Длина последовательностей повторов равна 28 п.н. Они имеют высокую степень гомологии с последовательностями повторов некоторых других бактерий (*Klebsiella pneumoniae*, *Clostridium tepidum*). Перед областью CRISPR в геноме *V. cholerae* O395 расположены восемь *cas* генов (*cas1*, *cas2*, *cas3*) и пять подтип-специфичных генов *Escherichia coli* (*cse1*, *cse2*, *cse3*, *cse4*, *cse5e*) [6].

В заключение хотелось бы подчеркнуть, что как широкое распространение CRISPR-системы во многих бактериях и археях, так и их огромное разнообразие указывает на то, что она может быть одной из самых древних «антивирусных» оборонных систем в микробном мире. И, несмотря на огромное количество вопросов, касающихся механизма действия этой системы и роли различных CAS белков, которые все еще остаются без ответа, уже сейчас очевиден прикладной аспект использования системы CRISPR. Так, эти структуры уже широко применяются для типирования штаммов *Y. pestis*. Это говорит о том, что обнаружение и изучение распространенности CRISPR-систем у других возбудителей особо опасных инфекций на большой выборке штаммов также может открыть возможность использования CRISPR в типировании и выяснении географического происхождения штаммов. Кроме того, дальнейшее изучение структуры и функций CRISPR позволит определить возможность их использования для ограничения распространения нежелательных мобильных генетических элементов при проведении генно-инженерных работ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*. 2007; 315(5819):1709–12.
2. Beloglazova N., Brown G., Zimmerman M. et al. A novel family of sequence-specific endoribonucleases associated with the clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *J. Biol. Chem.* 2008; 283(29):20361–71.
3. Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S.D. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*. 2005; 151:2551–61.
4. Brouns S.J.J., Jore M.M., Lundgren M., Westa E.R., Slijkhuys R.J.H., Snijders A.P.L. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*. 2008; 321(5891):960–4.
5. Carte J., Wang R., Li H., Terns R.M., Terns M.P. Cas6 is an endoribonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes Dev.* 2008; 22(24):3489–96.
6. Chakraborty S., Waise T.M.Z., Hassan F., Kabir Y., Smith M.A., Arif M. Assessment of the evolutionary origin and possibility of CRISPR-Cas (CASS) mediated RNA interference pathway in *Vibrio cholerae* O395. *In Silico Biology*. 2009; 9(4):245–54.
7. Cui Y., Li Y., Gorge O., Platonov M. E., Yan Y., Guo Z. et al. Insight into microevolution of *Yersinia pestis* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *PLoS ONE*. 2008; 3(7):e2652
8. Ebihara A., Yao M., Masui R., Tanaka I., Yokoyama S., Kuramitsu S. Crystal structure of hypothetical protein TTHB192 from *Thermus thermophilus* HB8 reveals a new protein family with an RNA recognition motif-like domain. *Protein. Sci.* 2006; 15:1494–9.
9. Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics* 2007; 8:172.
10. Haft D.H., Selengut J., Mongodin E.F., Nelson K.E. A guild of 45 CRISPR-associated (CAS) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput.*

Biol. 2005; 1(6):e60.

11. Hale C.R., Zhao P., Olson S., Duff M.O., Graveley B.R., Wells L. et al. RNA-guided RNA cleavage by a CRISPR RNA-Cas protein complex. *Cell*. 2009; 139(5):945–56.
12. Han D., Krauss G. Characterisation of the endonuclease SSO2001 from *Sulfolobus solfataricus* P2. *FEBS Lett.* 2009; 583:771–6.
13. Horvath P., Coute-Monvoisin A.C., Romero D.A., Boyaval P., Fremaux C., Barrangou R. Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *Int. J. Food. Microbiol.* 2009; 1(131):62–70.
14. Hsia K.C., Li C.L., Yuan H.S. Structural and functional insight into sugar-nonspecific nucleases in host defense. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005; 15(1):126–34.
15. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 1987; 169:5429–33.
16. Jansen R., Embden van J.D.A., Gastra W., Schouls L.M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 2002; 43(6):1565–75.
17. Kamerbeek J., Schouls L., Kolk A., van Agterveld M., van Soolingen D., Kuijper S. et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35:907–14.
18. Kunin V., Sorek R., Hugenholtz P. Evolutionary conservation of sequence and secondary structures in CRISPR repeats. *Genome Biol.* 2007; 8:R61.
19. Lillestøl R.K., Redder P., Garrett R.A., Brügger K. A putative viral defence mechanism in archaeal cells. *Archaea*. 2006; 2:59–72.
20. Makarova K.S., Aravind L., Grishin N.V., Rogosin I.B., Koonin E.V. A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucl. Acid Res.* 2002; 30:482–96.
21. Makarova K.S., Grishin N.V., Shabalina S.A., Wolf Y.I., Koonin E.V. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology direct*. 2006; 1:7.
22. Maraffini L., Sontheimer E.J. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature*. 2010; 463(1):568–72.
23. Mojica F.J., Diez-Villasenor C., Soria E., Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol. Microbiol.* 2000; 36:244–6.
24. Mojica F.J., Diez-Villasenor C., Garcia-Martinez J., Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* 2005; 60:174–82.
25. Mojica F.J., Diez-Villasenor C., Garcia-Martinez J., Almedros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defense system. *Microbiology*. 2009; 155(3):733–40.
26. Oost van der J., Jore M.M., Westa E.R., Lundgren M., Brouns S.J.J. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends in Biochemical Sciences*. 2009; 34(8): 401–7.
27. Pourcel C., Salvignol G., Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology*. 2005; 151(3):653–63.
28. Sorek R, Kunin V., Hungenholtz P. CRISPR – a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archae. *Nat. Rev. Microbiol.* 2008; 3(6):181–6.
29. Sturino J.M., Klaenhammer T.R. Engineered bacteriophage-defence systems in bioprocessing. 2006; 4:395–404.
30. Vergnaud G., Li Y., Gorge O., Song Y., Zhou D., Grissa I. et al. Analysis of the three *Yersinia pestis* CRISPR loci provides new tools for the investigation of ancient DNA. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007; 603:327–38.
31. Wiedenheft B., Zhou K., Jinek M., Coyle S., Ma W., Doudna J.A. Structural basis for DNase activity of a conserved protein implicated in CRISPR-mediated genome defense. *Structure*. 2009;17(10):904–12.

Authors:

Shashkova A.V., Goryaev A.A., Smirnova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Шапкова А.В., Горяев А.А., Смирнова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 13.04.10.

С.А.Бугоркова, Т.В.Бугоркова, В.В.Кутырев

ПРИНЦИПЫ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ ПРОТИВОХОЛЕРНЫХ ВАКЦИН*ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

Разработан алгоритм оценки качества противохолерных вакцин, базирующийся на возможности применения методов количественного учета формализованных признаков, характеризующих патологический или адаптивный процесс в кишечнике иммунизированных лабораторных животных. В качестве формализованных признаков отобраны показатели: количество межэпителиальных лимфоцитов (МЭЛ), морфофункциональное состояние апудоцитов и бокаловидных клеток. Для взаимосвязанной оценки отдельных звеньев гомеостаза, морфометрические параметры представлены в виде ассоциаций показателей в форме индексов и коэффициентов. Установлено, что если определяемые показатели не выходят за определенные у соответствующих контролей пределы, то состояние адаптации организма и изменения, описываемые при гистологическом исследовании, рассматриваются как доброкачественные, характеризующие безвредность или эффективность испытуемых противохолерных вакцин.

Ключевые слова: холерные вакцины, морфометрические параметры.

S.A.Bugorkova, T.V.Bugorkova, V.V.Kutyrev

Principles of Quantitative Morphometric Assessment of Cholera Vaccines Safety*Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov*

Worked out is the algorithm of cholera vaccines quality based on application of the methods of quantitative registration of formalized parameters which characterize pathologic and adaptive processes in the intestine of the immunized laboratory animals. The following parameters were selected as formalized ones: quantity of interepithelial lymphocytes, morpho-functional condition of apudocytes and scyphiform cells. Morphometric parameters are presented as associations of indicators in the form of indices and coefficients in order to carry out interrelated assessment of separate parts of homeostasis. It was determined that in case the assessed parameters were in the limits identified in corresponding controls, adaptation condition of the organism and alterations described in histological assay were considered as benign and characterized safety or efficiency of tested cholera vaccines.

Key words: cholera vaccines, morphometric parameters.

Разработка эффективных противохолерных вакцин продолжает оставаться актуальной научной проблемой [6, 13]. Создание новых и усовершенствование уже имеющихся вакцин для профилактики холеры тесно связано с формированием современной методологии оценки их качества. Принципы количественных морфологических исследований реакций макроорганизма на вакцинный препарат разрабатываются с учетом возможности применения аппаратно-программного компьютерного обеспечения и формируются на основе внедрения в схему традиционного морфологического исследования целого ряда современных методов (гистохимического, иммуногистохимического, морфометрического и морфофункционального анализа), объединенных системным подходом к оценке выявляемых изменений [2, 3].

В существующих нормативных документах [11] основной принцип характеристики вакцин при проведении морфологического исследования заключается в верификации тканевых изменений, без учета количественной оценки их степени выраженности. Такой подход в определенной степени нивелирует связь конкретных изменений с функциональными расстройствами отдельных систем, участвующих в реализации защиты организма и нуждается в совершенствовании [7].

Известно, что процессы клеточного обновления эпителиоцитов [13], изменение активности бокаловидных клеток [4] и соотношения элементов гистиоцитарного барьера и эффекторной зоны иммунной системы ЖКТ [9] лежат в основе формирования адаптационно-компенсаторных реакций макроорганизма.

Цель работы заключалась в разработке единого алгоритма оценки качества противохолерных вакцин, базирующегося на возможности применения методов количественного учета формализованных признаков, характеризующих патологический или адаптивный процесс в кишечнике иммунизированных лабораторных животных.

Материалы и методы

Гистологический материал (отрезки кишечника – двенадцатиперстной, подвздошной кишки тонкого и восходящего отдела ободочной кишки толстого) получали от взрослых кроликов и крольчат-сосунков, используемых для оценки безвредности и протективных свойств противохолерных препаратов. Испытуемые образцы: коммерческую хо-

лнерную химическую бивалентную таблетированную вакцину производства РосНИПЧИ «Микроб» (1 человекодоза – 3 таблетки); коммерческую вакцину Cholera-Impstoff (1 человекодоза – $1 \cdot 10^9$ м.к.); препараты «теней клеток» *Vibrio cholerae* O1 eltor – VCG/O1 с пиями адгезии (TCP) и без них; препараты «теней клеток» *V. cholerae* O139 – VCG/O139 с TCP и без них (20 мг); *V. cholerae* KM 182 и KM 184 авирулентных рекомбинантных штаммов (в дозе $5 \cdot 10^9$ м.к.) вводили перорально с помощью зонда. Контрольным животным вводили в качестве плацебо 0,9 % раствор натрия хлорида (интактный контроль) или заражали вирулентными холерными вибрионами O1- (*V. cholerae* P3122, 569 B) и O139- (*V. cholerae* P16064) серогрупп по методу RITARD в дозе $1 \cdot 10^9$ м.к. (контроль заражения). Гистологический материал фиксировали в 10 % водном нейтральном растворе формалина, его обработку выполняли по общепринятой в гистологии схеме [8]. Полученные полутонкие срезы окрашивали гематоксилином и эозином, сочетанной окраской – альциановый синий и Шифф-реактив, импрегнировали серебром по Гримелиусу и по Массону в модификации Гамперля [12]. Готовые препараты просматривали на биологическом микроскопе Olimpus CX 31 с видеокамерой JVC, морфометрическое исследование выполняли с помощью аппаратно-программного комплекса МЕКОС-Ц с приложением денситометрической программы ДММ версия 2.1.0.0.

Количество межэпителиальных лимфоцитов тонкого кишечника и лимфоцитов покровного эпителия толстого кишечника определяли на 1000 ядер энтероцитов при увеличении $\times 200$. Общее количество секретообразующих клеток сосчитывали на 100 ядер эпителиоцитов в 10 повторах при увеличении $\times 200$. Секреторный профиль бокаловидных клеток определяли по количеству клеток, дающих голубую (кислые мукополисахариды – КМПС), красную (нейтральные мукополисахариды – НМПС) или фиолетовую (смешанные формы) окраски, ориентируясь на 100 секреторных клеток в 10 повторах тонкого и толстого кишечника. Количество апудоцитов определяли в 10 полях зрения правильно ориентированных срезов кишечника при увеличении $\times 200$. Морфофункциональное состояние клеток характеризовали по изменению интенсивности окрашивания и зоне распределения продукта секреции в клетке, выявляемых в гистохимических реакциях.

Для взаимосвязанной оценки отдельных звеньев гомеостаза, конкретные морфометрические параметры необходимо было представить в виде ассоциаций показателей в форме различных индексов и коэффициентов, облегчающих процесс сопоставления результатов и выбора оптимального вакцинирующего препарата.

Результаты и обсуждение

Характеристика противохолерного препарата,

проводимая в соответствии с разрабатываемым алгоритмом, направлена на учет отдельных параметров состояния барьерных структур ЖКТ – процессов экссудации, пролиферации и секретообразования, состояния апудоцитов и клеток эффекторной зоны иммунной системы кишечника.

В качестве формализованных признаков были изучены и отобраны следующие показатели: плотность и характер клеточного инфильтрата в собственной пластинке слизистой оболочки кишечника, соотношение в нем различных клеточных популяций, изменение которого характеризует вредное действие исследуемого агента; количество одноклеточных секреторных желез – бокаловидных клеток, состав их секрета, содержащего углеводно-белковые комплексы, играющие защитную роль; количество МЭЛ, клеток, способных активно покидать эпителий и возвращаться назад в собственную пластинку слизистой оболочки кишечника, косвенно влияя на механизмы регенерации и дифференцировки эпителиальных клеток, стимуляцию слизееобразования бокаловидными клетками, снижая возможность адгезии микроорганизмов и их токсинов к поверхности энтероцитов; количество и морфофункциональное состояние апудоцитов как неспецифических регуляторов иммунологических процессов в ЖКТ.

По результатам экспериментальных данных наиболее информативными для оценки качества противохолерных вакцин были признаны изменения состояния 3 групп клеточных элементов: МЭЛ, апудоцитов, бокаловидных клеток. Поэтому для характеристики степени выраженности антигенного воздействия на кишечник подопытных животных нами предложен расчет индекса регенеративной активности эпителия (ИР):

$$ИР = \frac{\text{среднее количество МЭЛ на 1000 ядер эпителиоцитов (опыт, контроль)}}{\text{среднее количество МЭЛ на 1000 ядер эпителиоцитов}}$$

Факт обнаружения апудоцитов с различной степенью интенсивности окраски клеток при постановке гистохимических реакций серебрения (состояния гистохимической активности или опустошения) указывает на то, что в этих клетках постоянно идет синтез биологически активных веществ и их выделение. При срыве компенсаторных возможностей функциональных систем макроорганизма процессы синтеза биологически активных веществ и их выделение в апудоцитах идут несинхронно, что приводит либо к усиленному опустошению клеток, либо к повышенному накоплению продуктов секреции в них. Морфофункциональное состояние апудоцитов у подопытных животных наглядно характеризовал введенный нами показатель – индекс активности апудоцитов (Иап), вычисляемый по формуле:

$$Иап = \frac{\% \text{ опустошен. апудоцитов} + \% \text{ гистохимически активных апудоцитов}}{\% \text{ клеток в состоянии функционального покоя}}$$

В то же время предложенный коэффициент активности апудоцитов (КА) позволял сравнивать со-

стояние этих клеток в опытной группе по отношению к контролю.

$$KA = \frac{I_{an}}{I_{an}} \text{ (опыт, контроль)}.$$

Активность бокаловидных клеток оценивали по изменению вида секрета в них. В норме основной пул бокаловидных клеток ЖКТ подопытных животных представлен зрелыми формами, содержащими смешанный продукт секреции, клетки с КМПС («стареющие») и с НМПС («юные») встречаются в небольшом количестве [4].

Изменение соотношения количества бокаловидных клеток с различным секретом отражает процессы обновления слизи в них [5]. Морфофункциональное состояние бокаловидных клеток у подопытных животных, определяемое нами по отношению клеток, содержащих КМПС к сумме клеток, содержащих НМПС и смешанный продукт реакции, характеризовал индекс секреторной активности (*Ica*):

$$Ica = \frac{\% \text{ КМПС}}{\% \text{ НМПС} + \% \text{ смешанных форм}}.$$

Применение которого позволило оценить процессы обновления слизи в секреторных клетках ЖКТ и сравнить характер изменения этого показателя в опытных и контрольных группах за счет введения коэффициента секреторной активности (*KC*), вычисляемого по формуле:

$$KC = \frac{Ica}{Ica} \text{ (опыт, контроль)}.$$

Для получения сопоставимых результатов состояние клеточных элементов оценивали в трех отделах ЖКТ, выбор которых был обусловлен знаниями о неравнозначной роли различных участков кишечника и связан с анатомо-физиологическими особенностями его у биомоделей. Так, двенадцатиперстная кишка является основным звеном для выполнения секреторной, моторной и пищеварительной функции ЖКТ, в ней сосредоточено максимальное количество желез (бруннеровы железы), секретирующих НМПС и нейроэндокринных клеток с различной направленностью продукции БАВ. Здесь же активно идет процесс всасывания не только белков, углеводов и жиров, но и токсических субстанций. В этом отделе кишечника наиболее выраженная и адекватная реакция МЭЛ [4].

В подвздошном отделе кишечника сосредоточено максимальное количество лимфоидных скоплений и специальных образований – пейеровых бляшек, являющихся индуктивной зоной иммунной системы ЖКТ, в тесной связи с которой находится эффекторная зона, представленная МЭЛ. В этом отделе кишечника активно идет процесс резорбции поступивших веществ, в том числе токсических субстанций, и развивается основной патологический симптомокомплекс любой экспериментальной кишечной инфекции.

Восходящий отдел ободочной кишки отличается особой реакцией клеток APUD-системы, дегрануляция апудоцитов здесь начинается уже через 6 ч после поступления антигенного материала и продолжается до суток, в то время как реакция апудоцитов в дистальных отделах задерживается во времени и у конвенциональных животных в большей степени зависит от изменения состава мукозального микробного окружения.

Вторым сложным вопросом является выбор адекватного контроля. Был проанализирован значительный объем морфологического материала от интактных взрослых кроликов и крольчат-сосунков. Это позволило получить сведения о морфометрических характеристиках, отражающих функциональное состояние различных клеточных элементов в состоянии относительного функционального покоя организма экспериментального животного. Таким образом, были охарактеризованы интактные контроли. Затем был проведен отбор ряда штаммов вирулентных культур холерных вибрионов обоих сероваров, выбрана оптимальная заражающая доза, необходимая для воспроизведения полного симптомокомплекса экспериментальной холерной инфекции методом RITARD. Собранный морфологический материал подвергли тщательному морфометрическому анализу. Так были охарактеризованы контроли заражения.

Оценку качества противохолерных вакцин проводили на основании сравнения учитываемых морфометрических параметров у биомоделей опытных и контрольных групп по разработанным индексам и коэффициентам.

О безвредности препарата судили по изменению величин индексов и коэффициентов, определяемых по отношению данных, полученных при морфометрическом анализе опытных образцов к интактному контролю. Препарат считали безвредным при отклонении показателя от единицы не более чем на 0,5.

Эффективность местной защиты при иммунизации противохолерными вакцинами оценивали по изменению величин индексов и коэффициентов, определяемых по отношению данных, полученных при морфометрическом анализе образцов контроля заражения к опытным. Считая коэффициенты *KA* и *KC* больше 1,5 и индекса *IP* меньше или равным 1 достаточной степенью защиты от патогена (таблица). Из представленных данных следует, что коммерческие вакцины производства РосНИПЧИ «Микроб» и Cholera Impstoff по оцениваемым критериям показали высокую эффективность защиты подопытных животных, в то время как представленные экспериментальные серии препаратов отличались друг от друга и от коммерческих вакцин по учитываемым показателям, что свидетельствует о необходимости их дальнейшего совершенствования.

Таким образом, проведенное исследование показало, что если определяемые показатели не выходят за указанные пределы у соответствующих контролей, то состояние адаптации организма и изменения, опи-

Результаты оценки качества коммерческих и экспериментальных препаратов для специфической профилактики холеры по разработанным показателям

Название препарата	Схема иммунизации	Доза препарата	Заражение на 14-е сутки после окончания иммунизации	Показатели								
				Двенадцатиперстная кишка			Подвздошный отдел тонкого кишечника			Восходящий отдел ободочной кишки		
				КА	КС	ИР	КА	КС	ИР	КА	КС	ИР
Коммерческая вакцина РосНИПЧИ «Микроб»	<i>Per os</i> однократно	1 ч/д	<i>V. cholera</i> O1	5,36	8,67	0,94	2,98	4,79	0,73	5,80	12,74	0,75
Коммерческая вакцина Cholera-Impstoff	«	«	«	4,69	13,88	0,84	3,59	5,10	0,83	4,50	6,56	0,71
<i>V. cholera</i> KM 184	«	5·10 ⁹ м.к.	«	1,78	46	0,70	3,24	16,63	0,73	7,04	44,3	0,75
<i>V. cholera</i> KM 184	«	«	–	0,96	0,92	1,37	0,85	1,12	1,04	1,27	0,63	0,57
VCG/O1+TCP	<i>Per os</i> двукратно	20 мг	<i>V. cholera</i> O1	4,69	19,69	1,21	3,11	4,96	0,83	3,0	7,64	0,52
VCG/O1-TCP	«	«	«	3,07	8,56	1,16	3,37	3,69	1,25	3,78	3,12	0,81
VCG/O139+TCP	«	«	<i>V. cholera</i> O139	4,28	75,67	1,27	4,95	57,7	1,68	3,74	62,8	0,90
VCG/O139-TCP	«	«	«	6,27	23,88	1,27	2,47	23,02	1,62	6,44	16,24	0,89
<i>V. cholera</i> KM 182	«	5·10 ⁹ м.к.	«	3,75	136	1,41	1,85	28,2	1,19	1,44	42,7	1,07
<i>V. cholera</i> KM 182	«	«	–	0,92	0,42	0,95	1,57	0,97	0,99	1,49	0,42	0,92

сываемые при обзорном гистологическом исследовании, рассматриваются как доброкачественные, характеризующие безвредность или эффективность испытуемых противохолерных вакцин. Предложенный способ характеристики качества противохолерных вакцин в значительной мере повышает информативность, обеспечивает объективность доклинических исследований новых препаратов и может служить основой для дальнейшего совершенствования принципов оценки их безопасности и эффективности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бугоркова С.А., Кутырев В.В., Бугоркова Т.В., Куличенко А.Н. Способ оценки качества вакцинных препаратов против холеры: Патент РФ 2301075. Опубл. 20.06.07 Бюл. № 17.
2. Бугоркова С.А., Задумина С.Ю., Бугоркова Т.В., Лоцманова Е.Ю., Крайцов А.Л., Шуковская Т.Н., Кутырев В.В. Комплексный морфологический подход к оценке протективных свойств препаратов для специфической профилактики холеры. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2008; 1:31–4.
3. Витязева С.А., Старовойтова Т.П., Дубровина В.И., Медведева С.А., Грищенко Л.А., Шкаруба Т.Т. Морфологические изменения в иммунокомпетентных органах животных в динамике вакцинального процесса, вызванного живой чумной вакциной с иммуномодуляторами. Пробл. особо опасных инф. 2008; 3(97):50–3.
4. Голофеевский В.Ю. Введение в клиническую морфологию желудка и двенадцатиперстной кишки. СПб: ФОЛИАНТ; 2005. 109 с.
5. Ипатов Ю.П., Комарова Л.Г., Переслегина И.А., Шабунина Е.И. Ключи к проблеме гастроэнтерологических заболеваний у детей. Н.Новгород; 1997. 217 с.
6. Кутырев В.В., Девдариани З.Л., Саяпина Л.В. Современное состояние научных исследований в области вакцинопрофилактики особо опасных бактериальных инфекций. Пробл. особо опасных инф. 2006; 2(92):18–24.
7. Медуницын Н.В. Вакцинология. М.: Триада-Х; 2004. 448 с.
8. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. М.: Медицина; 1969. 423 с.
9. Першин Б.Б., Гелиев А.Б., Толстов Д.В., Ковальчук Л.В. Система лимфоцитов ткани пищеварительного тракта животных и перорально индуцированная иммунная толерантность. Иммунология. 2001; 6:10–19.
10. Полевщиков А.В. Методологические аспекты современной иммунологии. Рос. биомед. журн. 2004; 3:17–20.
11. Санитарные правила «Государственные испытания и регистрация новых медицинских иммунобиологических препаратов» СП 3.3.2.561-96. М.: Информ. издат. центр Минздрава

- России; 1996. 127 с.
12. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника: руководство. М.: Медицина; 1996. 478 с.
13. Kabir S. Cholera vaccines: the current status and problems. Rev. Med. Microbiol. 2005; 16: 101–16.
14. Wright N.A. Aspects of the biology of regeneration and repair in the human gastrointestinal tract. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1998; 353(1370):925–33.

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

1. Bugorkova S.A., Bugorkova T.V., Kutyrev V.V., Kulichenko A.N. [Method of assessment of quality of vaccine preparations against cholera]. RF Patent 2301075. 2007 June 20.
2. Bugorkova S.A., Zadumina S.Yu., Bugorkova T.V., Lotsmanova E.Yu., Kravtsov A.L., Shchukovskaya T.N., Kutyrev V.V. [Complex morphological approach to assessment of protective properties of preparations for cholera specific prophylaxis]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2008; 1:31–4.
3. Vityazeva S.A., Starovoiitova T.P., Dubrovina V.I., Medvedeva S.A., Grischenko L.A., Shkaruba T.T. [Morphological alterations in immunocompetent organs of animals in dynamics of vaccinal process caused by live plague vaccine with immunomodulators]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2008; 3(97):50–3.
4. Golofeevskii V.Yu. [Introduction in Clinical Morphology of Stomach and Duodenum]. SPb.: FOLIANT; 2005. 109 p.
5. Ipatov Yu.P., Komarova L.G., Pereslegina I.A., Shabunina E.I. [The Keys to the Problem of Gastrointestinal Diseases in Children]. N.Novgorod; 1997. 217 p.
6. Kutyrev V.V., Devdariani Z.L., Sayapina L.V. [Present status of the researches in the sphere of vaccine prophylaxis of particularly dangerous bacterial infections]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2006; 2(92):18–24.
7. Medunitsyn N.V. [Vaccinology]. M.: Triada-X; 2004. 448 p.
8. Merkulov G.A. [Course of Pathologistologic Techniques]. M.: Meditsina; 1969. 423 p.
9. Pershin B.B., Geliev A.B., Tolstov D.B., Kovalchuk L.V. [Lymphocyte system of the animal digestive tract tissue and immune tolerance induced per os]. Immunologia. 2001; 6:10–19.
10. Polevshchikov A.V. [Methodological aspects of modern immunology]. Ros. Biomed. Zh. 2004; 3:17–20.
11. [Sanitary Regulations “State Trials and Registration of New Medical Immunobiological Preparations” SR 3.3.2.561-96]. M.: Minzrav RF; 1996. 127 p.
12. Sarkisov D.S., Perov Yu.L. [Microscopy Technique: Manual]. M.: Meditsina; 1996. 478 p.

Authors:

Bugorkova S.A., Bugorkova T.V., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

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

Поступила 10.03.10.

В.И.Дубровина, Ж.А.Коновалова, В.Б.Николаев, В.В.Войткова, С.А.Татарников, А.В.Мазепа,
Е.Ю.Марков, Ю.О.Попова, О.В.Юрьева

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА РАЗНЫХ ПОДВИДОВ НА МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ФАГОЦИТОВ *IN VITRO*

ФГУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»

Получены экспериментальные препараты липополисахарида (ЛПС) *Francisella tularensis* четырех подвидов: *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida* методом твин-экстракции. Дана физико-химическая характеристика полученных препаратов. Изучено влияние ЛПС возбудителя туляремии разных подвидов на фагоцитарное звено иммунитета экспериментальных животных в условиях *in vitro*. Показано, что биомолекулы ЛПС проявляют слабое стимулирующее воздействие на кислород- и нитроксидзависимые бактерицидные системы и не обладают цитопатогенетическим свойством для активации апоптоза фагоцитов. Полученные результаты позволяют предположить, что такая инертность ЛПС возбудителя туляремии обусловлена особенностями его строения.

Ключевые слова: возбудитель туляремии, липополисахарид, фагоциты.

V.I.Dubrovina, Zh.A.Konvalova, V.B.Nikolaev, V.V.Voitkova, S.A.Tatarnikov, A.V.Mazepa, E.Yu.Markov,
Yu.O.Popova, O.V.Yur'eva

Peculiarities of the Effect of the Lipopolysaccharide of Tularemia Microbe of Different Subspecies upon Metabolic Activity of Phagocytes *in Vitro*

Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East

Experimental preparations of the lipopolysaccharide (LPS) of *Francisella tularensis* of four subspecies (*tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida*) were obtained using Tween extraction method. Physical and chemical characteristics of the obtained preparations are presented. Examined was the effect of tularemia agent of different subspecies upon the phagocytic part of the experimental animals' immunity *in vitro*. LPS biomolecules demonstrated weak stimulating effect upon oxygen- and nitroxide-dependent bactericidal systems and lacked cytopathogenicity for phagocytes apoptosis activation. The obtained results suggest that such inactivity of tularemia agent LPS is associated with its structural peculiarities.

Key words: tularemia agent, lipopolysaccharide, phagocytes.

Несмотря на то, что липополисахарид туляремийного микроба не является типичным провоспалительным эндотоксином [9], тем не менее, биомолекула ЛПС рассматривается как один из основных факторов патогенности возбудителя туляремии. Однако для реализации токсических свойств необходимо представление ЛПС *in vivo* живыми бактериальными клетками типичных природных штаммов возбудителя. Возможно, что только живая клетка, преодолевая барьеры макроорганизма, обеспечивает доставку ЛПС в функционально-активном состоянии к мишеням, необходимым для проявления его максимально токсического действия [3, 4]. В настоящее время некоторые исследователи полагают, что О-антигеном возбудителя туляремии является не липополисахарид, как у энтеробактерий, а липоолигосахарид (ЛОС). В отличие от S-ЛПС – полноценных протективных иммуногенов, ЛОС – непротективны или малопротективны, что, вероятно, облегчает выживание возбудителя в макроорганизме [7]. Известно, что ЛПС туляремийного микроба относится к консервативным (неспецифическим, невариабельным) патоген-ассоциированным молекулярным структурам, которые оказывают множественные эффекты на сигналы, генерируемые клетками врожденной иммунной системы [1]. К настоящему времени малоизученным остается вопрос влияния ЛПС на

бактерицидные факторы иммунитета, а именно кислородзависимые цитотоксические механизмы фагоцитов, поскольку именно они играют главную роль в процессе деградации объекта фагоцитоза. Особую актуальность при изучении патогенеза туляремии приобретают исследования механизмов клеточной адаптации, в частности оценка апоптоза клеток иммунофагоцитарной системы.

Целью работы явилось изучение влияния препаратов ЛПС туляремийного микроба разных подвидов на функциональное состояние клеток иммунофагоцитарной системы в условиях *in vitro*.

Материалы и методы

В работе использовали музейные (ФГУЗ «ИркутскНИПЧИ Сибири и ДВ») штаммы *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* Schu 11; *F. tularensis* subsp. *holarctica* И-250; *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* А-120; *F. tularensis* subsp. *novicida* F 6168. ЛПС выделяли из бактериальной массы твин-экстракцией. Культуру выращивали в течение 2 сут на среде Анциферова при 37 °С, смывали стерильным 0,9 % раствором натрия хлорида (рН 7,2) и приготавливали суспензию в концентрации 20·10⁹ м.к. по ОСО мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича. К полученной микробной взвеси стерильно добавляли неионный детергент Твин-80

(«Serva») до конечной концентрации 1 %, выдерживали 2 ч при 37 °С. Полученную суспензию прогревали на водяной бане 10 мин при 90 °С, периодически перемешивая. Полученную микробную массу проверяли на стерильность и, при отсутствии специфического роста, центрифугировали при 10000 g в течение 30 мин для освобождения от дебриса. Супернатант подвергали ультрацентрифугированию при 105000 g 2 ч при 4 °С «Spinko L2-65B» («Bekman»). Образовавшийся осадок ресуспендировали в минимальном количестве дистиллированной воды и лиофильно высушивали. Полученный препарат растворяли в 0,01 М аммоний-бикарбонатном буфере (рН 8,5), содержащем 0,2 % додецилсульфата натрия и хроматографировали образец на колонке с Сефакрилом-С 300 («Pharmacia»), уравновешенной 0,01 М аммоний-бикарбонатным буфером (рН 8,5), содержащим 0,1 % додецилсульфата натрия. Препарат элюировали этим же буфером и собирали во фракции объемом 2 мл. Фракции, содержащие первый пик, объединяли и диализовали в течение суток против проточной воды. Содержащийся препарат преципитировали добавлением десяти объемов охлажденного этанола в течение суток на холоде и осаждали центрифугированием при 6000 об./мин в течение 40 мин. Осадок растворяли в небольшом объеме дистиллированной воды и лиофильно высушивали.

ЛПС в полученных экспериментальных образцах выявляли колориметрическим методом с использованием карбоцианинового красителя. В полученных экспериментальных препаратах ЛПС определяли содержание нуклеиновых кислот [6], белка [11] и углеводов [2]. Электрофоретический анализ ЛПС проводили в 12,5 % полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия с окрашиванием ионами серебра (ДСН-электрофорез) [10, 12].

ЛПС *Salmonella enteritidis* («Sigma») использовали в качестве типичного S-ЛПС. Острую токсичность полученных препаратов определяли на 85 белых беспородных мышах массой 18–20 г при однократном подкожном введении в дозах 10, 50 и 100 мкг сухого вещества. Учет результатов проводили в течение 7 сут после инокуляции ЛПС.

Материалом для исследования служили перитонеальные макрофаги (ПМ), которые получали общепринятым методом от 253 беспородных (250–300 г) морских свинок, после умерщвления животных в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.) и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (Приложение к приказу МЗ РФ от 19.06.2003 г. № 267). В тесте с трипановым синим [5] количество жизнеспособных клеток составило 96–98 %. ПМ примировали ЛПС в дозе 10 мкг/мл фагоцитов в течение 180 мин при 37 °С с последующим определением активности кислород- (НСТ-тест, НАДФ·Н-оксидаза) и нитроксидзависимого метаболизма (NO-синтаза) [1]. Чувствительность фагоцитов к ЛПС-индуцированному апоптозу изуча-

ли с помощью тест системы Caspase-3 Colorimetric Kit (R&D Systems, Inc.) согласно инструкции производителя. Для подтверждения участия каспазы-3 в индукции апоптоза иммуноцитов использовали ингибитор этого фермента Z-VAD-FMK (R&D Systems, Inc.) в концентрации 100 мкМ. Контролем служили интактные клетки. Результаты исследований обрабатывали стандартными статистическими методами. Определяли среднюю арифметическую, среднюю ошибку. Для оценки достоверности различий применяли параметрический двухвыборочный t-тест Стьюдента. Различия считали достоверными при уровне значимости $P < 0,001$.

Результаты и обсуждение

Установлено, что ЛПС грамотрицательных бактерий ответственны за ряд патофизиологических процессов в макроорганизме. Для изучения этих процессов чаще всего используют ЛПС, полученный водно-фенольным методом, способный не только увеличивать выход препарата, а также снижать содержание белка в препарате, но и приводить к частичной деградации ЛПС, что может сказываться на его свойствах. Поэтому для выделения ЛПС из разных подвидов туляремийного микроба был применен метод с использованием неионного детергента [8], позволившего получить ЛПС с минимальным повреждением их нативной структуры. Полученные ЛПС по своим физико-химическим свойствам не отличались от препаратов, выделяемых классическим водно-фенольным способом. Электрофоретический анализ показал характерную для ЛПС гетерогенность, проявляющуюся множественностью полос в виде «лестницы» при окраске геля ионами серебра. При взаимодействии с карбоциановым красителем «Stains all» препараты проявляли характерный для грамотрицательных бактерий метакроматический эффект. Содержание нуклеиновых кислот, белка, углеводов в исследуемых препаратах ЛПС колебалось в пределах 0,4–0,9; 4,7–8,4; 11,4–17,8 % соответственно.

Показано, что препараты ЛПС в дозах 10, 50 и 100 мкг не токсичны для белых мышей, тем не менее, при введении экспериментальным животным 100 мкг ЛПС имело место увеличение размеров селезенки и регионарных (преимущественно паховых) лимфатических узлов (в случае ЛПС туляремийного микроба подвида *tularensis* в 1,5–2,0 раза).

Известно, что активные формы кислорода (АФК) и азота (АФА) являются промежуточными продуктами, которые участвуют в защите хозяина от возбудителя туляремии. Продукция посредников АФК (например, супероксида) зависит от НАДФ·Н-оксидазы фагоцитов. АФА могут образовываться посредством конструктивных синтаз монооксида азота, но высокие уровни АФА продуцируются только после активизации индуцированных форм фермента [9].

Как показали результаты проведенных исследо-

ваний, препараты ЛПС *F. tularensis* обладают слабым стимулирующим воздействием на активность ферментов окислительного взрыва в перитонеальных макрофагах интактных морских свинок. Суммарную активность ферментов дыхательной цепи фагоцитов оценивали в НСТ-тесте, который относится к основным показателям, характеризующим состояние макрофагальной системы. Значения НСТ-теста и показатели активности НАДФ-Н-оксидазы в клетках, стимулированных туляремийными ЛПС, незначительно отличались от контрольных значений (интактные клетки). Материалы, полученные в ходе эксперимента, свидетельствуют о том, что препараты ЛПС туляремийного микроба, независимо от фенотипических свойств, оказывают менее выраженное стимулирующее действие на активность кислородзависимого метаболизма (КЗМ) фагоцитов по сравнению с ЛПС *S. enteritidis*. Показатели НСТ-теста и активности НАДФ-Н-оксидазы у фагоцитов, примированных сальмонеллезным ЛПС были соответственно в 1,2 и 1,6 раза выше чем у аналогичных клеток, стимулированных ЛПС туляремийного микроба ($P < 0,001$). Достоверных различий по степени влияния ЛПС туляремийного микроба разных подвидов на активацию КЗМ у перитонеальных макрофагов не выявлено.

В связи с тем, что NO играет важную роль в регуляции иммунного ответа и реализации бактерицидных свойств макроорганизма, было изучено влияние ЛПС туляремийного микроба разных подвидов на активность NO-синтазы перитонеальных макрофагов. Установлено, что по сравнению с контролем все исследованные препараты ЛПС незначительно повышают продукцию монооксида азота фагоцитами экспериментальных животных. Следует отметить, что среди использованных ЛПС *F. tularensis* достоверных различий по уровню стимуляции активности NO-синтазы не выявлено, однако наибольшим стимулирующим эффектом обладает препарат, полученный из туляремийного микроба подвида *novicida*. Значения концентрации NO_2^- в этом случае были $(37,5 \pm 0,8)$ пг/ 10^6 фагоцитов. Установлено незначительное по сравнению с другими ЛПС снижение активности NOS макрофагов, стимулированных препаратом ЛПС *F. tularensis* Schu 11 $(35,3 \pm 0,6)$ пг/ 10^6 фагоцитов. Наоборот, ЛПС *S. enteritidis* оказался потенциальным стимулятором образования NO_2^- . Показатели активности NO-синтазы перитонеальных макрофагов, примированных сальмонеллезным

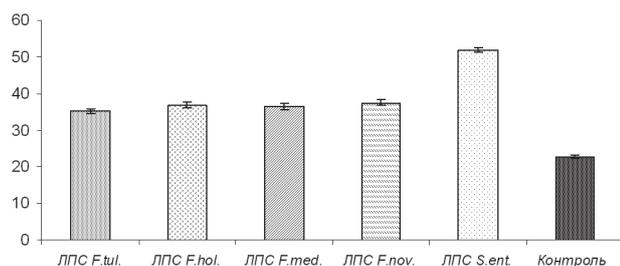


Рис. 1. Функциональная активность NOS (µM NO₂⁻/ 10⁶ фагоцитов)

ЛПС, были в 1,4 раза выше чем у фагоцитов после взаимодействия с ЛПС *F. tularensis* (рис. 1).

Существенных различий в степени воздействия на активность бактерицидных систем фагоцитов между ЛПС туляремийного микроба подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida* не выявлено. Это согласуется с данными литературы о сходстве структуры биоактивного компонента ЛПС (липид А) у указанных выше подвидов [12].

При изучении апоптоза клеток иммунофагочитарной системы особое внимание уделяется эффекторной каспазе-3, так как после ее активации процесс программируемой клеточной гибели считается необратимым. Установлено, что у макрофагов, примированных ЛПС туляремийного микроба разных подвидов, имеется тенденция к активации апоптоза по сравнению с контролем, но различия не были достоверными (рис. 2).

Установлено, что при концентрации 100 мкМ Z-VAD-FMK степень ингибирования апоптоза перитонеальных макрофагов была максимальной и соответствовала показателю активности каспазы-3 в контроле. Результаты сравнительного анализа указывают на достоверные различия между туляремийным и сальмонеллезным ЛПС в степени воздействия на апоптотическую активность фагоцитов. Показано, что активность каспазы-3 иммуноцитов, примированных ЛПС *S. enteritidis*, была выше в 1,3 раза ($P < 0,001$) чем у клеток, инкубированных с ЛПС *F. tularensis*, независимо от подвидовой принадлежности.

Таким образом, препараты ЛПС (в дозе 10 мкг/мл фагоцитов), выделенные твин-экстракцией из штаммов *F. tularensis* подвидов *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica*, *novicida*, являются слабым антигенным стимулом для активации кислород- и нитроксидзависимых бактерицидных механизмов, а также апоптоза клеток млекопитающих по сравнению с ЛПС, выделенным из кишечных бактерий. Вероятно, такая биологическая инертность целесообразна и является специфическим свойством патогенных бактерий [4]. Отсутствие ответа иммунокомпетентных клеток на сигнал ЛПС обеспечивает патогенам на первых этапах взаимодействия с организмом хозяина беспрепятственное преодоление гуморальных и клеточных

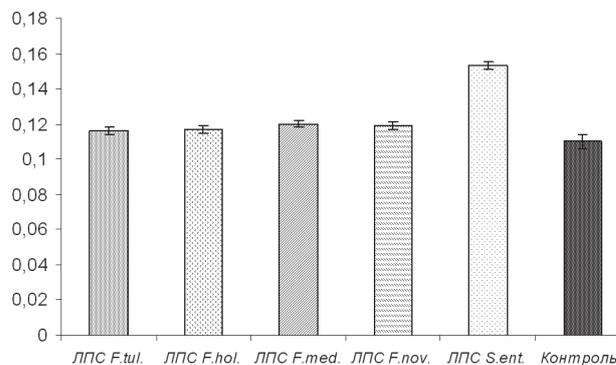


Рис. 2. Функциональная активность каспазы-3 (OD405) перитонеальных макрофагов

барьеров. Выявленные нами отличия в характере воздействия на функциональное состояние клеток иммунофагоцитарной системы туляремийного ЛПС от «классического» эндотоксина бактерий кишечной группы, по-видимому, обусловлены особенностями строения О-антигена *F. tularensis*. Полученные данные по изучению структуры ЛПС туляремийного микроба разных подвидов указывают на необходимость усовершенствования методов получения препаратов ЛПС, способствующих сохранению молекулы ЛПС в состоянии, максимально приближенном к нативному. Результаты сравнительного анализа влияния препаратов ЛПС возбудителя туляремии разных подвидов на метаболическую активность фагоцитов могут способствовать пониманию механизмов иммуно- и патогенеза туляремии и открывают перспективы для дальнейшего изучения структуры липополисахарида возбудителя туляремии разных подвидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ахматова Н.К., Киселевский М.В. Врожденный иммунитет: противоопухолевый и противои инфекционный. М.: Практическая медицина; 2008. 256 с.
2. Герхардт Ф. и др., редакторы. Методы общей бактериологии. М.: Мир; 1984. С. 292–5.
3. Оноприенко Н.Н., Павлович Н.В. Роль липополисахарида в токсичности бактерий рода *Francisella*. Мол. генет. 2003; 3:25–8.
4. Павлович Н.В., Тынянова В.И. Возможные механизмы реализации токсического потенциала липополисахаридов патогенных бактерий. Мол. генет. 2005; 2:9–13.
5. Самсонова М.В., Черняев А.Л. Стандартные цитопрепараты бронхоальвеолярного лаважа в исследовании и патологии легких. Лаборатория. 1997; 6:7–9.
6. Спирин А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот. Биохимия. 1958; 23(5):656–62.
7. Сухарь В.В., Непомнящая Н.Б. Липоолигосахаридный О-антиген *Francisella tularensis*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2009; 5:110–13.
8. Шишкина Л.П., Марков Е.Ю., Меринова Л.В., Суханов

- Н.А. А.с.1692580. Способ получения туляремийного антигена. (СССР). № 4676656/13. Опубл. 23.11.91. Бюл. № 43. 3 с.
9. Hajjar A.M., Harvey M.D., Shaffer S.A., Goodlett D.R., Sjostedt A., Edebro H. et al. Lack of in vitro and in vivo recognition of *Francisella tularensis* subspecies lipopolysaccharide by Toll-like receptors. Infect. Immun. 2006; 74(12):6730–8.
 10. Laemmli U.K., Favre M. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packing events. J. Mol. Biol. 1973; 80:575–99.
 11. Lowry O.H., Rosenbrough N.R., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol. J. Biol. Chem. 1951; 193(1):265–75.
 12. Tsai C.M., Frasch C.E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 1982; 119(1):115–9.

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

1. Akhmatova N.K., Kiselevskii N.V. [Innate Immunity: Anti-Cancer and Anti-Infectious]. M.: Prakt. Med.; 2008. 256 p.
2. Gerkhart F. et al., editors [Methods in General Bacteriology]. M: Mir. 1984.
3. Onoprienko N.N., Pavlovich N.V. [Role of lipopolysaccharide in toxicity of *Francisella* genus bacteria]. Mol. Gen. 2005; 3:25–8.
4. Pavlovich N.V., Tynyanova V.I. [Probable mechanisms of realization of the toxic potential of pathogenic bacteria lipopolysaccharides]. Mol.Gen. 2005; 2: 9–13.
5. Samsonova M.V., Chernyaev A.L. [Standard cytopreparations in examination of lung pathology]. Laboratoria. 1997; 6:7–9.
6. Spirin A.S. [Spectrophotometric determination of the total nucleic acids amount]. Biokhimiya. 1958; 23(5):656–62.
7. Sukhar` V.V., Nepomnyashchaya N.B. [Lipooligoyasaccharide O antigen of *Francisella tularensis*]. Zh. Mikrobiol., Epidemiol. Immunobiol. 2009; 5:110–13.
8. Shishkina L.P., Markov E.Yu., Merinova L.V., Sukhanov N.A. [Method of tularemia antigen obtaining]. USSR Inventor's Certificate 1692580. 23.11.1991.

Authors:

Dubrovina V.I., Konovalova Zh.A., Nikolaev V.B., Voitkova V.V., Tatarnikov S.A., Mazepa A.V., Markov E.Yu., Popova Yu.O., Yur`eva O.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. Trilissera St., 78, Irkutsk, 664047, Russia. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Об авторах:

Дубровина В.И., Коновалова Ж.А., Николаев В.Б., Войткова В.В., Татарников С.А., Мазепа А.В., Марков Е.Ю., Попова Ю.О., Юрьева О.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и ДВ. 664047, Иркутск, ул. Трилисера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Поступила 22.06.10.

УДК 616.932:616-093/-098

Я.А.Кибирев, И.В.Дармов, М.А.Логина, И.В.Маракулин, Д.А.Чухланцев, Т.И.Дормидонтова,
С.Л.Кузнецов, А.В.Кузнецовский

РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ *V. CHOLERAЕ* С ПОМОЩЬЮ VNTR-АНАЛИЗА

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

Для типирования штаммов *V. cholerae*, депонированных в музее микробных культур ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России», применен метод мультилокусного VNTR-анализа. Выбраны наиболее информативные локусы и фланкирующие их праймеры, составлены VNTR-профили и проведен анализ аллельного разнообразия исследованных штаммов, выпущены лабораторные серии тест-системы. Разработанная тест-система может быть использована для мониторинга эпидобстановки, при проведении эпидемиологических расследований, а также для паспортизации коллекционных штаммов.

Ключевые слова: *V. cholerae*, VNTR-анализ, тест-система

Ya.A.Kibirev, I.V.Darmov, M.A.Loginova, I.V.Marakulin, D.A.Chukhlantsev, T.I.Dormidontova, S.L.Kuznetsov,
A.V.Kuznetsovskii

Development of VNTR-Based Test System for *V. cholerae* Typing

Russian Federation Ministry of Defense 48 Central Research Institute

Analysis of VNTRs was used for typing of *V. cholerae* strains deposited in microbial culture collection of 48 Central Research Institute. The most informative loci and flanking primers were chosen, VNTR profiles were compiled, and allele variability analysis of the strains was carried out. Laboratory series of test system were manufactured. The developed test system can be used for epidemiological monitoring and investigations, as well as for passportization of collection strains.

Key words: *V. cholerae*, VNTR, test system.

Холера была и остается до настоящего времени одной из самых опасных и распространенных инфекций бактериальной природы, унесшей многие миллионы человеческих жизней практически во всех странах мира.

В период с 1817 по 1926 год отмечено шесть крупных пандемий классической (азиатской) холеры, вызванных *Vibrio cholerae cholerae*. После почти 35-летнего отсутствия эпидемического распространения холеры в 1961 г. вспыхнула и продолжается до настоящего времени седьмая пандемия, обусловленная новой разновидностью возбудителя *V. cholerae eltor* [1, 4].

Для Российской Федерации и стран СНГ проблема борьбы с холерой в настоящее время является крайне актуальной: практически ежегодно регистрируются спорадические случаи заболевания и крупные вспышки, преимущественно связанные с заносом (завозом) инфекции, отмечено возможное укоренение холеры в южных регионах страны, появление стертых форм заболевания, а также регулярное выделение холерных вибрионов из объектов внешней среды [2].

Целью настоящей работы являлась разработка тест-системы для VNTR-типирования штаммов *V. cholerae*.

Материалы и методы

Исследовали 45 штаммов *V. cholerae*, выделенных в различные годы и депонированных в музее микробных культур ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России», из них 24 штамма вибрионов серогруппы O1, 13 – серогруппы O139 и 18 – серогруппы не-O1.

Для VNTR-типирования штаммов *V. cholerae*, основываясь на представленных в международной базе данных последовательностях переменных локусов [3], были выбраны олигонуклеотидные праймеры, фланкирующие 10 VNTR-локусов, краткие характеристики которых представлены в табл. 1.

С целью оценки пригодности выбранных локусов для типирования штаммов *V. cholerae* в предварительных исследованиях был проведен VNTR-анализ 45 штаммов *V. cholerae* из коллекции микробных культур ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России».

Для VNTR-анализа использовали хромосомную ДНК штаммов *V. cholerae*, выделенную по методу Мармур из агаровых культур, выращенных при температуре $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение (16 ± 2) ч. Для оценки стабильности выбранных VNTR-локусов в геноме холерного вибриона проводили сравнительный анализ VNTR-профилей исходных культур исследуемых штаммов *V. cholerae* и культур, полученных после

Таблица 1

VNTR-локусы и последовательности фланкирующих праймеров, использованные в исследовании

Локус	Тандемный повтор	Последовательности праймеров
Vc1	aacaga	5' cca aac cac tgc aac gga ta 3' 5' teg gtc ggt ttc tct tgt tc 3'
Vc2	accaga	5' gaa tca aag act tta gag gat tt 3' 5' tga gtt tct ttg gag gta gc 3'
Vc3	tgctgt	5' ctt gct cct gag ctg tat tt 3' 5' cac aat tta gac gtg gtc aa 3'
Vc4	gacccta	5' aac tgc tga ata agc caa gt 3' 5' tga gaa cgt aga tcc cag aa 3'
Vc5	gataatcca	5' gtt ttc ggc gtg gct gga ta 3' 5' teg ctg tac gcc ttt cct gt 3'
Vc6	ccataaaaccttag	5' cgc ttg aag cgc tgc ttg ac 3' 5' ctt arc gat cgt tta gcg gca ra 3'
Vc7	gctcatggttaactt	5' aac gct tca caa aac gac tgc 3' 5' cgc cac acc atg agt gaa ga 3'
Vc8	aagtaagaggggataaa	5' ctg aaa ggc aag act cat aaa cg 3' 5' ccc agt tta gcg aac cag ac 3'
Vc9	tcaatcccattaccgcataaacgc	5' tgc aat ctg tta ogc aca ctc 3' 5' gct caa gta gcg ggt tat cg 3'
Vc10	taaatacctgaccaaagagtcaaa	5' ata tct tgc gtg gga tct ta 3' 5' acc gca tat ctt cct tta ga 3'

десяти пересевов в жидкой питательной среде.

При постановке ПЦР готовили реакционную смесь, содержащую 0,25 мМ каждого из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, 0,5 ед. фермента Таq-полимеразы, буферный раствор для ПЦР, производства ЦНИИ Эпидемиологии, 7,5 мМ хлористого магния, 10 пкМ каждого праймера, 10 нг хромосомной ДНК одного из исследуемых штаммов. Общий объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы специалистами ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России» фосфоамидитным методом на синтезаторе АСМ-102У («Биоссет», Новосибирск).

Режим термоциклирования реакционной смеси состоял из первичной денатурации (94 °С, 5 мин), 5 циклов, включающих денатурацию (94 °С, 20 с), отжиг (57 °С, 10 с) и элонгацию (72 °С, 5 с), и 35 циклов, включающих денатурацию (94 °С, 5 с), отжиг (57 °С, 5 с) и элонгацию (72 °С, 5 с). Для локусов Vch2 и Vch3 задаваемая температура отжига составляла 53 °С.

Разделение продуктов ПЦР (10 мкл амплификационной смеси) проводили в 8 % неденатурирующем ПААГ. В качестве маркеров молекулярных масс ДНК использовали полученные в ходе отработки методики VNTR-анализа штаммов *V. cholerae* аллельные «лестницы», представляющие собой смесь аллелей каждого анализируемого локуса.

Определение аллотипа исследуемых штаммов проводили путем сравнения молекулярной массы амплифицированных в ПЦР VNTR-локусов с молекулярной массой фрагментов аллельной «лестницы» при электрофоретическом разделении в ПААГ.

Результаты и обсуждение

Анализ VNTR-профилей исследованных штаммов

Таблица 2

Вариабельность VNTR-локусов у изученных штаммов *V. cholerae*

Локус	Количество аллельных вариантов	Индекс разнообразия Нея
Vc1	9	0,8056
Vc2	16	0,8484
Vc3	16	0,9092
Vc4	9	0,7810
Vc5	9	0,8307
Vc6	4	0,6006
Vc7	3	0,2808
Vc8	1	-
Vc9	2	0,3432
Vc10	1	-

Примечание. Индекс разнообразия Нея определяется по формуле: $DI=1-\sum p^2$, где DI – индекс разнообразия Нея; p – частота встречаемости аллеля (отношение числа аллелей данного типа к общему числу аллелей).

V. cholerae показал, что все выбранные VNTR-локусы, амплифицированные в ПЦР с выбранными праймерами (за исключением локусов Vc8 и Vc10), обладают достаточным полиморфизмом (табл. 2). Наибольшее число аллельных вариантов – по 16, было выявлено при амплификации последовательностей локусов Vc2 и Vc3. При амплификации последовательностей локусов Vc1, Vc4 и Vc5 было выявлено по 9 аллельных вариантов. Более консервативными оказались локусы Vc6, Vc7 и Vc9, при амплификации последовательностей которых было выявлено 4, 3 и 2 аллельных варианта соответственно. Однако только для локусов Vc7 и Vc9 индекс разнообразия Нея составил менее 0,5. Локусы Vc8 и Vc10, имеющие по 1 аллельному варианту, были исключены из дальнейших исследований.

Для оценки стабильности выбранных VNTR-локусов исследуемых штаммов их культуры десятикратно пересевали в жидкой питательной среде во флаконах. После каждого посева культуры инкубировали при температуре (36±1) °С в течение (16±2) ч. Выделенные после десятого посева культуры использовали для VNTR-анализа. Полученные результаты показали полную идентичность VNTR-профилей всех исходных культур и культур, подвергнутых многократным посевам. Это позволяет утверждать, что выбранные VNTR-локусы стабильно наследуются холерным вибрионом, а полученные VNTR-профили являются уникальными для каждого из исследованных штаммов.

Полученные данные позволили обосновать компонентный состав и разработать тест-систему для типирования штаммов *V. cholerae* методом VNTR-анализа (табл. 3).

Использование данной тест-системы позволит создать базу данных, содержащую сведения о VNTR-профилях штаммов *V. cholerae*, депонированных в коллекциях микробных культур. Включение сведений о VNTR-профилях в паспорта музейных культур

Таблица 3

Компонентный состав тест-системы для штаммовой дифференциации возбудителя холеры с помощью мультилокусного VNTR-анализа

Наименование компонента	Объем компонента, см ³	Количество микропробирок, шт.
Растворы праймеров для амплификации каждого локуса	0,06	8
Контрольный препарат ДНК	0,1	1
Маркеры молекулярной массы по каждому локусу	0,1	8
10×буферный раствор	0,6	1
Раствор дезоксирибонуклеозидтрифосфатов	0,6	1
Раствор Taq-полимеразы	0,12	1
Минеральное масло	2,0	4
Бидистиллированная вода	2,0	1

V. cholerae будет являться важной идентификационной характеристикой депонированных штаммов. Разработанная тест-система также может использоваться при проведении мониторинга эпидобстановки в регионах, эндемичных по холере, и при эпидемиологических расследованиях вспышек этой инфекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Покровский В.И., Онищенко Г.Г., редакторы. Актуальные проблемы холеры. М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ; 2000. 384 с.
2. Покровский В.И., редактор. Холера в СССР в период VII пандемии. М.: Медицина; 2000. 472 с.
3. GPMS: Genomes, Polymorphism and Minisatellites with a focus on Molecular Epidemiology using Tandem Repeats [Internet]. Available from: <http://minisatellites.u-psud.fr>.
4. Kaper, J.B., Morris J.G., Levine M.M. Cholera. Clin. Microbiol. Rev. 1995; 8:48–86.

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

1. Pokrovskii V.I., Onishchenko G.G., editors. [Actual Issues of Cholera]. M.:Minzdrav RF; 2000. 384 p.
2. Pokrovskii V.I., editor. [Cholera in the USSR During VII Pandemic]. M.: Meditsina; 2000. 472 p.
3. The Microorganisms Tandem Repeats Database. Available from: http://minisatellites.u-psud.fr/ASPSamp/base_ms/bact.php.

Authors:

Kibirev Ya.A., Darmov I.V., Loginova M.A., Marakulin I.V., Chukhlantsev D.A., Dormidontova T.I., Kuznetsov S.L., Kuznetsovskii A.V. Russian Federation Ministry of Defense 48 Central Research Institute. Kirov.

Об авторах:

Кибирев Я.А., Дармов И.В., Логинова М.А., Маракунин И.В., Чухланцев Д.А., Дормидонтова Т.И., Кузнецов С.Л., Кузнецовский А.В. Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации. Киров.

Поступила 11.10.10.

А.Б.Мазрухо, А.И.Шелухович, Г.Д.Харабаджаян, Г.Л.Карбышев, А.Н.Терентьев, В.Д.Кругликов, Л.В.Григоренко, В.В.Агафонова, И.К.Савельева, Д.И.Симакова, О.Г.Сокиркина, О.Г.Булахова, И.С.Егоренкова

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НОВОЙ ЭЛЕКТИВНО-ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ (СЭДХ-М) ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ЛАБОРАТОРНЫХ ИСПЫТАНИЙ

ФГУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт»

Модернизирована ранее разработанная селективно-дифференциальная среда для культивирования *V. cholerae*. Показано, что модернизированная среда (СЭДХ-М) обладает необходимой чувствительностью и показателем прорастания. Рост на ней *E. coli* ингибировался полностью, а *P. vulgaris* – в значительной степени. Среда имеет выраженные дифференцирующие свойства: оранжевые колонии холерного вибриона четко отличаются от колониальной сопутствующей микрофлоры. В лабораторных испытаниях среда СЭДХ-М продемонстрировала некоторые преимущества перед референс средой TCBS при выделении *V. cholerae* из контаминированных фекалий.

Ключевые слова: холера, селективные питательные среды, селективная среда для выделения холерного вибриона – СЭДХ-М, лабораторные испытания.

A.B.Mazrukho, A.I.Shelokhovich, G.D.Harabadzhakhian, G.L.Karbyshev, A.N.Terent'ev, V.D.Kruglikov, L.V.Grigorenko, V.V.Agaphonova, I.K.Savel'eva, D.I.Simakova, O.G.Sokirina, O.G.Bulakhova, I.S.Egorenkova

Evaluation of Biological Properties of New Selective Differential Medium for Cholera Vibrios Isolation Based on the Results of Laboratory Trials

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute

Previously developed selective differential medium for *V. cholerae* growth was modernized. The modernized medium called SDMV-M was shown to possess the required sensitivity and germination index. The growth of *E. coli* was entirely inhibited, that of *P. vulgaris* was inhibited considerably. The medium possessed good differentiating ability: orange *V. cholerae* colonies were clearly distinguished from concomitant microorganisms. In the laboratory trials SDMV-M demonstrated some advantages as regards *V. cholerae* isolation from contaminated faeces in comparison with the reference medium TCBS.

Key words: cholera, selective nutrient media, selective medium for *V. cholerae* isolation, laboratory trials.

В настоящее время предложены разнообразные селективные и селективные среды для выделения холерного вибриона от человека и из внешней среды. Лучшей среди них остается среда TCBS, разработанная около 50 лет назад и принятая ВОЗ в качестве референтной [2]. Данная среда обладает хорошими ростовыми, ингибирующими и дифференцирующими свойствами, стабильностью физико-химических показателей и надежностью в работе в стационарных и полевых условиях. В Ростовском противочумном институте разработана селективная среда СЭДХ, которая действующими Методическими указаниями МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры» была регламентирована для проведения мониторинга холерных вибрионов в объектах внешней среды и исследования материала от людей.

Однако технологическая модификация производства одного из селективных компонентов среды (препарата «Прогресс») привела к изменению его свойств и сделала непригодным для использования в составе среды. В связи с этим была разработана новая среда с улучшенными селективными свойствами, получившая название СЭДХ-М (модернизированная).

Модернизация среды произведена за счет введения других, ранее не использовавшихся селективных агентов. Данное сообщение представляет результаты лабораторных испытаний среды.

Целью исследований является определение основных биологических показателей селективно-дифференциальной среды СЭДХ-М (чувствительность, показатель прорастания, скорость роста холерных колоний, ингибирующие и дифференцирующие свойства), а также оценка ее эффективности при исследовании испражнений от людей, искусственно контаминированных тест-штаблом холерного вибриона.

Материалы и методы

Испытания среды проводили в соответствии с утвержденной программой и действующими инструктивными материалами. Для испытаний представлено три серии сред, опыты проведены с трехкратной повторностью.

В работе использовали следующие штаммы микроорганизмов, полученные из музея живых культур

РостНИПЧИ: *Vibrio cholerae* O1 P-1 классический биовар – тест-штамм; *V. cholerae* O1 M-878 биовар эльтор – тест-штамм; *V. cholerae* non O1 P-9741 – тест-штамм; *V. cholerae* O139 MO-45; *V. cholerae* O139 P-16064; *V. cholerae* O139 P-16131; *V. cholerae* O139 P-17918; *V. cholerae* O1 16 классический биовар; *V. cholerae* O1 569В классический биовар; *V. cholerae* O1 1a биовар эльтор; *V. cholerae* O1 И-33 биовар эльтор; *V. cholerae* O1 1 биовар эльтор; *V. cholerae* O1 P-5879 биовар эльтор; *V. cholerae* O1 P-14863 биовар эльтор; *Escherichia coli* 18 – тест-штамм; *Proteus vulgaris* НХ 19 N222 – тест-штамм; *V. alginolyticus* 13076; *V. parahaemolyticus* 17094; *V. mimicus* 133534; *Comamonas sp.* P-6101; *Plesiomonas sp.* P-1035; *Aeromonas sp.* 16024; *Pseudomonas aeruginosa* 14; *Klebsiella sp.* 6; *Salmonella typhi* 1289; *Shigella dysenteriae* 13; *Enterococcus sp.* 11.

Питательные среды

Опытная: СЭДХ-М – электро-дифференциальная среда для выделения холерных вибрионов.

Контрольные среды лабораторного приготовления: агар Мартена (рН 7,6) – неселективная среда для культивирования холерных вибрионов; ХДС-агар (рН 7,8) – неселективная среда для культивирования и выделения холерных вибрионов [1]; СЭДХ – электро-дифференциальная среда РостНИПЧИ для выделения холерных вибрионов, заранее отконтролированных на соответствие инструктивным требованиям. Контрольная коммерческая селективная среда ТСBS – референтная среда ВОЗ, производства «Мерк» Германия [3].

Выращивание культур холерных вибрионов и приготовление их взвесей проводили согласно действующей инструкции. Штаммы микроорганизмов, не относящихся к вибрионам, инкубировали на соответствующих средах, их взвеси приготавливали в растворе хлорида натрия с помощью стандартного образца мутности ОСО 42-28-85-09П (2009).

Биологические показатели среды и критерии оценки

Для определения показателя чувствительности (наличие роста культуры при максимальном разведении взвеси клеток) производили высев трех тест-штаммов холерного вибриона из разведений культур (начальная концентрация клеток 10^9 м.к.) 10^{-6} и 10^{-7} в объеме 0,1 мл, учет производили в течение 18 ч. На чувствительной среде должен отмечаться специфический рост культуры в виде типичных колоний диаметром не менее 1,0–1,5 мм.

Показатель прорастания определяли по количественному росту колоний на чашках при высеве 10^2 и 10 м.к. штаммов холерного вибриона. Согласно действующим стандартам при посеве 10^2 м.к. должно вырасти не менее 30 типичных колоний холерных вибрионов (30 %) диаметром минимум 1–1,5 мм, 10 м.к. – единичные колонии. При этом популяция должна быть стабильной: из сотни колоний не должно быть более двух атипичных по морфологии.

Скорость роста колоний тест-штаммов холер-

ного вибриона (посев 10^2 м.к.) оценивали по минимальному времени, в течение которого вибрионы образовывали типичные колонии диаметром не менее 1,0 мм.

Указанные показатели как опытной среды, так и сред сравнения изучались также еще на 11 музейных штаммах холерного вибриона.

Для выявления показателя ингибиции и дифференцирующих свойств среды производили одновременный посев на чашки контрольного штамма холерного вибриона *V. cholerae* O1 M-878 биовара эльтор и микробов-ассоциантов *E. coli* 18 и *P. vulgaris* НХ 19 № 222. Посевы инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Электро-питательная среда при посеве в объеме 0,1 мл смеси, содержащей холерный вибрион в концентрации 10^3 м.к./мл, а также кишечную палочку и протей – по 10^7 м.к./мл, должна обеспечивать рост холерного вибриона и полностью подавлять рост кишечной палочки. Допускается рост изолированных колоний указанного штамма протей. Должна наблюдаться четкая дифференциация представителей рода *Vibrio* от протей по морфологии и окраске колоний.

Для дополнительной характеристики ингибирующих и дифференцирующих свойств среды СЭДХ-М производились посевы указанного штамма холерного вибриона в той же дозе и сопутствующей смеси микроорганизмов-ассоциантов – кишечной палочки и протей, взятых в более высокой концентрации по сравнению с той, которая предусмотрена нормативными условиями испытаний. Ассоцианты высевались на чашку по 0,1 мл из пробирок с концентрациями 10^{10} м.к./мл. Помимо этого, способность среды СЭДХ-М выявлять холерные вибрионы проверялась при посеве испражнений здорового человека, разведенных до концентрации 10 МЕ мутности стандарта ОСО 42-28-85-09 П, что соответствует $0,93 \cdot 10^9$ м.к./мл для микробов кишечной группы, и искусственно контаминированных культурой холерного вибриона *V. cholerae* O1 M-878 биовара эльтор до концентрации 10^3 м.к./мл. В этом случае высев 0,1 мл взвеси испражнений соответствовал посеву на пластинку среды 10^2 м.к. холерного вибриона.

Для проверки ингибирующих свойств среды СЭДХ-М по отношению к морфологически сходным с вибрионами микроорганизмам (комамонас, плезиомонас, аэромонас), некоторых галофильных вибрионов, псевдомонад, сальмонелл, клебсиелл, шигелл, протей, кишечной палочки и энтерококка производили их посев по 10^6 м.к. на чашку с параллельным высевом холерного вибриона в дозе 10^2 м.к. Результаты опыта учитывали после инкубации в термостате в течение 24 ч.

Результаты и обсуждение

Приготовленная среда СЭДХ-М представляет собой непрозрачную агаровую пластинку черного фиолетового цвета, рН (8,4±0,1). Микроорганизмы

Таблица 1

Показатели прорастания среды СЭДХ-М и сред сравнения для холерных вибрионов

Биовар холерных вибрионов	Кол-во штаммов	Кол-во выросших колоний на средах при посеве 100 и 10 м.к. (соответственно числитель и знаменатель), М±m, P – 0,05				
		СЭДХ-М	Агар Мартена	ХДС-агар	СЭДХ	TCBS
Классический	3	31±3 4±1	40±4 6±1	39±4 3±1	47±3 5±1	38±2 3±1
Эль Тор	6	43±2 3±1	40±2 6±1	35±2 4±1	43±3 5±1	36±2 4±1
O139	4	38±2 3±1	48±1 4±1	38±1 3±1	40±2 4±1	41±1 3±1
Non O1	1	40±1 3±1	50±1 4±1	35±1 4±1	30±1 5±1	32±3 2±1

Примечание. В числе испытанных культур холерных вибрионов находились три тест-штамма.

рода *Vibrio* образуют на среде СЭДХ-М колонии оранжевого цвета, при рассматривании в стереомикроскоп с косым верхним освещением – оранжевые с темно-коричневым центром и узким ободком синеватой прозрачной периферии, гладкие, блестящие, выпуклые, при пробе иглой образуется короткий тяж («полувязкость»). Для колоний вибрионов на данной среде не характерно тускло-желтоватое свечение, жидковатая консистенция без тяжа, гомогенность без синеватого пояса периферии и темно-коричневого центра. Колонии оранжевых типичных холерных вибрионов хорошо агглютинируются соответствующими О-холерными сыворотками в реакции агглютинации на стекле. Микроскопически в материале из оранжевых колоний – типичные грам-отрицательные подвижные вибрионы.

Результаты, отражающие биологические показатели и эффективность выделения холерных вибрионов из различных смесей и субстратов на проверяемой среде СЭДХ-М и средах сравнения, представлены в табл. 1 и 2.

Как видно из табл. 1, показатели прорастания СЭДХ-М и других сравниваемых сред по отношению к 14 испытанным штаммам холерных вибрионов, включая и три контрольных, соответствовали требуемой норме. Все испытанные среды (опытная

и контрольные) характеризовались достаточной чувствительностью в отношении всех взятых в работу штаммов: при посеве 10 м.к. выростали единичные колонии холерного вибриона. Все колонии холерных вибрионов обладали морфологией, характерной для соответствующих сред: оранжевые, гладкие – на СЭДХ-М, желтые, гладкие – на СЭДХ и TCBS, полупрозрачные и прозрачные, гладкие – на агаре Мартена и ХДС-агаре.

Скорость роста холерных вибрионов на среде СЭДХ-М, СЭДХ и TCBS составила 14–16 ч, на среде Мартена и ХДС-агаре – 12 ч, когда их колонии достигали 1,0 мм в диаметре и отличались типичной для соответствующих сред морфологией. Атипичных колоний не зарегистрировано.

В табл. 2 представлены данные, характеризующие ингибирующие и дифференцирующие свойства испытываемых сред, т.е. способность их к селективному выявлению холерного вибриона в присутствии микробов-ассоциантов. При посеве требуемых инструкцией смесей холерного вибриона (10² м.к.), кишечной палочки и протей (по 10⁶ м.к.) на чашках со средой СЭДХ-М выростало не менее 30 оранжевых колоний холерных вибрионов диаметром до 2,0 мм, рост ассоциантов подавлялся. Аналогичный результат был получен и на среде TCBS. На среде СЭДХ ингибция

Таблица 2

Элективное выделение холерных вибрионов на среде СЭДХ-М и средах сравнения из искусственных смесей с *E. coli* и *P. vulgaris* и с нативными испражнениями здорового человека

Состав смеси и исходные концентрации микроорганизмов, м.к./мл	Кол-во микроорганизмов в 0,1 мл посева, м.к.	Рост колоний ХВ и другой микрофлоры через 14–16 ч на средах:			
		СЭДХ-М	Агар Мартена	СЭДХ	TCBS
<i>V. cholerae</i> O1 М-878 биовар эльтор – 10 ⁵	10 ²	40±2 оранжевых колоний ХВ*	Рост в виде газона <i>E. coli</i> и <i>P. vulgaris</i>	2 желтые колонии ХВ в газоне роста <i>E. coli</i> и <i>P. vulgaris</i>	32±1 желтые колонии ХВ
<i>E. coli</i> 18 – 10 ⁷	10 ⁶				
<i>P. vulgaris</i> НХ 19 № 222 – 10 ⁷	10 ⁶				
<i>V. cholerae</i> O1 М-878 биовар эльтор – 10 ³	10 ²	42±3 оранжевых колоний ХВ	Рост в виде газона <i>E. coli</i> и <i>P. vulgaris</i>	Рост в виде газона <i>E. coli</i> и <i>P. vulgaris</i>	1 желтая колония ХВ в газоне роста <i>P. vulgaris</i> зеленого цвета
<i>E. coli</i> 18 – 10 ¹⁰	10 ⁹	40–60 мелких черных колоний <i>P. vulgaris</i>			
<i>Pr. vulgaris</i> НХ 19 № 222 – 10 ¹⁰	10 ⁹				
<i>V. cholerae</i> O1 М-878 биовар эльтор – 10 ³	10 ²	26±2 оранжевых колоний ХВ	Рост газонном кишечной флоры	1 желтая колония ХВ в газоне роста кишечной флоры	12±1 желтых колоний ХВ
Испражнения, разведенные примерно до 10 ⁹	10 ⁸				

*ХВ – холерный вибрион.

микробов-ассоциантов была слабой, что значительно затрудняло поиск колоний холерных вибрионов.

Увеличение посевной дозы кишечной палочки и протей до 10^9 м.к. при прежней дозе холерного вибриона несколько снижало ингибирующую активность среды СЭДХ-М – на чашке появлялось до 60 мелких черноватых колоний протей, которые, однако, не мешали росту, обнаружению и снятию иглой 40 оранжевых колоний холерных вибрионов. Для облегчения последней процедуры необходим стереомикроскоп с косым освещением. Кишечная палочка на данной среде ингибировалась полностью. Среда TCBS при посевах столь высоких концентраций ассоциантов позволяла выявлять лишь единичные желтые колонии холерных вибрионов среди густого роста протей голубовато-зеленоватого цвета, т.е. по элективности была немного слабее опытной среды. Среда СЭДХ по этому свойству полностью уступала средам СЭДХ-М и TCBS.

Сходные результаты получены и при посеве контаминированных тест-штаммом холерного вибриона испражнений здорового человека. В этом случае среда СЭДХ-М оказалась также несколько более эффективной, чем TCBS. Среда СЭДХ, как и в предыдущем случае, была недостаточно элективной.

Среда СЭДХ-М подавляла рост *V. parahemolyticus*, *V. mimicus* и значительно тормозила рост *V. alginolyticus*, при этом окраска колоний последнего была темно-бурой. *Comamonas sp.* и *Plesiomonas sp.* подавлялись полностью, *Aeromonas sp.* вырастал на среде в виде мелких колоний желтоватого цвета, которые легко можно было отличить от оранжевых колоний вибрионов. Псевдомонады, клебсиеллы, сальмонеллы, шигеллы и кишечная палочка на данной среде не росли. Протей прорастал в виде черных мелких колоний. *Enterococcus sp.* только при посеве весьма высоких концентраций микроба (10^9 м.к.), рос на среде СЭДХ-М в виде очень мелких сероватых колоний, легко отличимых от холерных вибрионов.

В результате проведенных лабораторных ис-

пытаний установлено, что испытываемая элективно-дифференциальная среда СЭДХ-М по показателям чувствительности и прорастания, а также скорости роста колоний холерного вибриона соответствует требованиям Методических указаний МУ 3.3.2.2124-06 и не уступает контрольным средам: неселективным – агару Мартена и ХДС и селективной – референтной среде ВОЗ – TCBS, а по показателю ингибиции микробов-ассоциантов и дифференцирующему свойству несколько превосходит последнюю. Предполагается апробация среды СЭДХ-М в ходе мониторинга водных объектов внешней среды на наличие холерного вибриона.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мазрухо А.Б., Каминский Д.М., Телесманич Н.Р. Использование новых питательных сред на этапах подготовки сотрудников специализированных противоэпидемических бригад к работе в зонах чрезвычайных ситуаций. Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2010; 3:75–80.
2. American Society for Microbiology. Manual of Clinical Microbiology. 4th ed. 1985.
3. MERCK Microbiology Manual. Darmstadt; 1996. 405 p.

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

1. Mazrukho A.B., Kaminskii D.M., Telesmanich N.R. [Application of new nutrient media at different stages of training of specialized anti-epidemic teams personnel for work in emergency situations zones]. Mediko-Biol. Socio-Psykhol. Probl. Bezop. Chrezv. Sit. 2010; 3: 75–80.

Authors:

Mazrukho A.B., Shelokhovich A.I., Harabadzhakhian G.D., Karbyshev G.L., Terent'ev A.N., Kruglikov V.D., Grigorenko L.V., Agaphonova V.V., Savel'eva I.K., Simakova D.I., Sokirkina O.G., Bulakhova O.G., Egorenkova I.S. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. M.Gor'kogo St., 117/40, Rostov-on-Don, 344002, Russia. E-mail: plague@aaanet.ru

Об авторах:

Мазрухо А.Б., Шелохович А.И., Харабаджакян Г.Д., Карбышев Г.Л., Терентьев А.Н., Кругликов В.Д., Григоренко Л.В., Агафонова В.В., Савельева И.К., Симакова Д.И., Сокиркина О.Г., Булахова О.Г., Егоренкова И.С. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru

Поступила 09.03.11.

Д.В.Уткин, В.Е.Куклев, П.С.Ерохин, Н.А.Осина

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАТОГЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ АГЕНТОВ

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

В обзоре представлены данные о применении методов УФ спектроскопии, спектроскопии в видимом диапазоне, ИК спектроскопии при проведении неспецифической индикации патогенных биологических агентов; ИК Фурье спектроскопии, Раман спектроскопии при их идентификации. Рассмотрены преимущества, недостатки и перспективы использования различных методов спектроскопии при мониторинге окружающей среды на наличие патогенных биологических агентов.

Ключевые слова: индикация, патогенные биологические агенты, УФ спектроскопия, ИК спектроскопия, Раман спектроскопия, Фурье спектроскопия, биолюминесценция.

D.V.Utkin, V.E.Kouklev, P.S.Erokhin, N.A.Ossina

Application of Spectroscopy Methods for Indication and Identification of Pathogenic Biological Agents

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

The review presents data on application of UV, IR and optical spectroscopy methods for non-specific indication of pathogenic biological agents, and IR Fourier spectroscopy, and Raman spectroscopy – for their identification. Considered are advantages, disadvantages and prospects of different spectroscopy methods application for monitoring of the environment for the presence of pathogenic biological agents.

Key words: indication, pathogenic biological agents, UV spectroscopy, IR spectroscopy, Raman spectroscopy, Fourier spectroscopy, bioluminescence.

Защита населения страны от биологической агрессии и других видов биологических угроз (эпидемии, природные и техногенные катастрофы) зависит от своевременного обнаружения патогенных биологических агентов (ПБА) и проведения противоэпидемических мероприятий [1]. Выявление ПБА включает в себя три функциональных звена: неспецифическую индикацию, специфическую индикацию и идентификацию (определение вида) ПБА [2].

Неспецифическая индикация основана на экспресс-обнаружении ПБА по ряду признаков (повышение белкового фона, наличие ферментативной активности), характерных для живых микроорганизмов [1]. В основе специфической индикации лежат методы лабораторного анализа, направленные на выявление характерных для каждого вида ПБА антигенов и участков генома иммунологическими и молекулярно-генетическими методами [2]. В результате исследования нативного материала экспресс-методами предварительный ответ о наличии ПБА в пробе может быть получен от 1–3 до 3–5 ч [2]. Анализ материала после биологического обогащения занимает от 18 до 72 ч [2]. Несмотря на то, что методы лабораторной диагностики характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью, в настоящее время остаются не решенными ряд вопросов:

- оснащение подразделений, осуществляющих биологическую разведку, средствами неспецифической индикации;

- сокращение времени выявления и определения

вида ПБА;

- возможность бесконтактного и безреагентного проведения анализа для повышения биологической безопасности;

- разработка автоматических средств мониторинга объектов окружающей среды на наличие ПБА.

На современном этапе развития методов лабораторной диагностики инфекционных болезней все большее применение находят физические методы, основанные на принципах анализа химического состава и молекулярной структуры клеток микроорганизмов: ультрафиолетовая (УФ) и инфракрасная (ИК) спектроскопия, биолюминесценция, Раман и ИК Фурье спектроскопия.

Методы ИК и УФ спектроскопии легли в основу разработки дистанционных средств индикации ПБА в аэрозольном состоянии – ИК и УФ лидаров (от англ. LIDAR – *light detection and ranging*) [1]. Лидары способны осуществлять в автоматическом режиме непрерывный мониторинг воздушного пространства без использования дополнительных реагентов. Принцип действия лидаров основан на применении ИК или УФ лазерного излучения, проходящего через слой атмосферы и отражаемого от аэрозольных частиц. ИК лидары позволяют определить наличие биологических частиц диаметром менее 20 мкм на расстоянии 5–6 км, УФ лидары детектируют биологические частицы диаметром 1–10 мкм на расстоянии 2–3 км (Trošt M., 2008). С использованием ИК лазерного излучения обнаруживают частицы как биологического, так и не биологического происхождения (снег, пыль,

порошки). УФ излучение индуцирует флуоресценцию только биологических молекул (белков) [14].

Метод индикации биологических частиц с использованием УФ спектроскопии основан на выявлении пика поглощения белковых молекул, содержащих ароматические аминокислоты (триптофан, тирозин, фенилаланин), в УФ диапазоне при длине волны 280 нм. УФ лазеры эффективны в условиях низкой освещенности, в том числе ночью. Однако наличие в воздухе аэрозолей, содержащих ароматические углеводороды (промышленные химические вещества, выхлопные газы), пыльцу растений, споры грибов, может приводить к ложноположительным результатам [28]. Для исключения подобных ложных ответов и выявления только клеток микроорганизмов нашел применение метод спектроскопии в видимом диапазоне, основанный на определении маркера метаболической активности живых клеток никотинамидаденинуклеотида (НАД), имеющего пик поглощения при длине волны 349 нм, а пик эмиссии – при длине волны 450 нм [17]. Однако указанный способ определения клеток микроорганизмов не позволяет обнаружить споры бактерий и токсины биологического происхождения, не обладающие метаболической активностью.

Для решения данной проблемы рядом авторов предложено использование многоволновой спектроскопии в УФ и видимом диапазоне (UV-VIS спектроскопия), регистрирующей наличие как белковых молекул в УФ диапазоне, так и маркеров метаболической активности (НАД, рибофлавина) в видимом диапазоне. Одновременная регистрация трех биологических маркеров (белков, НАД, рибофлавина) позволяет дифференцировать вегетативные клетки микроорганизмов, споры бактерий, белки и неорганические частицы. На основе многоволновой спектроскопии разработаны устройства для неспецифической индикации ПБА: Ultraviolet-Aerodynamic Particle Sizer (UV-APS) (TSI, Inc., США), Fluorescence Aerodynamic Particle Sizer (FLAPS) (Canadian Defense ministry, Канада), Biological Agent Warning Sensor (BAWS) (MIT Lincoln Laboratory, США), Single Particle Fluorescence Analyzer (SPFA) (Naval Research Laboratory, США) [4, 14, 28]. Детектор UV-APS сочетает в себе пробоотборник – насос для прокачивания проб воздуха, ИК лазер, определяющий размеры и количество частиц, содержащихся в пробе, и два УФ лазера, предназначенные для выявления белков, НАД и рибофлавина. V.Agranovski *et al.* показали, что чувствительность детектора UV-APS составляет 60 м.к./см³, наличие ложноположительной флуоресценции немикробных органических аэрозолей наблюдается в 0,1 % случаев [4]. Указанные устройства являются малогабаритными и могут быть использованы на мобильных постах контроля окружающей среды. Так, детектор FLAPS был интегрирован в систему индикации биологических агентов CIBADS (Canadian Integrated Biological Agent Detection System) министерства обороны Канады [14].

Одним из методических приемов, используемых для проведения неспецифической индикации микроорганизмов, является биоллюминесценция. При этом регистрируется либо собственная флуоресценция патогенов, либо флуоресценция, возникающая при взаимодействии специальных реагентов с маркерами метаболической активности клеток – аденозинтрифосфатазы, пероксидазы [3, 20, 21]. На сегодняшний день разработана коммерческая тест-система Profile-1 (New Horizon Diagnostics Inc., США), позволяющая выявлять от $3 \cdot 10^2$ до $1 \cdot 10^4$ м.к./мл в течение 5–15 мин [13]. Специфичность тест-системы составляет 100 %. Тест-система Profile-1 была использована для определения общей обсемененности пищевых продуктов [10], биологических аэрозолей [29], детекции спор бактерий [20].

Таким образом, рассмотренные выше средства ИК, УФ и видимой спектроскопии способны детектировать вегетативные клетки микроорганизмов, споры бактерий, белковые токсины в объектах окружающей среды, пищевых продуктах. Данные методы индикации характеризуются высокой чувствительностью, возможностью автоматизации исследований, способностью к длительному функционированию приборов в автономном режиме, быстротой получения ответа, в ряде случаев отсутствием прямого контакта с исследуемым материалом и необходимостью использования дополнительных биологических или химических реагентов. Данные преимущества могут быть реализованы при разработке средств неспецифической индикации ПБА и оснащении ими мобильных постов контроля окружающей среды. Однако указанные методы не позволяют определить вид ПБА.

Для специфической индикации и идентификации ПБА нашли применение методы спектроскопии, основанные на определении индивидуальных характеристик химического состава клеток микроорганизмов.

В настоящее время свое развитие в микробиологии получила колебательная ИК спектроскопия с Фурье преобразованием – ИК Фурье спектроскопия (англ. Fourier transform infrared – FT-IR) [23], которая долгие годы используется в химическом анализе чистых веществ [31]. При ИК Фурье спектроскопии исследуемый образец подвергается воздействию ИК излучения. Поглощение излучения веществом приводит к колебательным движениям молекул, регистрируемых в виде колебательного спектра. Для каждой молекулы характерны своя частота и амплитуда колебаний. Установлено, что микроорганизмы обладают индивидуальными Фурье спектрами [24, 27], что обусловлено уникальным для каждого возбудителя набором макромолекул (белков, липидов, углеводов, нуклеиновых кислот). Определение Фурье спектров микроорганизмов позволяет дифференцировать их на самых разных таксономических уровнях, вплоть до подвидов, сероваров и штаммов. Так, установлена эффективность применения ИК Фурье спектроскопии при идентификации *Brucella sp.* [15], *Yersinia*

enterocolitica [18], *Listeria monocytogenes* [25, 26], дрожжей [30], прионов [7]. М.А. Miguel Gómez *et al.* использовали Фурье спектроскопию для определения биоваров *Brucella melitensis* и дифференциации от других видов бруцелл [15]. Показана эффективность определения биовара бруцелл в 95 % случаев. А.Е. Kuhn *et al.* с помощью ИК Фурье спектроскопии дифференцировали *Y. enterocolitica* от других видов рода *Yersinia* (*Y. pseudotuberculosis*, *Y. bercovieri*, *Y. intermedia*) [18]. Авторам удалось определить вид *Y. enterocolitica* в 80 % случаев, биовар – в 98 %, серовар – в 92 %, присутствие маркера вирулентности (*ail*-гена) – в 98 %, в 100 % случаев дифференцировать штаммы *Y. enterocolitica*, *Y. bercovieri*, *Y. intermedia*, *Y. rohdei*, имеющие сходный биохимический профиль, и которые невозможно различить с использованием коммерческой тест-системы API 20E (BioMérieux, Франция). Согласно литературным данным, применение ИК Фурье спектроскопии позволяет сократить время анализа до нескольких минут, минимизировать объем исследуемого материала, повысить чувствительность иммунологических и бактериологических методов до $1 \cdot 10^3$ м.к./мл, исключить трудоемкую подготовку образцов при молекулярно-генетических методах [31].

Еще одним способом, реализуемым при индикации и идентификации ПБА, является Раман спектроскопия, основанная на комбинационном рассеянии света или эффекте Рамана [6]. Раман спектроскопия является одним из методов химического анализа, изучения состава и строения веществ. Раман спектроскопия, в отличие от других видов спектроскопии, может проводиться в широком диапазоне длин волн – от ультрафиолетовой до инфракрасной области. Из-за высокой фоновой флуоресценции воды, буферных растворов, сред в видимом диапазоне, используют спектры комбинационного рассеяния света вдали от фоновой флуоресценции – в ближнем инфракрасном диапазоне (ИК Раман спектроскопия) или ультрафиолетовом диапазоне (УФ Раман спектроскопия) [19]. При Раман спектроскопии сдвиг вторичных спектральных линий (линий-спутников) относительно первичных линий характеризует вещество. Сигнал, испускаемый каждым типом молекул, в результате их взаимодействия между собой, а также в результате различной толщины молекул является индивидуальным. УФ Раман спектроскопия была использована для детекции спор бацилл и определения их вида [22]. ИК Раман спектроскопия нашла применение в индикации и идентификации *Mycobacterium sp.* [5, 9], *Listeria sp.*, *Legionella sp.*, *Cryptosporidium sp.* [16], спор *Bacillus cereus* [12], спор *Bacillus anthracis* [8, 11, 32, 33]. Чувствительность метода при обнаружении спор бактерий составила $5 \cdot 10^4$ – $5 \cdot 10^5$ спор/мл [32]. Показано, что Раман спектроскопия имеет ряд преимуществ перед другими методами лабораторной диагностики инфекционных болезней (иммуноферментный анализ, полимеразная цепная реакция, иммуноблоттинг): отсутствие этапов подготовки проб

(отмывка, лизис клеток, разделение белков, выделение ДНК/РНК), высокая скорость анализа (5 мин), высокая информативность [19]. Основное преимущество Раман спектроскопии – возможность проведения анализа без прямого физического контакта с биологическим агентом. Это свойство нашло отражение при идентификации патогенных вирусов, находящихся внутри инфицированных клеток [19].

Таким образом, наряду с бактериологическими, иммунологическими и молекулярно-генетическими методами индикации и идентификации ПБА, все большее применение находят физические методы спектроскопического анализа. Анализ научной литературы показал возможность использования методов ИК, УФ спектроскопии, многоволновой спектроскопии, биолюминесцентного анализа при неспецифической индикации ПБА. При этом указанные методы позволяют решить ряд вопросов: возможность дифференциации вегетативных и споровых форм микроорганизмов, белков и неорганических молекул, сокращение времени анализа до нескольких минут, в ряде случаев, проведение анализа в автономном (автоматическом) режиме в течение длительного времени без использования дополнительных реагентов, способность выявлять ПБА на определенном расстоянии без контакта с исследуемым материалом. Данные свойства могут быть использованы при разработке средств мониторинга объектов окружающей среды.

Уникальные характеристики отдельных видов микроорганизмов, получаемые с помощью методов ИК Фурье и Раман спектроскопии, нашли свое применение при идентификации ПБА. Преимущества методов Фурье и Раман спектроскопии перед традиционными методами лабораторной диагностики связаны с минимальным расходом исследуемого материала, быстротой выдачи ответа, отсутствием длительных этапов пробоподготовки, необходимости использования меченых реагентов и хромогенных субстратов, возможностью выявления труднокультивируемых и некультивируемых форм бактерий, вирусов. Все это указывает на перспективу использования методов спектроскопии для неспецифической, специфической индикации и идентификации ПБА.

Работа выполнена по государственному контракту № 57-Д от 29.06.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Злобин В.И., Евстигнеев В.И. Специфическая и неспецифическая индикация микроорганизмов в окружающей среде. Вест. Рос. АМН. 2002;11:37–42.
2. Практическое пособие для подготовки врачей-бактериологов и эпидемиологов по вопросам противодействия биотерроризму. Волгоград; 2004. 233 с.
3. Сквиррелл Д.Д. Способ и устройство для определения присутствия и/или количества клеточного материала в газовой среде. Патент РФ № 2142016, опубл. 27.11.1999.
4. Agranovski V., Ristovski Z.D., Hargreaves M., Blackall P.J., Morawska L. Real-time measurement of bacterial aerosols with the UVAPS: performance evaluation. J. Aerosol Sci. 2002; 34:301–17.

5. *Aziz M.A., Kholy A.E.* Laser-Raman spectroscopy: a novel approach for sensitive molecular characterization of the *Mycobacterium* genomic DNAs. *Arab. J. Biotech.* 2006; 9(3):453–66.
6. *Baena J.R., Lendl B.* Raman spectroscopy in chemical bioanalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004; 8:534–9.
7. *Beekes M., Lasch P., Naumann D.* Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. *Vet. Microbiol.* 2007; 123(4):305–19.
8. *Bell S.E.J., Mackle J.N., Sirumithu N.M.S.* Quantitative surface-enhanced Raman spectroscopy of dipicolinic acid-towards rapid anthrax endospore detection. *Analyst.* 2005; 130:545–9.
9. *Buijtiels P.C.A.M., Willemsse-Erix H.F.M., Petit P.L.C., Endtz H.P., Puppels G.J., Verbrugh H.A. et al.* Rapid Identification of *Mycobacteria* by Raman Spectroscopy. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(3):961–5.
10. *Cutler C.N., Dorsa W.J., Sirogusa G.R.* A rapid microbial ATP bioluminescence assay for meat carcasses. *Dairy Food Environ. Sanit.* 1996; 16:726–36.
11. *Esposito A.P., Talley C.E., Huser T., Hollars C.W., Schaldach C.M., Lane S.M.* Analysis of single bacterial spores by micro-Raman spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 2003; 57:868–71.
12. *Farquharson S., Grigely L., Khitrov V., Smith W., Sperry J.F., Fenerty G.* Detecting *Bacillus cereus* spores on a mail sorting system using Raman spectroscopy. *J. Raman Spectr.* 2004; 35:82–6.
13. *Fatah A.A., Arcilesi R.D., Chekol T., Lattin C.H., Sadik O., Aluoch A.* Guide 101–06 for the Selection of Biological Agent Detection Equipment for Emergency First Responders. 2nd ed. 2007.
14. *Fatah A.A., Barrett J.A., Arcilesi R.D., Ewing K.J., Lattin C.H., Moshier T.F.* An Introduction to Biological Agent Detection Equipment for Emergency First Responders. *NIJ Guide 101–00.* 2001. 53 p.
15. *Gómez M.A., Miguel, Pérez M.A., Bratos, Gil F.J., Martín, Díez A., Dueñas, Rodríguez J.F., Martín, Rodríguez P., Gutiérrez et al.* Identification of species of *Brucella* using Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Microbiol. Methods.* 2003; 55(1):121–31.
16. *Grow A.E., Wood L.L., Claycomb J.L., Thompson P.A.* New biochip technology for label-free detection of pathogens and their toxins. *J. Microbiol. Methods.* 2003; 53:221–33.
17. *Jeys T.H., Herzog W.D., Hybl J.D., Czerwinski R.N., Sanchez A.* Advanced Trigger Development. *Lincoln Laboratory Journal.* 2007; 17(1):29–62.
18. *Kuhm A.E., Suter D., Felleisen R., Rau J.* Identification of *Yersinia enterocolitica* at the Species and Subspecies Levels by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(18):5809–13.
19. *Lambert P.J., Whitman A.G., Dyson O.F., Akula S.M.* Raman spectroscopy: the gateway into tomorrow's virology. *Viol. J.* 2006; 3:51.
20. *Lee J., Deininger R.A.* A rapid screening method for the detection of viable spores in powder using bioluminescence. *Luminescence.* 2004; 19:209–11.
21. *Lim D.V., Simpson J.M., Kearns E.A., Kramer M.F.* Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(4):583–607.
22. *López-Díez E.C., Goodacre R.* Characterization of microorganisms using UV resonance Raman spectroscopy and chemometrics. *Anal. Chem.* 2004; 76(3):585–91.
23. *Preisner O., Lopes J.A., Guiomar R., Machado J., Menezes J.C.* Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in bacteriology: towards a reference method for bacteria discrimination. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007; 387(5):1739–48.
24. *Rabia D., Abubakar M., Javed A.M., Shamim S., Irfan U., Qurban A.* Biological characterization and protein profiles of two model bacteria by SDS-page and FT-IR». *ARPN J. Agricult. Biol. Sci.* 2008; 3(5–6):6–16.
25. *Rebuffo C.A., Schmitt J., Wenning M., von Stetten F., Scherer S.* Reliable and rapid identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* species by artificial neural network-based Fourier transform infrared spectroscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72:994–1000.
26. *Rebuffo-Scheer C.A., Schmitt J., Scherer S.* Differentiation of *Listeria monocytogenes* serovars by using artificial neural network analysis of Fourier-transformed infrared spectra. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73:1036–40.
27. *Rodriguez-Saona L.E., Khambaty F.M., Fry F.S., Dubois J., Calvey E.M.* Detection and identification of bacteria in a juice matrix with Fourier transform-near infrared spectroscopy and multivariate analysis. *J. Food Prot.* 2004; 67(11):2555–9.
28. *Sivaprakasam V., Huston A.L., Scotto C., Eversole J.D.* Multiple UV wavelength excitation and fluorescence of bioaerosols. *Optics Express.* 2004; 12(19):4457–66.
29. *Stopa P.J., Tieman D., Coon P.A., Milton M.M., Paterno D.* Detection of biological aerosols by luminescence techniques. *Field Anal. Chem. Technol.* 1999; 3:283–90.
30. *Wenning M., Seiler H., Scherer S.* Fourier-transform infrared microspectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68:4717–21.
31. *Yalçın Duygu D., Baycal T., Açıkgöz İ., Yıldız K.* Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy for Biological Studies. *G.U. Journal of Science.* 2009; 22(3):117–21.
32. *Zhang X., Yonzon C.R., Van Duyne R.P.* An electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy approach to anthrax detection. *Proc. SPIE.* 2003; 5221:82–91.
33. *Zhang X., Young M.A., Lyandres O., Van Duyne R.P.* Rapid detection of an anthrax biomarker by surface-enhanced Raman spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 2005; 127:4484–9.

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

1. *Zlobin V.I., Evstigneev V.I.* [Specific and non-specific indication of microorganisms in the environment]. *Vest. Ross. Acad. Med. Nauk.* 2002; 11:37–42.
2. [Practical Guide for Training of Bacteriologists and Epidemiologists on the Problems of Bioterrorism Counteraction]. *Volgograd;* 2004. 233 p.
3. *Squirrell D.J.* [Cellular material detection in gaseous medium apparatus and method]. *Patent PCT/GB1995/00544.* 28.09.1995.

Authors:

Utkin D.V., Kouklev V.E., Erokhin P.S., Ossina N.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Уткин Д.В., Куклев В.Е., Ерохин П.С., Осина Н.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 15.10.10.

С.А.Щербакова¹, Е.В.Найденова¹, Е.А.Билько¹, Е.А.Водина², Т.Е.Логунова², Л.П.Потемина²,
В.В.Кутырев¹

ВЫЯВЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К АРБОВИРУСАМ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ ЛЮДЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

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

²ГУЗ Саратовский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями

Данная работа является продолжением ранее проводимых на территории Саратовской области исследований сывороток крови людей с целью выявления специфических антител к арбовирусам. В работе представлены результаты исследований сывороток крови людей и сельскохозяйственных животных, собранных в различных природно-климатических зонах Саратовской области, на наличие иммуноглобулинов класса G к вирусам Тягиня, Батаи, Синдбис, а также клещевого энцефалита, ККГЛ и лихорадки Западного Нила.

Ключевые слова: арбовирусы, иммунная прослойка.

S.A.Shcherbakova, E.V.Naidenova, E.A.Bil'ko, E.A.Vodina, T.E.Logunova, L.P.Potemina, V.V.Kutyrev

Detection of Specific Antibodies to Arboviruses in Blood Sera of People Living in the Territory of the Saratov Region

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov; Saratov Regional Center for AIDS and Infectious Diseases Prophylaxis and Control

This work continues serological surveys previously carried out in the territory of the Saratov Region in order to detect specific antibodies to arboviruses. Presented are the results of analysis of blood sera of humans and agricultural animals collected in different climatic zones of the Saratov Region. Sera were examined for the presence of IgG immunoglobulins specific to the viruses Tahyna, Batai, Sindbis, tick-born encephalitis, CCHV, and West Nile fever.

Key words: arboviruses, seroprevalence rate.

В настоящее время в Российской Федерации наблюдается расширение ареала возбудителей некоторых арбовирусных инфекций. Возможно, это связано с основной экологической проблемой последнего десятилетия – глобальным потеплением климата. Даже незначительные колебания климатических условий приводят к изменению активности и увеличению численности носителей и переносчиков возбудителей, а также варьированию степени их инфицированности. Этот фактор может являться предпосылкой для увеличения эпидемического потенциала существующих природных очагов таких вирусных инфекционных болезней, как Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ) и лихорадка Западного Нила и формирования новых очагов на неэндемичных территориях [2, 3, 4].

Саратовская область территориально граничит с районами, где выявлена циркуляция многих арбовирусов, в частности ККГЛ (Крымской-Конго геморрагической лихорадки) и Западного Нила, и где ежегодно регистрируются случаи заболеваний людей (Волгоградская область и Республика Казахстан), а также заболевания клещевым энцефалитом (Самарская область) [1, 2, 3, 4]. Природно-климатические условия, разнообразие видового состава членистоногих и позвоночных животных обуславливают возможность распространения данных арбовирусов на территории Саратовской области.

Комплексное энтомолого-эпизоотологическое

обследование, проводимое в течение последнего десятилетия (2000–2010 гг.), выявило присутствие антигенов арбовирусов серогруппы калифорнийского энцефалита (СКЭ) (Тягиня и Инко), Батаи, Синдбис, Западного Нила, ККГЛ, клещевого энцефалита, что свидетельствует о возможной циркуляции указанных возбудителей на данной территории [5, 6].

Одним из факторов, подтверждающих циркуляцию арбовирусов на определенных территориях и наличие на этих территориях природных очагов арбовирусных инфекций, является выявление антител к возбудителю как в сыворотках крови людей, проживающих на этой территории, так и сельскохозяйственных животных [4, 7].

Ранее при исследовании сывороток крови жителей Саратова были выявлены специфические антитела и установлено наличие иммунной прослойки к вирусам СКЭ, Батаи, Синдбис, вызывающим лихорадочные заболевания у людей и распространенным в лесостепной и степной ландшафтно-климатических зонах, а также к вирусам Западного Нила и ККГЛ, циркуляция которых осуществляется в южных регионах Российской Федерации, относящихся к полупустынной зоне [5].

Целью работы было изучение уровня иммунной прослойки к арбовирусам среди людей, проживающих в различных природно-климатических зонах Саратовской области, а также сельскохозяйственных животных.

Материалы и методы

1028 образцов крови людей были получены в августе–сентябре (т.е. после окончания эпидсезона) 2006, 2008 и 2009 гг. (542, 298 и 188 соответственно). Кроме того, были собраны 223 сыворотки крови крупного рогатого скота (КРС). Материал исследовали методом иммуноферментного анализа (ИФА) для выявления антител класса G к вирусам Тягиня, Батаи, Синдбис, Западного Нила и ККГЛ. Образцы крови людей тестировали с использованием ИФА-тест-систем производства НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН (Москва) и ЗАО «Вектор-БЕСТ» (Кольцово, Новосибирская обл.) в соответствии с прилагаемыми к препаратам инструкциями, а сыворотки крови КРС изучали в модифицированном варианте ИФА с ингредиентами тех же тест-систем.

Результаты и обсуждение

Всего обследовано 1028 образцов крови жителей Саратовской области. Выявлено 78 проб (7,6 %), содержащих антитела к арбовирусам. При этом антитела к вирусу Западного Нила и Батаи были выявлены в 12 образцах, что составило по 1,2 %, к вирусу ККГЛ – в 15 пробах (1,5 %) и столько же проб содержали антитела к вирусу Синдбис (1,5 %), в 18 образцах зарегистрированы специфические антитела к вирусам СКЭ (1,8 %), в 6 пробах (0,6 %) – к вирусу клещевого энцефалита (табл. 1).

Положительные результаты, в большинстве случаев, были получены при исследовании материала, собранного от людей, проживающих в полупустынной климатической зоне – 19 из 134 обследованных (14,1 %). Однако антитела к вирусам Синдбис, Батаи и СКЭ регистрировались в единичных случаях (0,7–2,2 %), в то время как уровень иммунной прослойки к вирусам Западного Нила и ККГЛ был значительно выше (3,7 и 5,9 % соответственно). Специфические иммуноглобулины к вирусу клещевого энцефалита в сыворотках крови людей, проживающих в полупустынной зоне Саратовской области, не обнаружены.

При исследовании сывороток крови людей, живущих в районах, относящихся к степной зоне (626 исследованных проб), было зарегистрировано 37 положительных проб (5,9 %), из которых 11 (1,8 %) образцов, содержали антитела к вирусу Синдбис, 7 (1,1 %) – к вирусу ККГЛ, 9 – к вирусам СКЭ (1,4 %),

6 (0,9 %) – к вирусу Западного Нила и 4 (0,6 %) – к вирусу Батаи. Антител к вирусу клещевого энцефалита в сыворотках крови людей, проживающих в степной зоне, не обнаружено.

Тестирование 268 сывороток крови, полученных от населения из районов лесостепной зоны, позволило выявить 23 образца (8,6 %), содержащих антитела к арбовирусам. При этом антитела к вирусам Западного Нила и Синдбис были обнаружены в единичных пробах (0,4 и 1,1 % соответственно). Антител к вирусу ККГЛ в этом пуле сывороток крови не выявлено. Зарегистрировано 2,6 % проб, содержащих антитела к вирусам СКЭ и 2,2 % проб, положительно реагирующих с антигеном вируса Батаи. Необходимо отметить, что самые высокие показатели уровня иммунной прослойки были к вирусам СКЭ и Батаи (по сравнению с данными, полученными при исследовании материала из других природно-климатических зон).

Впервые при проведении серологических исследований в сыворотках крови людей, проживающих в лесостепной зоне, выявлены специфические антитела к вирусу клещевого энцефалита (2,2 %), что может указывать на возможную циркуляцию этого возбудителя в отдельных районах области.

Анализ полученных данных показал наличие иммунной прослойки среди населения области к арбовирусам: СКЭ, Батаи, Синдбис, Западного Нила, ККГЛ, клещевого энцефалита.

Особого внимания заслуживают данные о выявлении в сыворотках крови жителей Саратовской области специфических антител к вирусам ККГЛ и Западного Нила. До настоящего времени на территории области случаи заболевания КГЛ и лихорадкой Западного Нила не регистрировались. Однако серопозитивные реакции свидетельствуют о циркуляции этих возбудителей и возможном заражении людей, что, скорее всего, связано с активизацией природных очагов этих инфекций на сопредельных с областью территориях (Волгоградская область и Республика Казахстан). В связи с этим актуален вопрос о внедрении в практику здравоохранения Саратовской области диагностики арбовирусных инфекционных болезней, в том числе лихорадки Западного Нила и ККГЛ, тем более, что в предыдущих исследованиях были получены данные, указывающие на циркуляцию возбудителей этих инфекций в южных регионах области [5, 6].

Требуют дальнейшего изучения и вопросы цирку-

Таблица 1

Выявление антител к арбовирусам в сыворотках крови жителей Саратовской области в разные годы исследований

Год	Кол-во исследованных образцов	Кол-во положительных проб, %	Кол-во проб (%), содержащих антитела к вирусам:					
			Западного Нила	ККГЛ	Батаи	Тягиня	Синдбис	клещевого энцефалита
2006	542	42 (7,7)	5 (0,9)	12 (2,2)	5 (0,9)	8 (1,5)	12 (2,2)	0 (0,0)
2008	298	21 (7,0)	7 (2,3)	3 (1,0)	4 (1,3)	5 (1,7)	2 (0,7)	0 (0,0)
2009	188	15 (8,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (1,6)	5 (2,7)	1 (0,5)	6 (3,2)
<i>Итого</i>	1028	78 (7,6)	12 (1,2)	15 (1,5)	12 (1,2)	18 (1,8)	15 (1,5)	6 (0,6)

Выявление антител в сыворотках крови КРС

Кол-во исследуемых проб	Кол-во проб (%), содержащих антитела к вирусу:					Общее количество положительных проб, %
	Западного Нила	Синдбис	Батаи	Тягиня	ККГЛ	
Полупустынная зона						
70	1 (1,4)	0	1 (1,4)	0	2 (2,8)	4 (5,7)
Степная зона						
100	4 (4,0)	2 (2,0)	10 (10,0)	16 (16,0)	2 (2,0)	34 (34,0)
Лесостепная зона						
53	2 (3,8)	0	9 (16,9)	1 (1,9)	0	12 (22,6)
Итого						
223	7 (3,1)	2 (0,9)	20 (8,9)	17 (7,6)	4 (1,8)	50 (22,4)

ляции вируса клещевого энцефалита, на возможность которой указывают данные выявления сывороток крови, содержащих специфические антитела к этому вирусу, что, вероятно, также связано с расширением ареала возбудителя и этой арбовирусной инфекции.

Помимо сывороток крови людей, нами были исследованы сыворотки крови КРС. В образцах крови сельскохозяйственных животных, собранных в лесостепной зоне, выявлены антитела к вирусам Западного Нила, Тягиня и Батаи. В пробах, полученных из степной зоны, обнаружены антитела к вирусам Западного Нила, Синдбис, Тягиня, Батаи и ККГЛ. В материале из полупустынной зоны – к вирусам Западного Нила, Батаи и ККГЛ. Антитела к вирусам ККГЛ выявлены в 4 случаях (1,8 %), Западного Нила – в 7 (3,1%), Батаи – в 20 (8,9 %), Тягиня – в 17 (7,6 %) и Синдбис – в 2 (0,9 %) (табл. 2).

Выявление наиболее высокого уровня иммунной прослойки в популяции КРС к вирусам Тягиня и Батаи объясняется особенностями экологии этих вирусов [7]. Получены данные, подтверждающие циркуляцию на территории Саратовской области вирусов ККГЛ, Западного Нила, клещевого энцефалита, СКЭ, Батаи, Синдбис.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможной циркуляции на территории южных районов Саратовской области, относящихся к степной и полупустынной природно-климатическим зонам, вируса ККГЛ, а в лесостепной зоне – вируса клещевого энцефалита. Подтверждены результаты ранее проведенных исследований о циркуляции на территории области вирусов Западного Нила, СКЭ, Батаи и Синдбис. Выявление иммунной прослойки к арбовирусам в сыворотках крови КРС является подтверждением циркуляции арбовирусов на территории Саратовской области. Так же, учитывая эпидемическую значимость таких вирусов, как ЗН, ККГЛ, клещевого энцефалита, и способность вирусов Синдбис, Батаи и СКЭ вызывать спорадическую заболеваемость, необходимо продолжить изучение вопроса о роли арбовирусов в краевой инфекционной патологии, для чего необходимы организация и проведение ежегодного мониторинга арбовирусов на территории Саратовской области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бердыкул-улы А., Тойлыбаева Г.А., Калига В.Ф. и др. Вопросы эпидемиологии Конго-Крымской геморрагической лихорадки на территории Южно-Казахстанской области. Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. Алматы; 2001; 4:86–8.
2. Львов Д.К., редактор. Медицинская вирусология. М: МИА; 2008. 548 с.
3. Онищенко Г.Г., Ефременко В.И., Бейер А.П., Брюханова Г.Д. и др. Обстановка по Крымской геморрагической лихорадке в Южном Федеральном округе. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005; 4(приложение):5–12.
4. Титенко А.М. Факторы, способствующие появлению и обнаружению новых вирусных инфекций. Эпидемиол. и инф. бол. 2004; 1:51–5.
5. Щербаклова С.А., Билько Е.А., Ключева Е.В. и др. Особенности экологии и ландшафтного распространения арбовирусов на территории Саратовской области. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005; 5:27–30.
6. Щербаклова С.А., Головинская О.Н., Ключева Е.В. и др. Результаты исследования сывороток крови населения Саратова на антитела к арбовирусам. Вopr. вирусол. 2002; 3:32–4.
7. Shope R.E. Arboviral zoonoses in Western Europe. In: Handbook of zoonoses. Section B: Viral. Boca Raton: CRC Press; 1994. P. 227–35.

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

1. Berdykul-uly A., Toilybaeva G.A., Kaliga V.F. et al. [Epidemiological issues of Crimean-Congo hemorrhagic fever in the territory of the South Kazakhstan Region]. Karantin. Zoonoz. Inf. Kazakhstan. 2001; 4:86–8.
2. L'vov D.K., editor. [Medical Virology]. M.: MIA; 2008. 548 p.
3. Onishchenko G.G., Efremenko V.I., Beier A.P., Bryukhanova G.D. et al. [Situation on Crimean hemorrhagic fever in the South Federal District] Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2005; 4 (Suppl.): 5–12.
4. Titenko A.M. [Factors promoting emergence and detection of new viral infections]. Epidemiol. Inf. Bol. 2004; 1: 51–5.
5. Shcherbakova S.A., Bil'ko E.A., Klueva E.V., Danilov A.N., Plotnikova E.A., Tarasov M.A. et al. [The ecology and prevalence of arboviruses on the territory of the Saratov Region]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2005; 5:27–30.
6. Shcherbakova S.A., Golovinskaya O.N., Klueva E.V., Garanina S.V., Savitskaya L.V., Kulichenko A.N., Kutyrev V.V. [Anti-arbovirus antibodies-positive serum screening in population of Saratov]. Vopr. Virusol. 2002; 3: 32–4.

Authors:

Shcherbakova S.A., Naidenova E.V., Bil'ko E.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru
Vodina E.A., Logunova T.E., Potemina L.P. Saratov Regional Center for AIDS and Infectious Diseases Prophylaxis and Control. Melnichnaya St., 69, Saratov, 410009, Russia.

Об авторах:

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

Водина Е.А., Логунова Т.Е., Потемина Л.П. Саратовский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями. 410009, Саратов, ул. Мельничная, 69.

Поступила 11.03.11.

УДК 616.988.21

Е.Г.Абрамова¹, Н.Н.Кочкалова¹, А.К.Никифоров¹, А.Ю.Бутырский², Ю.В.Иванов¹,
Н.В.Синицына¹, Т.А.Михеева¹, Л.Н.Минаева¹, М.В.Галкина¹, Л.В.Савицкая¹, С.В.Генералов¹,
М.Н.Киреев¹, Н.А.Шарапова¹

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО ПРЕПАРАТА АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА И ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО ОСНОВНЫХ СВОЙСТВ

¹ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов;
²Государственный институт стандартизации и контроля им. Л.А.Тарасевича, Москва

Представлены данные по изучению физико-химических и биологических характеристик лиофилизированной формы гетерологичного антирабического иммуноглобулина. Проведен сравнительный анализ свойств сухой и исходной жидкой формы иммуноглобулина. Установлено, что лиофилизат сохраняет основные свойства в процессе длительного хранения.

Ключевые слова: гетерологичный антирабический иммуноглобулин, лиофилизация, специфическая активность, стабильность.

E.G.Abramova, N.N.Kochkalova, A.K.Nikiforov, A.Yu.Butyrskii, Yu.V.Ivanov, N.V.Sinitsyna, T.A.Mikheeva,
L.N.Minaeva, M.V.Galkina, L.V.Savitskaya, S.V.Generalov, M.N.Kireev, N.A.Sharapova

Production of Lyophilized Preparation of Anti-Rabies Immunoglobulin and Examination of Its Main Properties

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

Presented are data on examination of physical, chemical and biological characteristics of lyophilized preparation of heterologous anti-rabies immunoglobulin. Dry and original liquid forms of immunoglobulin were comparatively analyzed. The lyophilized form was shown to preserve main properties during long-term storage.

Key words: heterologous anti-rabies immunoglobulin, lyophilization, specific activity, stability.

Современное многообразие лекарственных средств, их высокая эффективность в лечении и профилактике многих инфекционных заболеваний обуславливает большое внимание исследователей к проблеме обеспечения стабильности медицинских иммунобиологических препаратов в процессе хранения. Одним из способов решения этого вопроса является лиофилизация готового препарата.

В настоящее время РосНИПЧИ «Микроб» выпускает препарат гетерологичного антирабического иммуноглобулина (АИГ) в жидкой форме. Известно, что жидкая форма иммуноглобулиновых препаратов, применяемых в лечебных целях, наиболее экономична и удобна для использования потребителем. Однако жидкие формы лечебных иммуноглобулинов обладают рядом существенных недостатков: меньшей стабильностью во время длительного хранения, возможным снижением титров специфических антител, опасностью образования агрегатов, более жесткими требованиями к транспортировке [7]. Российская Федерация, в отличие от стран Европы, характеризуется значительной протяженностью транспортных путей до потребителя, и лиофилизация, помимо обеспечения стабильности молекулярных параметров и специфической активности, позволит создать наибо-

лее оптимальные условия для предотвращения агрегации и фрагментации белков в процессе хранения, мало зависящие от способов транспортировки.

В последние годы в мировой практике наблюдается тенденция в сторону увеличения выпуска лиофильно высушенных иммуноглобулиновых препаратов, применяемых для лечебных целей. Так, в США ведущим контрольным медицинским органом – Управлением по контролю за качеством пищевых продуктов, медикаментов и косметических средств (FDA) сертифицировано шесть лиофилизированных внутривенных препаратов против двух в жидкой форме. Трехкратное превышение зарегистрированных лиофилизированных форм над жидкими объясняется очень жесткими международными требованиями, предъявляемыми к стабильности иммуноглобулиновых препаратов.

Согласно Европейской Фармакопее (2004 г.), для лечебных лиофилизированных иммуноглобулинов, в отличие от жидких препаратов, допускается хранение при более высокой температуре – до 25 °С. Кроме того, при хранении лиофилизированного препарата отсутствуют поверхности взаимодействия: воздух-жидкость, твердое тело (стекло) – жидкость, характерные для жидкого МИБП. Высокий негативный

заряд стекла может вызвать усиленную агрегацию иммуноглобулиновых препаратов, которую также можно предупредить лиофилизацией. В иммуноглобулинах, приготовленных путем фракционирования иммунных сывороток спиртом, всегда содержится некоторое количество сывороточных протеаз типа фибринолизина и тканевых катепсинов, которые способны вызывать расщепление иммуноглобулина с образованием низкомолекулярных фрагментов [5, 6, 7]. Установлено, что жидкие иммуноглобулины содержат, как правило, некоторое количество продуктов распада, а лиофилизированные – значительно меньше [7]. Следовательно, лиофилизация считается пока лучшим способом достижения стабильности всех качественных показателей иммуноглобулинов, сохраняющих эффективность препаратов в процессе длительного времени [1, 2].

В соответствии со спецификацией на препарат жидкого антирабического иммуноглобулина, выпускаемого РосНИПЧИ «Микроб», срок его хранения – 1 год 6 месяцев. Разработка лиофилизированной формы препарата, безусловно, позволит увеличить этот срок, что является актуальным в связи с высокой востребованностью препарата на Российском фармацевтическом рынке.

Целью настоящей работы явилось получение лиофилизированной формы антирабического иммуноглобулина и изучение ее качественных характеристик на момент выпуска и в процессе хранения.

Материалы и методы

В ходе выполнения работы были получены и исследованы свойства 11 экспериментальных серий лиофилизированного препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина: 002, 009, 012–014, 019, 031–033, 037, 055. Исходные серии жидкого антирабического иммуноглобулина полностью соответствовали требованиям ФСП на препарат.

Жидкий иммуноглобулин разливали по 1 мл в стеклянные ампулы, замораживали при температуре минус $(45 \pm 2)^\circ\text{C}$ на холодильной установке NZ-250/75 и лиофильно высушивали на установке LZ-9, «Фригера» (Чехия).

Внешний вид таблетки в ампуле и растворимость сухого препарата оценивали визуальным методом. Определение потери в массе при высушивании (остаточную влажность) проводили весовым методом согласно ФС 42-3874-99 «Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов» [9], pH определяли потенциометрически согласно ГФ XII, вып. 1 [3]. Прозрачность в сухом препарате после растворения определяли спектрофотометрически согласно ФС 42-3874-99 [9]. Содержание белка определяли методом с биуретовым реактивом согласно ФС 42-3874-99 [9].

Уровень специфической активности жидкого и лиофилизированного препарата антирабического

иммуноглобулина определяли двумя способами – *in vivo* биологическим методом в реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышках [10] и *in vitro* методом дот-иммуноанализа с применением иммуносуспензионной тест-системы на основе наночастиц коллоидного золота. Определение специфической активности *in vivo* было проведено с введением в опыт одновременно иммуноглобулина исходной жидкой и лиофилизированной форм и отраслевого стандартного образца ОСО 42-28-200-04 специфической активности антирабического иммуноглобулина ГИСК им. Л.А.Тарасевича. Статистическую обработку проводили по методу Reed и Muench [10]. Вируснейтрализующую активность лиофилизированного антирабического иммуноглобулина – кандидата в ОСО специфической активности определяли в сравнении с международным стандартом специфической активности антирабического иммуноглобулина.

В качестве стабилизатора, предупреждающего процессы повреждения белка при лиофилизации, использовали гликокол (глицин) в концентрации $(2,25 \pm 0,25)\%$. Данный протектант наиболее широко применяется в биотехнологической практике при лиофилизации лечебных иммуноглобулинов, предполагающих внутримышечное введение [4].

Результаты и обсуждение

Для подбора оптимального режима лиофилизации было высушено 7 экспериментальных образцов 3 серий антирабического иммуноглобулина при различных режимах – 24, 36 и 48 ч (табл. 1). Все лиофилизаты представляли собой хорошо сформированную таблетку белого цвета мелкопористой структуры, потеря в массе при высушивании или остаточная влажность составила в среднем 0,5 %, что соответствует требованиям Европейской Фармакопеи на лиофилизированный лечебный иммуноглобулин, согласно которой данный параметр не должен превышать 3,0 %. Практически все образцы высушенного иммуноглобулина характеризовались хорошей растворимостью – в среднем 2 мин (по Европейской Фармакопее – не более 10 мин). Значение концентрации водородных ионов для всех образцов сухого препарата АИГ соответствовало требованиям ФСП на жидкий препарат – от 6,6 до 7,4.

Прозрачность растворенного после лиофилизации антирабического иммуноглобулина в основном не претерпела значительных изменений по сравнению с жидкой формой. Данный показатель соответствовал требованиям ФСП на жидкий антирабический иммуноглобулин – не более 0,05. Однако в иммуноглобулине, высушенном в течение 24 ч, показатель прозрачности возрос по сравнению с жидкой формой и вышел за пределы нормы в образце экспериментальной серии 033 – соответственно 0,055 и 0,015. Возможно, режим интенсивного высушивания способствует формированию нерастворимых агрегатов, о чем свидетельствуют показатели прозрачности

Таблица 1

Характеристика физико-химических и биологических свойств лиофилизированного антирабического иммуноглобулина, высушенного при различных режимах

Серия препарата АИГ	Описание	Режим лиофилизации, ч	Растворимость, мин	Потеря в массе при высушивании, %	Прозрачность жидкого иммуноглобулина	Прозрачность после растворения сухого препарата	Содержание белка в жидком препарате, %	Содержание белка в сухом препарате, %
031	Однородная мелкопористая масса белого цвета	24	2	0,8	0,022	0,028	9,9	8,9
	«	48	1	0,25	0,022	0,032	9,9	8,9
032	«	24	2	1,03	0,018	0,034	9,9	8,9
	«	36	2	0,125	0,018	0,021	9,9	8,99
	«	48	2	0,125	0,018	0,016	9,9	9,2
033	«	24	1	1,03	0,015	0,055	9,9	8,4
	«	48	2	0,035	0,015	0,022	9,9	8,8

препарата после растворения, и данный режим менее благоприятен для белковой молекулы. Результаты определения белка в лиофилизатах показали, что содержание целевых антител в исследованных образцах антирабического иммуноглобулина после лиофилизации претерпело изменение в сторону снижения в среднем на 10 %, однако наименьший уровень потери белка наблюдали в препаратах, высушенных в течение 36 и 48 ч.

Сравнивая показатели физико-химических и биологических параметров препарата, высушенного при различных режимах, можно сделать предварительный вывод о том, что высушивание иммуноглобулина в течение 24 ч наименее предпочтительно, поскольку показатели прозрачности и содержания белка в таких препаратах уступают аналогичным у препаратов, высушенных в течение 36 и 48 ч. Следовательно, лиофилизация при пониженной скорости удаления воды является более щадящим способом, чем лиофилизация при быстром удалении воды, когда происходит повреждающее воздействие на структуру белковой молекулы за счет столкновений молекул водяного пара с молекулами белков.

Основным биологическим свойством как жидкого, так и лиофилизированного препарата антирабического иммуноглобулина является специфическая активность. Данный показатель отражает напряженность создаваемого пассивного иммунитета в организме пациента, получающего антирабическую

помощь в виде комбинированного введения антирабического иммуноглобулина и антирабической вакцины. Согласно ФСП на препарат, этот показатель должен составлять не менее 150 МЕ при исследовании в биологической реакции нейтрализации при участии в ней от 100 до 1000 LD₅₀ вируса бешенства.

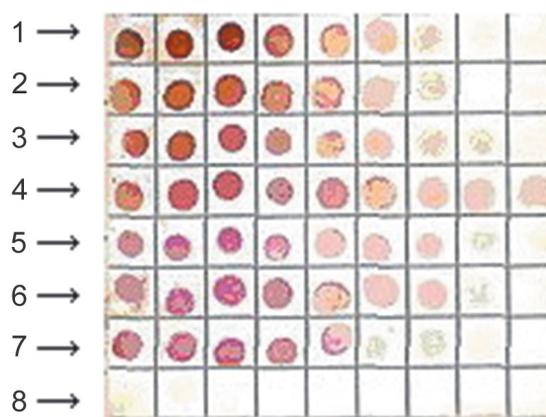
Как показали результаты реакции нейтрализации, лиофилизированный антирабический иммуноглобулин экспериментальных серий 037 и 055 обладает уровнем специфической активности в 419 и 382 МЕ соответственно при титре вируснейтрализующих антител 1:11061 против 632 ЛД₅₀ фиксированного вируса бешенства CVS и 1:11220 против 737,8 ЛД₅₀. На этом же уровне и специфическая активность исходного препарата жидкой формы – 512 и 448 МЕ соответственно для серий 037 и 055 (табл. 2).

В рамках темы «Разработка национального стандартного образца специфической активности антирабического иммуноглобулина» была изготовлена экспериментальная лиофилизированная серия 055, образцы которой являются кандидатами в ОСО специфической активности антирабического иммуноглобулина ГИСК им. Л.А.Тарасевича. В лаборатории бешенства и оспы ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича (Москва) был проведен контроль специфической активности экспериментального лиофилизата путем постановки реакции нейтрализации на белых мышцах в сравнении с Международным стандартом (The International Standard for Rabies immunoglobulin)

Таблица 2

Специфическая активность лиофилизированного антирабического иммуноглобулина

Серия АИГ	Форма АИГ	Норма по НД, МЕ/мл	Референс-образец	Специфическая активность в РН	
				защитный титр	МЕ/мл
37 (исх.)	Жидкий	не менее 150	ОСО 42-28-200-04 специфической активности ГИСК им. Л.А.Тарасевича	1:13536	512
037	Лиофилизат	«	«	1:11061	419
55 (исх.)	Жидкий	«	«	1:5470	448
055	Лиофилизат	«	«	1:11220	382
055/1	Лиофилизат	«	The International Standard for Rabies immunoglobulin	1:3034	179
055/2	Лиофилизат	«	«	1:3366	199



Активность лиофилизованного препарата антирабического иммуноглобулина, определяемая *in vitro* в дот-иммуноанализе:

По оси абсцисс: разведения АИГ и нормальной лошадиной сыворотки (НЛС), начиная с 1:160; по оси ординат: 1–7 ряды – образцы сухих серий 002, 009, 012, 013, 014, 019, 032, 8 ряд – НЛС (отрицательный контроль)

с активностью 59 МЕ в ампуле. Полученные результаты специфической активности соответствуют требованиям ВОЗ для антирабических иммуноглобулинов – не менее 150 МЕ/мл (табл. 2).

На рисунке представлены данные по определению уровня специфической активности у лиофилизованного АИГ серий 002, 009, 012, 013, 014, 019, 032 *in vitro* в дот-иммуноанализе.

В зависимости от серии препарата, уровень активности колебался от 1:5000 до 1:20000, для серии 013 – 1:40000. Следует отметить, что образцы указанных серий были исследованы после хранения в течение пяти (серия 002), трех (серии 009, 012–014, 019) и двух лет (серия 032).

Результаты определения активности образцов лиофилизованного иммуноглобулина в тестах *in vivo* и *in vitro* свидетельствуют о том, что препарат, подвергшийся лиофилизации, в полной мере сохранил способность к нейтрализации вируса бешенства как на момент получения, так и после длительного хранения. Применение гликокола в качестве протектанта вполне приемлемо для предотвращения повреждающего действия при лиофилизации антирабического иммуноглобулина.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов получена лиофилизованная форма препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина, физико-химические и биологические параметры которой соответствуют требованиям Европейской Фармакопеи на лиофилизированный лечебный иммуноглобулин и ФСП на жидкий антирабический иммуноглобулин. В процессе хранения от 3 до 5 лет сухой препарат стабилен в отношении показателей растворимости, прозрачности, активности. Это указывает на наличие принципиальной возможности получения препарата в сухой лекарственной форме. Лиофилизованная форма препарата позволит не только увеличить срок годности препарата, но также

избежать проблем, связанных с жесткими требованиями к транспортированию жидких препаратов, что весьма актуально для Российской Федерации с ее протяженными транспортными путями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воронин Е.С., редактор. Биотехнология. СПб.: ГИОРД; 2005. 792 с.
2. Бланков Б.И., Клебанов Д.Л. Применение лиофилизации в микробиологии. М.: Медицина; 1961. 263 с.
3. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XII издание. Ч. 1. М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения; 2008. 704 с.
4. Краснопольский Ю.М., Борщевская М.И. Биотехнология иммунобиологических препаратов. Харьков: Фармитэк; 2008. 312 с.
5. Лантеева Л.К., Минакова Л.В., Гавриленкова В.Ю. Сохраняемость специфических антител в иммуноглобулине человека противостолбнячному в зависимости от степени фрагментации IgG. Стандарты, штаммы и методы контроля бактериальных и вирусных препаратов. М., 1987. 4:148–53.
6. Никитина В.Д., Холчев Н.В., Колесникова Л.И. и др. Исследование фрагментации препаратов гамма-глобулинов, выпускаемых в СССР. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1975; 1:44–8.
7. Терновой А.П. Вопросы иммунологии инфекционных и аллергических заболеваний Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1971; 3:140–4.
8. Условия транспортирования и хранения медицинских иммунобиологических препаратов. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.3.2.1248-03. М.: Минздрав России; 2003. 19 с.
9. Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов. Фармакопейная статья ФС 42-3874-99. М.: Фармакопейный государственный комитет; 2000. 77 с.
10. 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. Voronin E.S., editor. [Biotechnology]. SPb.: GIORД; 2005. 792 p.
2. Blankov B.I., Klebanov D.L. [Application of Lyophilization in Microbiology]. M.: Meditsina; 1961. 263 p.
3. [State Pharmacopeia of the Russian Federation]. 12th ed. M.: Izd-vo "Nauch. Tsentr Ekspert. Sredstv Med. Primen."; 2008. 704 p.
4. Krasnopol'skii Yu.M., Borshchevskaya M.I. [Biotechnology of Immunobiological Preparations]. Kharkov: Izd-vo "Farmitek"; 2008. 312 p.
5. Lanteeva L.K., Minakova L.V., Gavrilenkova V.Yu. [Preservation capacity of specific antibodies in human anti-tetanus immunoglobulin depending on the degree of IgG fragmentation]. In: [Standards, Strains and Control Methods of Bacterial and Viral Preparations]. M.; 1987. P. 148–53.
6. Nikitina V.D., Kholchev N.V., Kolesnikova L.I. et al. [Examination of fragmentation of gamma-globulin preparations manufactured in the USSR]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1975; 1:44–8.
7. Ternovoi A.P. [Issues of immunology of infectious and allergic diseases]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1971; 3:140–4.
8. [Sanitary and Epidemiological Regulations "Conditions of Transportation and Storage of Medical Immunobiological Preparations" SR 3.3.2.1248-03]. M.: Minzdrav RF; 2003. 19 p.
9. [Physico-Chemical, Physical, Chemical and Immunochemical Methods of Control of Medical Immunobiological Preparations]. Pharmacopeia Monograph FS 42-3874-99. M.: Minzdrav RF; 2000. 77 p.

Authors:

Abramova E.G., Kochkalova N.N., Nikiforov A.K., Ivanov Yu.V., Sinitsyna N.V., Mikheeva T.A., Minaeva L.N., Galkina M.V., Savitskaya L.V., Generalov S.V., Kireev M.N., Sharapova N.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru
Butyrskii A.Yu. L.A. Tarasevich State Institute for Standardization and Control. Moscow.

Об авторах:

Абрамова Е.Г., Кочкалова Н.Н., Никифоров А.К., Иванов Ю.В., Синицына Н.В., Михеева Т.А., Минаева Л.Н., Галкина М.В., Савицкая Л.В., Генералов С.В., Киреев М.Н., Шаранова Н.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru
Бутырский А.Ю. Государственный институт стандартизации и контроля им. Л.А.Тарасевича. Москва.

Поступила 02.04.10.

Т.В.Аленкина, О.С.Зинина, М.В.Антонычева, Н.И.Вахрушина, А.К.Никифоров

ОПТИМИЗАЦИЯ СТАДИИ РЕПРОДУКЦИИ В ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА БАКТЕРИОФАГА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ЧУМНОГО Л-413С

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

Впервые для изготовления диагностического препарата чумного бактериофага Л-413С были использованы новые питательные среды на основе автолизата пекарских дрожжей. Экспериментальные среды обеспечивали высокую концентрацию фаговых частиц на этапе размножения и хорошую выживаемость при лиофилизации. Большую эффективность показали среды, в которых дрожжевой автолизат являлся питательной белковой основой, а не стимулирующей добавкой. Такие препараты сохраняли стабильность свойств в процессе хранения при температуре 4–8 °С, а также при повышенной температуре в «тесте ускоренного старения». Внедрение дрожжевых питательных сред в технологию изготовления бактериофага диагностического чумного Л-413С открывает хорошие перспективы для повышения эффективности производства и снижения себестоимости препарата.

Ключевые слова: диагностические бактериофаги, чумной бактериофаг Л-413С, автолизат пекарских дрожжей, репродукция фагов.

T.V.Alenkina, O.S.Zinina, M.V.Antonycheva, N.I.Vakhrushina, A.K.Nikiforov

Optimization of Reproduction Stage in Technology of Production of Plague Diagnostic Bacteriophage L-413C

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

New nutrient media based on baker yeast autolizate were used for the first time for manufacturing of diagnostic preparation of plague bacteriophage L-413C. Experimental media provide high concentration of phage particles at the stage of propagation, and good survivability in lyophilization. Media in which yeast autolizate was a nutrient protein basis appeared to be more effective than those in which it was a stimulating additive. Phage preparations preserved stability of properties during storage at 4–8 °C, and at a higher temperature in the test of "accelerated aging". Introduction of yeast nutrient media in technology of plague diagnostic bacteriophage L-413C manufacturing opens good prospects for increasing of production efficiency and decreasing of cost value of the preparation

Key words: diagnostic bacteriophages, plague bacteriophage L-413C, baker yeasts autolizate, propagation of phages.

В сфере производства диагностических бактериофагов актуальной задачей совершенствования технологического процесса является разработка эффективных питательных сред для культивирования штаммов-продуцентов и репродукции бактериофагов. Репродукция бактериофага целиком зависит от химического состава питательной среды, так как фаговая частица не способна синтезировать аминокислоты и нуклеотиды [2]. Процесс культивирования бактериофагов предполагает создание с помощью питательных сред благоприятных условий для размножения фаговых частиц. От качества среды зависит стабильность свойств (прежде всего жизнеспособность) маточных культур производственных фагов, а также жидких препаратов бактериофагов в течение всего срока годности.

Наиболее распространенными питательными средами в производстве как диагностических, так и лечебных бактериофагов, являются дорогостоящие и недостаточно стандартные среды на основе животного сырья. Вместе с тем в микробиологии давно применяются альтернативные основы питательных сред, в том числе экстракты и гидролизаты пивных, пекарских и кормовых дрожжей, являющиеся источниками витаминов группы В и азотистых оснований [3, 5]. Кроме

сохранности основных свойств микроорганизмов, при культивировании на дрожжевых средах обеспечивается высокий выход микробной массы. Помимо этого, добавление дрожжевых компонентов в мясные среды с низким содержанием аминного азота способствует улучшению их ростовых качеств. Дешевизна дрожжевых сред позволяет снижать себестоимость медицинских иммунобиологических препаратов.

В технологии изготовления чумного диагностического бактериофага Л-413С (РосНИПЧИ «Микроб», Рег. уд. № ФСР 2008/03207), предназначенного для идентификации чумного микроба и дифференциации его от возбудителя псевдотуберкулеза, производство маточных культур и наработка производственных объемов бактериофага осуществляется на бульоне Хоттингера, основой которого является гидролизат мясной панкреатический. Дрожжевые среды в производстве чумных бактериофагов не менялись.

Целью работы было изучение эффективности применения дрожжевых сред в технологии изготовления бактериофага диагностического чумного Л-413С и оценка возможности замены питательных сред, изготавливаемых на мясном сырье, на среды из автолизата пекарских дрожжей.

Материалы и методы

В качестве основы питательных сред для культивирования штамма-продуцента и воспроизводства бактериофага был использован сухой автолизат пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisia*, технология изготовления которого разработана в ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» [1]. Дрожжевой автолизат являлся полноценной по аминокислотному составу белковой основой и соответствовал требованиям МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред», предъявляемым к бактериологическим питательным средам и их основам.

Испытано 5 вариантов дрожжевой среды. В трех вариантах ДС-1, ДС-2 и ДС-3 дрожжевой автолизат являлся белковой моноосновой, обеспечивающей содержание аминного азота в питательной среде – 0,25, 0,30 и 0,35 г/л соответственно. В вариантах ДС-4 и ДС-5 дрожжевой автолизат разных серий был использован в качестве стимулирующей добавки (3 %) к питательной среде, приготовленной на основе гидролизата Хоттингера. При этом добавление 1 части дрожжевого автолизата к 2 частям гидролизата Хоттингера обеспечивало содержание аминного азота 1,4 г/л. В состав всех дрожжевых сред входили $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (х.ч., Россия) – 1 г/л, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ – 0,5 г/л (Fluka, Германия), NaCl (х.ч., Россия) – 1,5 г/л.

В качестве контрольной среды использовали 2 серии бульона Хоттингера (КС-1, КС-2) с содержанием аминного азота 100 г/л и аналогичными солевыми добавками. Значения рН всех сред находились в пределах $7,2 \pm 0,1$.

Штаммом-продуцентом для бактериофага Л-413С является вакцинный штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ «Государственной коллекции патогенных микроорганизмов III–IV групп ФГБУ ГИСК им. Л.А.Тарасевича» Минздравсоцразвития России.

Размножение бактериофага чумного Л-413С осуществляли при температуре $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. Фаголизат контролировали на полноту лизиса визуально. О завершении стадии репродукции фага Л-413С свидетельствовала прозрачная или слегка опалесцировавшая среда культивирования. Стерилизующую фильтрацию проводили через мембранные фильтры с размером пор 0,2 мкм с последующей постановкой бактериологического контроля на специфическую стерильность препаратов.

Определение концентрации фаговых частиц в 1 мл среды проводили методом агаровых слоев по Грациа, спектр литической активности – методом «стерильного пятна» [2]. Согласно нормативной документации (ТУ 9386-020-01898109-2008 и ПР № 01898109-19-08) жидкий бактериофаг чумной Л-413С должен содержать не менее $1 \cdot 10^6$, сухой – $1 \cdot 10^5$ частиц/мл. При определении спектра литической активности бактериофаг Л-413С должен лизировать штаммы *Y. pestis* и не должен лизировать штаммы *Y. pseudotuberculosis* I–VI сероваров.

Полученные на экспериментальных и контрольных средах серии бактериофага Л-413С разливали по 1 мл в ампулы ШП-5 и лиофилизировали в 24-часовом (серии ДС-1, ДС-4 и КС-1) и 30-часовом (серии ДС-2, ДС-3, ДС-5 и КС-2) режимах со стабилизатором, состоящим из 10 % пептона и 1,5 % желатина.

Результаты и обсуждение

Процесс репродукции бактериофага Л-413С на всех экспериментальных средах характеризовался более выраженной опалесценцией по сравнению с контрольными. Скорость фильтрации через бактериальные фильтры у всех фаголизатов была одинаковой. Бактериофаги после стерилизующей фильтрации представляли собой прозрачную жидкость светло-желтого цвета, независимо от среды размножения. Концентрация фаговых частиц зависела от использованной среды и составляла для сред с белковой моноосновой из дрожжевого автолизата – $2,0 \cdot 10^8$, $4,65 \cdot 10^7$, $4,6 \cdot 10^7$ частиц/мл, а для сред с автолизатом в виде стимулирующей добавки – $4,0 \cdot 10^7$ и $2,59 \cdot 10^7$ частиц/мл соответственно. Урожайность фага на контрольной среде КС-1, КС-2 соответственно составляла $8,4 \cdot 10^7$ и $5,0 \cdot 10^7$ частиц/мл. Таким образом, все изученные питательные среды обеспечивали на этапе репродукции бактериофага чумного Л-413С концентрацию фаговых частиц на 1–2 порядка выше минимально допустимой по нормативной документации (НД). рН жидких препаратов бактериофага, выращенных на средах ДС-1 и ДС-4, составлял 6,55, на остальных экспериментальных средах – 7,2, на контрольных – 7,1. Все препараты были специфически активны в отношении чумного микроба и не лизировали штаммы возбудителя псевдотуберкулеза.

Ллиофилизированные препараты бактериофага чумного Л-413С были изучены по физико-химическим (растворимость, рН, потеря в массе при высушивании) и биологическим (специфическая активность, спектр литической активности) свойствам. Результаты представлены в табл. 1.

Сухие препараты представляли собой аморфную массу светло-коричневого цвета, полностью растворялись в течение 1 мин, после растворения имели вид прозрачной жидкости светло-желтого цвета, что соответствовало требованиям НД. Потеря в массе при высушивании у препаратов, лиофилизированных в течение 24 ч (серии ДС-1, ДС-4 и КС-1), составила 1,75, 1,73, 1,3, а у препаратов, высушенных в течение 30 ч (серии ДС-2, ДС-3, ДС-5 и КС-2), – 0,6, 0,5, 0,4 и 0,4 % соответственно, что также не противоречило требованиям НД – не более 3 %. Количество фаговых частиц в 1 мл при 24-часовом режиме высушивания составляло $8,0 \cdot 10^6$, $1,9 \cdot 10^6$, $3,8 \cdot 10^6$, а во втором случае – $1,6 \cdot 10^6$, $1,0 \cdot 10^6$, $1,0 \cdot 10^6$ и $1,1 \cdot 10^6$ соответственно.

Таким образом, оба режима лиофилизации обеспечивали хорошую выживаемость частиц бактериофага Л-413С как на экспериментальных, так и контрольных сериях питательных сред, что позволяло

Таблица 1

Показатели физико-химических и биологических свойств препаратов бактериофага диагностического чумного Л-413С, изготовленных на различных питательных средах

Серии препарата	Характер питательной среды	Растворимость, мин. Норма по НД: в течение 3 мин	рН. Норма по НД: от 6,5 до 7,5	Потеря в массе при высушивании, %. Норма по НД: не более 3 %	Специфическая активность, частиц/мл		Спектр литической активности. Норма по НД: бактериофаг лизирует штаммы <i>Y. pestis</i> и не лизирует штаммы <i>Y. pseudotuberculosis</i>
					до лиофилизации. Норма по НД: не менее 1-10 ⁶	после лиофилизации. Норма по НД: не менее 1-10 ⁵	
ДС-1	Дрожжевой автолизат – белковая монооснова	1	6,96	1,75	2,0·10 ⁸	8,0·10 ⁶	Лизирует штаммы <i>Y. pestis</i> и не лизирует штаммы <i>Y. pseudotuberculosis</i>
ДС-2		1	7,0	0,6	4,65·10 ⁷	1,6·10 ⁶	«
ДС-3		1	7,1	0,5	4,6·10 ⁷	1,0·10 ⁶	«
ДС-4	Дрожжевой автолизат – стимулирующая добавка	1	6,43	1,73	4,0·10 ⁷	1,9·10 ⁷	«
ДС-5		1	7,1	0,4	2,59·10 ⁷	1,0·10 ⁶	«
КС-1	Бульон Хотингера	1	6,45	1,3	8,4·10 ⁷	3,8·10 ⁶	«
КС-2		1	6,91	0,4	5,0·10 ⁷	1,1·10 ⁶	«

получить препараты со специфической активностью на порядок выше минимально допустимой по НД. В отношении выживаемости исключение составлял бактериофаг, выращенный на среде ДС-1, активность которого в результате лиофилизации снизилась на 2 порядка, хотя и осталась на порядок выше минимально допустимой. рН сухих образцов бактериофага ДС-3 и ДС-5 составлял 7,1, на средах ДС-1, ДС-2, ДС-4 – 6,96, 7,0, 6,43, на контрольных – 6,45 и 6,91 соответственно. Согласно требованиям НД значения рН бактериофага чумного Л-413С должны находиться в пределах 6,5–7,5. Это значит, что данному параметру не соответствовали серии бактериофага, полученные на средах ДС-4 и КС-1. Изменение рН в кислую сторону у данных препаратов отмечалось еще на этапе фильтрации, что могло свидетельствовать о недостаточной буферной емкости указанных сред культивирования. Ранее при работе со средами на основе автолизата пекарских дрожжей была выявлена тенденция к закислению реакции среды при ее термообработке [3]. Однако этот недостаток может быть устранен введением буферных добавок или коррекцией рН перед лиофилизацией.

Специфическая активность всех полученных образцов бактериофага соответствовала требованиям НД и была на порядок выше минимальной регламентированной – 1·10⁵ частиц/мл. Спектр литической активности образцов бактериофага чумного Л-413С, выращенных на экспериментальных и контрольных питательных средах, соответствовал аналогичным параметрам жидких препаратов.

С целью изучения стабильности свойств серии ДС-1, ДС-4 и КС-1 были заложены на хранение при температуре 4–8 °С в соответствии с [4]. Контроль основных свойств препаратов проводили через 1 год 2 мес., 3 и 4 года. Результаты изучения свойств бактериофага в процессе хранения, представленные в табл. 2, свидетельствовали о стабильности таких показателей, как растворимость и потеря в массе при высушивании в течение регламентированного срока годности (3 года), а также через 1 год после его истечения, в то время как количество фаговых частиц в 1 мл, характеризующее специфическую активность препаратов, имело тенденцию к снижению. Однако и после 4 лет хранения активность изучаемых бактериофагов оставалась на порядок выше минимально

Таблица 2

Показатели стабильности свойств препаратов бактериофага диагностического чумного Л-413С в процессе хранения при температуре 4–8 °С

Серии препарата	Данные контроля при выпуске, через	Растворимость, мин. Норма по НД: в течение 3 мин	Потеря в массе при высушивании, %. Норма по НД: не более 3 %	рН. Норма по НД: от 6,5 до 7,5	Специфическая активность, частиц/мл. Норма по НД: не менее 1·10 ⁵
ДС-1		1	1,75	6,96	8,0·10 ⁶
	1 год 2 мес.	1	1,75	6,5	5,0·10 ⁶
	3 года	1	1,7	6,5	3,0·10 ⁶
	4 года	1	1,5	6,54	3,0·10 ⁶
ДС-4		1	1,73	6,43	1,9·10 ⁶
	1 год 2 мес.	1	1,73	6,4	1,4·10 ⁶
	3 года	1	1,73	6,4	1,4·10 ⁶
	4 года	1	1,6	6,4	1,4·10 ⁶
КС-1		1	1,3	6,45	3,8·10 ⁶
	1 год 2 мес.	1	1,3	6,4	3,1·10 ⁶
	3 года	1	1,2	6,4	3,0·10 ⁶
	4 года	2	1,065	6,4	1,5·10 ⁶

Показатели стабильности свойств препаратов бактериофага диагностического чумного Л-413С в «тесте ускоренного старения» (хранение при температуре (37±1) °С)

Серии препарата	Данные контроля при выпуске, через	Растворимость, мин. Норма по НД: в течение 3 мин	pH. Норма по НД: от 6,5 до 7,5	Специфическая активность, частиц/мл. Норма по НД: не менее 1·10 ⁵
ДС-2		1	7,0	1,6·10 ⁶
	3 мес.	1	7,0	1,5·10 ⁶
	4 мес.	1	7,0	1,5·10 ⁶
ДС-3		1	7,1	1,0·10 ⁶
	3 мес.	1	7,1	0,9·10 ⁶
	4 мес.	1	7,1	0,9·10 ⁶
ДС-5		1	7,1	1,0·10 ⁶
	3 мес.	2	6,9	0,7·10 ⁶
	4 мес.	2	6,9	0,7·10 ⁶
КС-2		1	6,91	1,1·10 ⁶
	3 мес.	2	6,5	0,7·10 ⁶
	4 мес.	2	6,5	1,0·10 ⁵

допустимой по НД. Наибольшей стабильностью при температуре 4–8 °С характеризовался бактериофаг Л-413С, репродуцированный на среде ДС-4, у которого через 4 года сохранилось 73,7 % жизнеспособных фаговых частиц, в то время как на средах ДС-1 и КС-1 – соответственно 37,5 и 39,5 %.

Препараты бактериофагов, изготовленные на средах ДС-2, ДС-3, ДС-4 были подвергнуты хранению при температуре (37±1) °С – «тест ускоренного старения». Оценку стабильности их свойств проводили через 3 и 4 мес. (срок наблюдения) по показателям: растворимость, pH, специфическая активность (табл. 3). Препараты бактериофага, изготовленные на средах ДС-2 и ДС-3, оказались более устойчивы к хранению в условиях повышенной температуры, по сравнению с препаратами на средах ДС-5 и КС-2, у которых, помимо снижения активности, отмечалось увеличение времени растворения в 2 раза, а также сдвиг pH в кислую сторону.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что все питательные среды, приготовленные на основе автолизата пекарских дрожжей, обеспечивали на этапе репродукции бактериофага чумного Л-413С концентрацию фаговых частиц, сравнимую с концентрацией бактериофага воспроизведенного на традиционной «мясной» питательной среде. Экспериментальные серии препарата, приготовленные на дрожжевых средах, демонстрировали хорошую выживаемость фаговых частиц после лиофилизации, а также стабильность свойств в процессе хранения. Однако более перспективными следует признать среды, в которых дрожжевой автолизат являлся белковой моноосновой. Эффективность таких сред обусловлена наличием в них продуктов средней степени расщепления, полноценным аминокислотным составом и физиологическим соотношением незаменимых и заменимых аминокислот. В отличие от сред, в которых дрожжевой автолизат является стимулирующей добавкой, моноосновные среды по-

зволяют полностью исключить применение в производстве бактериофага чумного Л-413С питательных сред животного происхождения.

Внедрение дрожжевых питательных сред в технологию изготовления бактериофага диагностического чумного Л-413С открывает хорошие перспективы для повышения эффективности производства и снижения себестоимости препарата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеева Н.Г., Дятлов И.А., Ерёмин С.А. Разработка технологии производства дрожжевых аутолизатов как основы конструирования питательных сред для чумного микроба и холерного вибриона. Саратов; 2000. 17 с.
2. Адамс М. Бактериофаги. М.; 1961. 527 с.
3. Кислухина О.В., Калунянц К.А., Аленова Д.Ж. Ферментативный лизис микроорганизмов. Алма-Ата: Раун; 1990. 200 с.
4. Условия транспортирования и хранения медицинских иммунобиологических препаратов. Санитарные правила. СП 3.3.2.1248-03. М., 2003.
5. Шкляр Б.Х. Ферментативный лизис дрожжей. Минск: Наука и техника; 1977. 192 с.

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

1. Avdeeva N.G., Dyatlov I.A., Eremin S.A. [Development of technology of production of yeast autolizates as the basis for construction of nutrient media for plague microbe]. Saratov; 2000. 17 p.
2. Adams M. [Bacteriophages]. M.; 1961. 527 p.
3. Kislukhina O.V., Kalunians K.A., Alenova D.Zh. [Enzymatic Lysis of Microorganisms]. Alma-Ata: Raun; 1990. 200 p.
4. [Sanitary Regulations "Conditions of Transportation and Storage of Medical Immunobiological Preparations": SR 3.3.2.1248-03]. M.: Minzdrav RF; 2003.
5. Shklyar B. Kh. [Enzymatic Lysis of Yeasts]. Minsk: Nauka i Tekhnika; 1977. 192 p.

Authors:

Аленкина Т.В., Зинина О.С., Антоничева М.В., Вахрушина Н.И., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Аленкина Т.В., Зинина О.С., Антоничева М.В., Вахрушина Н.И., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 24.03.11.

А.В.Комиссаров, С.А.Еремин, Ю.А.Алешина, Ю.Г.Васин, О.Д.Клокова, Н.И.Белякова

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ ПО ПРИНЦИПУ «КРОСС-ФЛОУ» ДЛЯ КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ О-АНТИГЕНА В ПРОИЗВОДСТВЕ ХОЛЕРНОЙ БИВАЛЕНТНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ

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

Показана возможность применения метода ультрафильтрации по принципу «кросс-флоу» для концентрирования О-антигена штамма холерного вибриона М-41 Огава из безмикробного центрифугата. Проведена оптимизация технологического процесса концентрирования. Отработаны режимы консервации и очистки ультрафильтрационной установки. Определены перспективы внедрения метода ультрафильтрации по принципу «кросс-флоу» в технологию производства холерной бивалентной химической вакцины.

Ключевые слова: вакцина холерная, О-антиген, концентрирование «кросс-флоу».

A.V.Komissarov, S.A.Eremin, Yu.A.Aleshina, Yu.G.Vasin, O.D.Klokova, N.I.Beliakova

Experimental Evaluation of Application of “Cross-Flow” Ultrafiltration Method for O Antigen Concentrating in Cholera Chemical Bivalent Vaccine Production

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov

Demonstrated is possibility to apply “cross-flow” ultrafiltration method for O antigen of *Vibrio cholerae* M-41 Ogawa concentrating from germ-free centrifugate. Technological process of concentrating was optimized. Worked out were the regimes of conservation and cleaning of the ultrafiltration device. The prospects of “cross-flow” ultrafiltration method introduction in technology of cholera chemical bivalent vaccine production were determined.

Key words: cholera vaccine, O antigen, “cross-flow” concentrating.

В связи с распространением холеры в мире в последние годы, особенно в развивающихся странах, ВОЗ рекомендует разработку и использование вакцинных препаратов орального применения. В настоящее время в Российской Федерации для вакцинации и ревакцинации населения по эпидемическим показаниям используют вакцину холерную бивалентную химическую таблетированную [1]. Отечественная химическая вакцина, состоящая из смеси холерогена-анатоксина и О-антигена холерного вибриона сероваров Инаба и Огава, не уступает по эффективности оральной химической вакцине WC-rBS, состоящей из убитых вирулентных клеток *Vibrio cholerae* O1 (классического биовара и Эль Тор; сероваров Инаба и Огава) и очищенной рекомбинантной В-субъединицы холерного токсина [2].

Одним из недостатков существующей технологии производства отечественной холерной бивалентной химической вакцины являются многоступенчатые и затратные этапы выделения нативных антигенов. Данный недостаток частично был устранен разработкой масштабируемой технологии получения компонента холерных химических вакцин – О-антигена холерного вибриона с использованием ультрафильтрационных модулей на полых волокнах УВА-ПС-20-1040 [3]. Однако в настоящее время производство модулей УВА прекращено. Из всего многообразия современных ультрафильтрационных технологий наше внимание привлек метод концентрирования антигенов ультрафильтрацией по принципу «кросс-флоу». Данный метод успешно ис-

пользовался для концентрирования антигенов, выделенных из штаммов *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* [4], протективного антигена сибиреязвенного микроба [5]. Использование мембранных модулей с разным размером пор позволяет концентрировать антигены с различной молекулярной массой. Все это определяет актуальность исследований, направленных на внедрение в производственный процесс новой технологии концентрирования антигенных компонентов холерной химической вакцины ультрафильтрацией по принципу «кросс-флоу».

Целью исследования было определение условий концентрирования ультрафильтрацией по принципу «кросс-флоу» О-АГ холерного вибриона серовара Огава из безмикробного центрифугата и оценка возможности использования этого метода в производстве холерной химической вакцины.

Материалы и методы

В работе использовали сухие фракции О-антигена и безмикробные центрифугаты, полученные при производственном выращивании штамма *V. cholerae* М-41 Огава. Серологическую активность О-антигена холерного вибриона определяли в реакции иммунодиффузии в геле (РИД) по Оухтерлони и реакции непрямой агглютинации (РНГА) с О1-сывороткой. Определение формальдегида, перекиси водорода, величины рН и мутности проводили в соответствии с методами, изложенными в нормативной докумен-

тации (Методические указания МУК 4.1/4.2.588-96, 1998). Для концентрирования О-антигена применяли установку для микро- и ультрафильтрации на базе фильтродержателя АСФ-009 фирмы Владисарт, снаряженной мембранными модулями из триацетата целлюлозы с номинальной отсечкой по молекулярной массе 20 кДа, с площадью фильтрации равной 0,1 и 0,2 м².

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований определили скорость отведения фильтрата дистиллированной воды на не бывшем в эксплуатации мембранном модуле с площадью фильтрации равной 0,1 м², которая составила (16,50±0,05) дм³ в час при давлении на входе и выходе фильтрационной установки – ФУ (1,5±0,1) и (0,5±0,1) кгс/см² соответственно.

Для оценки возможности концентрирования нативного О-антигена холерного вибриона, содержащегося в центрифугате после удаления клеточной биомассы, была выбрана следующая модель безмикробного центрифугата: 5 г сухой фракции О-антигена, полученного при производстве вакцины холерной бивалентной химической таблетированной, растворяли в 7 дм³ ферментативного казеинового гидролизата (0,2 % аминного азота, 0,5 % хлорида натрия и 0,05 % двузамещенного фосфата натрия), рН 7,6, что соответствовало содержанию О-антигена в безмикробном центрифугате, и добавляли формалин до конечной концентрации 0,2 %, что также соответствовало показателям качества безмикробного центрифугата, получаемого при производстве холерной химической вакцины. Критерием окончания процесса выбрали уменьшение объема смоделированного безмикробного центрифугата в 10 раз. Удаление примесей с молекулярной массой менее 20 кДа на первоначальном этапе проводили при давлении на входе и выходе фильтрационной установки (1,5±0,1) и (0,5±0,1) кгс/см² соответственно. Содержание О-антигена в смоделированном безмикробном центрифугате в РИД с О1-сывороткой составляло 1:8. Процесс концентрирования прошел за 5 ч. Полученный по-

луфабрикат имел следующие показатели качества: рН (7,5±0,1), титр О-антигена в РИД с О1-сывороткой 1:64. В фильтрате О-антиген не обнаружен.

С целью интенсификации процесса мембранного концентрирования О-антигена была проведена процедура «сканирования давления», заключающаяся в выборе оптимального соотношения давления на входе и выходе фильтрационной установки. Проведенные исследования показали, что оптимальными параметрами для концентрирования О-антигена являются: давление на входе (2,5±0,1) и на выходе (0,5±0,1) кгс/см² соответственно. Установленные параметры позволили сократить время концентрирования с 5 до 3 ч, при сохранении показателей качества определенных ранее. Для определения возможной сорбции О-антигена внутри пор мембранного модуля провели его отмывку через установку путем рециркуляции дистиллированной водой объемом 0,5 дм³. В концентрате О-антиген не обнаружен, это дает основания предполагать, что О-антиген не сорбируется на мембранном модуле.

Далее было необходимо отработать процесс очистки и консервации мембранных модулей и в целом установки для хранения между производственными циклами. Для очистки мембранных модулей после завершения процесса концентрирования использовали (5,5±0,5) % раствор перекиси водорода. Установлено, что обработка установки способом рециркуляции данным раствором продолжительностью 30–40 мин, с последующей отмывкой системы дистиллированной водой объемом 5 дм³ при давлении на входе и выходе фильтрационной установки (1,5±0,1) и (0,5±0,1) кгс/см² соответственно, не оказывает влияния на скорость отведения фильтрата и составляет по дистиллированной воде (16,50±0,05) дм³ в час. В пробах после промывки установки перекиси водорода не обнаружено. В качестве консерванта использовали (2,5±0,5) % раствор формальдегида. В ходе экспериментов установлено, что химическая обработка установки способом рециркуляции одного из указанных веществ продолжительностью (35±5) мин, с последующей отмывкой системы перед пуском в эксплуатацию дистиллиро-

Таблица 1

Характеристики концентрированных О-антигенов, полученных по экспериментальной и регламентной технологии

Показатель	Реактор № 17									Реактор № 18								
	БМЦ			концентрат			фильтрат			БМЦ			концентрат			фильтрат		
	Р	Э	Н	Р	Э	Н	Р	Э	Н	Р	Э	Н	Р	Э	Н	Р	Э	Н
Содержание О-антигена в РИД с О1-сывороткой, обратный титр	8	8	8	64	64	–	0	0	0	8	8	8	64	64	–	0	0	0
Мутность (ОД)	0,3	0,3	–	–	0,55	–	0,05	0,06	0,04±0,02	0,31	0,31	–	–	0,49	–	0,06	0,06	0,04±0,02
рН	7,26	7,26	7,0±0,3	7,3	7,23	7,0±0,3	7,2	7,26	7,0±0,3	7,3	7,3	7,0±0,3	7,3	7,22	7,0±0,3	7,1	7,2	7,0±0,3

Примечание. БМЦ – безмикробный центрифугат, Р – значение показателя, полученного по регламентной технологии, Э – значение показателя, полученного в эксперименте, Н – нормируемое значение показателя в соответствии с регламентом производства, прочерк – требования отсутствуют.

Таблица 2

Характеристики сухих препаратов О-антигена, полученных по экспериментальной и регламентной технологии

Показатель	Реактор № 17		Реактор № 18		Н
	Р	Э	Р	Э	
Активность О-антигена в РНГА с О1-сывороткой, обратный титр	112	256	224	256	≥100
Объем диализованного препарата, мл	4320	220	4000	220	–
Вес сухого препарата, г	71	5	60	7	–

Примечание. Р – значение показателя, полученного по регламентной технологии, Э – значение показателя, полученного по экспериментальной технологии, Н – нормируемое значение показателя в соответствии с регламентом производства, прочерк – требования отсутствуют.

ванной водой объемом 5 дм³ при давлении на входе и выходе фильтрационной установки (1,5±0,1) и (0,5±0,1) кгс/см² соответственно, является оптимальным режимом консервации мембранных модулей и в целом установки. Остаточное содержание формалина в системе составляло от 0,001 до 0,007 %.

На следующем этапе было проведено концентрирование безмикробных центрифугатов, полученных при производственном выращивании в ферментере холерного вибриона штамма *V. cholerae* М-41 Огава. Технологические режимы концентрирования соответствовали определенным при процедуре «сканирования давления». Объем безмикробного центрифугата составлял 7 дм³. Концентрирование до 0,7 дм³ прошло за 3 ч, что соответствует данным, полученным ранее при концентрировании модельного безмикробного центрифугата. Показатели качества препаратов О-антигена, определенные при проведении данного эксперимента, представлены в табл. 1. Их значения соответствуют нормируемым и не отличаются от полученных по регламентной технологии.

Далее концентрированные препараты О-антигена, полученные по традиционной и экспериментальной технологиям, были диализованы, простерилизованы и лиофильно высушены. Характеристики сухих препаратов О-антигена представлены в табл. 2, из данных которой можно сделать выводы, что значения показателей экспериментальных сухих препаратов О-антигена соответствуют нормируемым, а активность и выход (по соотношению веса сухого полуфабриката к объему диализованного препарата) превышают значения показателей препаратов О-антигена, полученных по регламентной технологии.

Известно, что концентрирование ультрафильтрацией по принципу «кросс-флоу» является линейно-масштабируемым процессом (по площади фильтрации) [6]. Использование ФУ с общей площадью фильтрации 0,2 м² позволило нам сконцентрировать безмикробный центрифугат с 7 до 0,7 дм³ за 1,5 ч, что подтвердило данные литературы. Произведен расчет необходимой площади фильтрации для концентрирования 500 дм³ безмикробного центрифугата (количество продукта, полученного за один цикл выращивания штамма продуцента О-АГ холерного вибриона на двух производственных ферментерах) в 10 раз за 6 ч. Для концентрирования указанного объема

необходима установка с площадью фильтрации 4 м².

Таким образом, определены условия концентрирования ультрафильтрацией по принципу «кросс-флоу» О-антигена холерного вибриона серовара Огава из безмикробного центрифугата и показана принципиальная возможность внедрения этого метода в промышленную технологию производства холерной бивалентной химической вакцины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Медуницин Н.В. Вакцинология. М.: Триада-Х; 2004. 448 с.
2. Кутырев В.В., Девдариани З.Л., Саяпина Л.В. Современное состояние научных исследований в области профилактики особо опасных инфекционных бактериальных инфекций. Пробл. особо опасных инф. 2006; 2(92):18–24.
3. Дятлов И.А., Нижегородцев С.А., Громова О.В. и др. Разработка ультрафильтрационной технологии получения О-антигена холерного вибриона для производства вакцин. Пробл. особо опасных инф. 2001; 2(82):133–9.
4. Егорова Н.Б., Семенов Б.Ф., Курбатова Е.А. и др. Поликомпонентная вакцина для иммунопрофилактики и иммунотерапии заболеваний, вызываемых условно-патогенными микроорганизмами. Патент РФ 2209081. Оpubл. 27.07.2003.
5. Шевцов А.Н., Боровский Д.В., Дармов И.В. и др. Усовершенствование технологии получения сибиреязвенного протективного антигена. Биотехнология. 2009; 6:68–71.
6. Черкасов А.Н., Пасечник В.А. Мембраны и сорбенты в биотехнологии. Л.: Химия; 1991. 239 с.

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

1. Medunitsyn N.V. [Vaccinology]. M.: Triada-X; 2004. 448 p.
2. Kutuyev V.V., Devdariani Z.L., Sayapina L.V. [Present status of the researches in the sphere of vaccine prophylaxis of particularly dangerous bacterial infections]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2006; 2(92):18–24.
3. Dyatlov I.A., Nizhegorodtsev S.A., Gromova O.V., Vasin Yu.G., Butov A.S., Kolova O.D., Beliakova N.I. [Development of ultrafiltration technology of cholera vibrio O antigen obtaining for vaccine production]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2001; 2(82):133–9.
4. Egorova N.B., Semenov B.F., Kurbatova E.A., Efremova V.N., Kaverina K.G., Mikhailova N.A. [Polycomponent vaccine for immunoprophylaxis and immunotherapy of diseases caused by opportunistic microorganisms] RF Patent 2209081. 27.07.2003.
5. Shevtsov A.N., Borovskii D.V., Darmov I.V. et al. [Improvement of technology of the anthrax protective antigen production]. Biotekhnologia. 2009; 6:68–71.
6. Cherkasov A.N., Pasechnik V.A. [Membranes and Sorbents in Biotechnology]. L.: Khimia; 1991. 239 p.

Authors:

Комиссаров А.В., Еремин С.А., Алешина Ю.А., Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Белякова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Комиссаров А.В., Еремин С.А., Алешина Ю.А., Васин Ю.Г., Клокова О.Д., Белякова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru.

Поступила 03.02.10.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ для публикации в журнале «Проблемы особо опасных инфекций»

При направлении статьи в редакцию следует соблюдать следующие правила:

1. Присылать один распечатанный экземпляр статьи и электронную копию на компакт-диске или по электронной почте. **Каждая статья должна иметь направление от учреждения, в котором она выполнена, экспертное заключение и лицензионный договор о предоставлении права использования произведения** (договор размещен на сайте РосНИПЧИ «Микроб» <http://www.microbe.ru>).

2. Размер статей (включая таблицы, резюме и список литературы) не должен превышать у оригинальных – 8 стр., обзоров – 12–14 стр., кратких сообщений – 4–5 стр.

3. Оригинальная статья должна состоять из разделов: материалы и методы, результаты и обсуждение. К оригинальным, проблемным статьям, обзорам и кратким сообщениям должны прилагаться резюме (не более 10 строк) и ключевые слова. Резюме и ключевые слова должны быть **на русском и английском языках**.

4. В начале статьи указываются: инициалы и фамилия авторов, название работы, названия учреждений – *мест работы всех авторов, их должности и контактная информация (почтовый адрес с указанием индекса, телефон, адрес электронной почты)*. Статья должна быть подписана всеми авторами.

5. Количество иллюстраций не должно превышать 3 (либо 3 рис., либо 3 табл., либо 3 в совокупности).

6. Место расположения таблиц и рисунков в тексте отмечать ссылками на полях (только в распечатанных экземплярах).

7. Таблицы не должны дублировать графики, должны иметь краткое название, быть компактными, с «шапками», точно отражающими содержание граф. Числа в таблицах должны быть статистически обработаны. Цифровой материал из таблиц не должен повторяться в тексте статьи.

8. Рисунки должны быть четкими. *В случае необходимости каких-либо обозначений они должны быть сделаны на втором экземпляре рисунка или фотографии*. Количество обозначений должно быть сведено к минимуму. Все объяснения следует давать в подрисуночной подписи.

9. Родовые и видовые названия микроорганизмов, инфраподвидовые категории, наименования семейств должны соответствовать принятым Международным таксономическим комитетом (9 изд. «Руководство по систематике бактерий Берги»). Первый раз название бактерий пишется полностью (*Shigella flexneri*), далее род – только одной прописной буквой, вид – полностью со строчной (*S. flexneri*). Наименования семейств пишутся полностью.

10. Сокращение слов, имен, названий (кроме общепринятых сокращений, мер физических и математических величин и терминов) допускается только с первоначальным указанием полного названия.

11. Математические формулы должны быть тщательно выверены. Во всех формулах необходимо размечать (только в распечатанных экземплярах):

строчные и прописные буквы: прописные обозначаются двумя черточками снизу, строчные – двумя черточками сверху;

латинские и греческие буквы: латинские подчеркиваются синим цветом, греческие – красным.

12. В списке литературы (в оригинальных статьях – не более 15 источников, проблемных и обзорах – не более 50, кратких сообщениях – не более 5–8) цитируются работы отечественных и зарубежных авторов за последние 10 лет и печатаются в алфавитном порядке (сначала русские авторы, потом – иностранные). В тексте дается ссылка на порядковый номер списка (в квадратных скобках), а не на фамилию и годы. Фамилии иностранных авторов в тексте даются в

иностранной транскрипции.

В списке литературы приводятся авторы работы, название статьи, название журнала или сборника, год, номер, страницы. Названия журналов должны быть сокращены в соответствии со стилем, принятым в Index Medicus (<http://www.nlm.nih.gov>). Для книг и патентов давать точное название. Например, *статьи в журналах*:

Halpern S.D., Ubel P.A., Caplan A.L. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. N. Engl. J. Med. 2002; 347(4):284-7.

Если в статье более 6 авторов, перечислите первых 6 авторов и добавьте «и др. (*et al.*)»

Для статей из журналов, выходящих на русском и английском языках, необходимо давать в списке литературы двойную ссылку – на русскую и английскую версии (под одним номером), например:

Вербенко В.Н., Кузнецова Л.В., Крупьян Е.П., Суслов А.В. Оператор-конститутивная мутация в гене *recA* повышает радиостойчивость *Escherichia coli*. Генетика. 2009; 45(8):1048–54. (Verbenko V.N., Kuznetsova L.V., Krupyan E.P., Suslov A.V. Operator-Constitutive Mutation in the *recA* Gene Enhances Radiation Resistance of *Escherichia coli*. Russian Journal of Genetics. 2009; 45(8):917–23.)

Книги и другие монографии

Физические лица в качестве авторов:

Martin E.W. Hazards of medication. 2nd ed. Ruskin A., Napke E., Alexander S., Kelsey F.O., Farage D.J., Mills D.H., Elkas R.W., editors. Philadelphia: Lippincott; 1978. 686 p.

Редакторы, составители в качестве авторов:

Celli L., editor. The elbow: traumatic lesions. Warr A., translator. Vienna (Austria): Springer-Verlag; 1991. 203 p.

Ссылки должны быть сверены авторами с оригинальными документами. Автор несет ответственность за правильность библиографических данных.

Не допускаются ссылки на издания, недоступные для большинства читателей. К ним относятся приказы, распоряжения, ведомственные издания и инструкции, ГОСТы, ТУ, тезисы конференций, симпозиумов, пленумов, съездов, авторефераты докторских и кандидатских диссертаций и неопубликованные работы.

13. Требования к электронным вариантам статей: файлы с текстом и подрисуночными подписями должны быть в формате DOC (редактор Microsoft Word) или RTF; **рисунки и фотографии – в отдельных файлах в формате TIFF (разрешение – 300 пикс/дюйм); диаграммы и графики должны быть выполнены в программе Excel (в отдельных файлах в формате XLS)**. Рисунки, фотографии, диаграммы и графики не вставлять в текст в программе Microsoft Word.

14. При невыполнении настоящих правил статьи не принимаются и отсылаются авторам на дооформление.

15. Редакция оставляет за собой право редактировать статьи, сокращать или исправлять, а также публиковать их в виде кратких сообщений (4–5 стр. текста с резюме и литературой без рисунков и таблиц). Вся работа проводится по авторскому оригиналу.

16. Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование.

17. В случае отклонения статьи по рецензии редакция направляет автору мотивированный отказ.

18. Публикация – бесплатная.

Статьи направлять по адресу:

410005, Саратов, Университетская, 46, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Тел. (845-2) 51-82-22. Факс (845-2) 51-52-12. E-mail: microbe@san.ru