

ПРОБЛЕМЫ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Научно-практический журнал
Выходит четыре раза в год
Основан в 1968 году

Главный редактор академик 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(112)

июнь · 2012

САРАТОВ

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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

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

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

© Федеральное казенное учреждение здравоохранения
Российский научно-исследовательский противочумный
институт «Микроб», 2012

June 2012, Issue 112

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., 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, Professor
Shchukovskaya T.N., Doctor of Medical Science

Editorial Council

Antonov V.A., 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, Corresponding Member
of the RAMS (Obolensk)
Kulichenko A.N., Doctor of Medical Science, Professor (Stavropol)
Kutyrev V.V., Doctor of Medical Science, Member of the RAMS (Saratov)
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: rusrap@microbe.ru
<http://microbe.rospotrebnadzor.ru>

Подписной индекс в каталоге «Почта России» – 24687

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

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

Пробл. особо опасных инф. Июнь 2012. Вып. 112. 1–102
Редактор Т.А.Поршакова. Технический редактор Т.К.Меркулова. Перевод на английский Т.Б.Караваяевой, А.П.Рыжовой, А.Ю.Мощиной

Подписано в печать 21.05.12. Формат 60×88 1/8. Бумага мелованная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 12,5. Гарнитура Таймс. Заказ 578
Журнал отпечатан в ООО «ИППО/ЛиТ-XXI век». 410012, Саратов, Б. Казачья, 79/85

Эпидемиология

Балахонov С.В., Никитин А.Я., Зверева Т.В., Адельшин Р.В., Алленов А.В., Андаев Е.И., Борисенко Е.А., Борисова Т.И., Вержущая Ю.А., Вершинин Е.А., Гордейко Н.С., Климов В.Т., Краснощеков В.Н., Сидорова Е.А. Эпизоотологическое обследование острова Русский и меры, необходимые для предотвращения заболеваемости населения и участников саммита АТЭС инфекциями, передающимися иксодовыми клещами.....

5

Карнауков И.Г., Старшинов В.А., Топорков В.П., Топорков А.В., Коротков В.Б. Осложнения санитарно-эпидемиологической обстановки и риск возникновения чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия при стихийных бедствиях и антропогенных катастрофах.....

9

Матросов А.Н., Кузнецов А.А., Князева Т.В., Вержущий Д.Б., Никитин А.Я., Немченко Л.С., Григорьев М.П., Левченко Б.И., Бобенко О.А., Газиева А.Ю., Коротков В.Б. Современная концепция контроля численности носителей и переносчиков чумы на территории Российской Федерации.....

16

Удовиков А.И., Попов Н.В., Самойлова Л.В., Толоконникова С.И. Климат и трансформация экосистем на примере природных очагов чумы Юго-Востока России....

21

Микробиология

Ерошенко Г.А., Кошель Е.И., Одинок Г.Н., Шавина Н.Ю., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Кутырев В.В. Вариативность нуклеотидных последовательностей генов *phoP/phoQ* и *rovA* – глобальных регуляторов жизненного цикла возбудителя чумы.....

25

Коннов Н.П., Волков Ю.П., Кузнецов О.С. Современные возможности изучения трехмерной (3D) ультратонкой структуры и визуализации микроорганизмов.....

29

Мазрухо А.Б., Лобанов В.В. Современные тенденции в области изучения метаболизма и особенностей питания холерных вибрионов.....

35

Монахова Е.В., Писанов Р.В., Веркина Л.М., Миронова А.В. Клонирование и экспрессия гена *ace* *Vibrio cholerae* в *Escherichia coli*.....

39

Овчинникова М.В., Коровкина Г.И., Грачева И.В., Аленкина Т.В. Лизогенная система неэпидемических холерных вибрионов биовара эльтор, резистентных к диагностическому бактериофагу CTX.....

43

Диагностика

Антонов В.А., Илюхин В.И., Храпова Н.П., Прохвятилова Е.В., Викторov Д.В., Сенина Т.В., Будченко А.А., Ткаченко Г.А., Алексеева В.В., Захарова И.Б., Савченко С.С., Зинченко О.В., Сорокина Ю.И., Алексеев В.В. Современные подходы к диагностике сапа и мелииоза. Идентификация и типирование *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei*.....

46

Германчук В.Г., Уткин Д.В., Щербакова С.А. Анализ современных методов и средств экспрессной индикации токсинов.....

51

Малецкая О.В., Щербакова С.А., Бейер А.П., Таран Т.В., Хапаев Б.А., Бамматов Д.М., Муртазалиева Г.А.-Х., Василенко Н.Ф., Шарова И.Н., Карнауков И.Г., Куличенко А.Н. Принципы стандартизации диагностики и современные особенности Крымской геморрагической лихорадки на территории Российской Федерации.....

55

Романова А.В., Захарова И.Б., Замараев В.С., Викторov Д.В. Конструирование праймеров для детекции и типирования генов β-лактамаз патогенных видов рода *Burkholderia* ...

59

Epidemiology

Balakhonov S.V., Nikitin A.Ya., Zvereva T.V., Adel'shin R.V., Allenov A.V., Andaev E.I., Borisenko E.A., Borisova T.I., Verzhutskaya Yu.A., Vershinin E.A., Gordeyko N.S., Klimov V.T., Krasnoshchekov V.N., Sidorova E.A. Epizootiological Survey of the Isle Russian and Measures Necessary for the Prophylaxis of Tick-Born Infections among Population of the Region and Participants of APEC Summit

Karnaukhov I.G., Starshinov V.A., Toporkov V.P., Toporkov A.V., Korotkov V.B. Complications of Sanitary-Epidemiological Situation and Risk of Emergency Situations Appearance in the Sphere of Sanitary and Epidemiological Well-Being in the Natural and Anthropogenic Catastrophes

Matrosov A.N., Kuznetsov A.A., Knyazeva T.V., Verzhutsky D.B., Nikitin A.Ya., Nemchenko L.S., Grigor'ev M.P., Levchenko B.I., Bobenko O.A., Gazieva A.Yu., Korotkov V.B. Modern Conception of the Control over the Abundance of Carriers and Vectors of Plague in the Territory of the Russian Federation

Udovikov A.I., Popov N.V., Samoilova L.V., Tolokonnikova S.I. Climate and Transformation of Ecosystems by the Example of Natural Plague Foci of South-East of Russia

Microbiology

Eroshenko G.A., Koshel' E.I., Odiokov G.N., Shavina N.Yu., Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Kutyrev V.V. Variability of *phoP/phoQ* and *rovA* Genes Sequences – Global Regulators of the Plague Agent Life Span

Konnov N.P., Volkov Yu.P., Kuznetsov O.S. Modern Technologies for Examination of Three-Dimensional (3-D) Ultra-Fine Structure and Visualization of Microorganisms

Mazrukho A.B., Lobanov V.V. Modern Trends in Analysis of Cholera Vibrios Metabolism and Nutrient Requirements

Monakhova E.V., Pisanov R.V., Verkina L.M., Mironova A.V. Cloning and Expression of *ace* Gene of *Vibrio cholerae* in *Escherichia coli*

Ovchinnikova M.V., Korovkina G.I., Gracheva I.V., Alenkina T.V. Lysogenic System of Non-Epidemic Cholera Vibrio El Tor, Resistant to Diagnostic Bacteriophage CTX

Diagnostics

Antonov V.A., Ilyukhin V.I., Khrapova N.P., Prokhvatilova E.V., Viktorov D.V., Senina T.V., Budchenko A.A., Tkachenko G.A., Alekseeva V.V., Zakharova I.B., Savchenko S.S., Zinchenko O.V., Sorokina Yu.I., Alekseev V.V. Modern Approaches for Detection of Glanders and Melioidosis. Identification and Typing of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*

Germanchuk V.G., Utkin D.V., Shcherbakova S.A. Analysis of the Modern Methods and Means for Rapid Toxin Indication

Maletskaya O.V., Shcherbakova S.A., Beyer A.P., Taran T.V., Khapaev B.A., Bammатов D.M., Murtazaliev G.A.-Kh., Vasilenko N.F., Sharova I.N., Karnaukhov I.G., Kulichenko A.N. Principles of Standardization of Crimean Hemorrhagic Fever Diagnostics and Its Present-Day Peculiarities in the Territory of the Russian Federation

Romanova A.V., Zakharova I.B., Zamaraev V.S., Viktorov D.V. Design of Primers for Detection and Typing of β-Lactamase Genes from Pathogenic Species of *Burkholderia*

Уткин Д.В., Кузнецов О.С., Ерохин П.С., Спицын А.Н., Волох О.А., Осина Н.А. Разработка методических подходов изучения возбудителей особо опасных инфекционных болезней методом атомно-силовой микроскопии

62

Иммунология, патогенез

Демина О.К., Сергеев А.А., Пьянков О.В., Шиков А.Н., Сергеев А.А., Берилло С.А., Сергеева Е.И., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Диссеминация вируса гриппа птиц А/Н5N1 при интраназальном инфицировании кур

65

Кравцов А.Л. Формирование внеклеточных ловушек – эффективный механизм защиты организма от патогена

69

Попова П.Ю., Микшис Н.И., Гончарова А.Ю., Каштанова Т.Н., Попов Ю.А. Особенности образования антител у лабораторных животных, иммунизированных препаратом сибиреязвенного протективного антигена, рекомбинантным или вакцинным штаммами *Bacillus anthracis*

75

Биотехнология

Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Лобовикова О.А., Савицкая Л.В., Минаева Л.Н., Галкина М.В., Михеева Т.А., Комиссаров А.В., Киреев М.Н., Никифоров А.К. Получение кроличьего антирабического иммуноглобулина с применением культурального антигена

78

Говорунова В.А., Маринин Л.И., Миронова Р.И., Храмов М.В., Мокриевич А.Н., Баранов А.М. Диагностическая питательная среда для выделения и идентификации возбудителя сибирской язвы

82

Никифоров А.К., Комиссаров А.В., Ульянов А.Ю., Еремин С.А., Волох О.А., Белякова Н.И., Алешина Ю.А., Васин Ю.Г. Исследование процессов культивирования штаммов холерного вибриона – продуцентов протективных антигенов вакцины холерной бивалентной химической таблетируемой в сконструированном биореакторе

85

Шиков А.Н., Сергеева Е.И., Демина О.К., Терновой В.А., Рябинин В.В., Костина Е.В., Малкова Е.М., Синяков А.Н., Агафонов А.П. Разработка ДНК-биочипа для выявления субтипов вируса гриппа А

89

Краткие сообщения

Горбунов А.В., Невёдова Н.С., Шмидт М.А. Медико-санитарные и паразитологические аспекты экологии сизого голубя (*Columba livia*)

94

Коготкова О.И., Новаков П.Б., Зуенко А.А., Ляпустина Л.В., Гридина Т.М., Егшатын Т.И., Куличенко А.Н. Система менеджмента качества в Ставропольском научно-исследовательском противочумном институте

96

Юбилей

К 60-летию Ставропольского научно-исследовательского противочумного института

98

К 60-летию со дня рождения Бакыта Бахияулы Атшабара

101

К 65-летию со дня рождения Зураба Левановича Девдариани

101

Правила для авторов

102

Utkin D.V., Kuznetsov O.S., Erokhin P.S., Spitsyn A.N., Volokh O.A., Osina N.A. Development of Methodological Approaches for Examination of Particularly Dangerous Infectious Diseases Agents by Means of Atomic Power Microscopy

Immunology, Pathogenesis

Demina O.K., Sergeev A.A., P'yankov O.V., Shikov A.N., Sergeev A.A., Berillo S.A., Sergeeva E.I., Agafonov A.P., Sergeev A.N. Dissemination of Influenza A/H5N1 Virus after Intranasal Inoculation of Chickens

Kravtsov A.L. Formation of Extracellular Traps – the Effective Mechanism of Organism Protection from Pathogen

Popova P.Yu., Mikshis N.I., Goncharova A.Yu., Kashtanova T.N., Popov Yu.A. Peculiarities of Antibody Genesis in the Laboratory Animals Immunized with Anthrax Protective Antigen Preparation, *Bacillus anthracis* Recombinant or *Bacillus anthracis* Vaccine Strains

Biotechnology

Generalov S.V., Abramova E.G., Matveeva Zh.V., Zhulidov I.M., Lobovikova O.A., Savitskaya L.V., Minaeva L.N., Galkina M.V., Mikheeva T.A., Komissarov A.V., Kireev M.N., Nikiforov A.K. Production of Rabbit Anti-Rabies Immunoglobulin Using Cultural Antigen

Govorunova V.A., Marinin L.I., Mironova R.I., Khramov M.V., Mokrievich A.N., Baranov A.M. Diagnostic Nutrient Media for Isolation and Identification of Anthrax Agent

Nikiforov A.K., Komissarov A.V., Ul'yanov A.Yu., Eremin S.A., Volokh O.A., Belyakova N.I., Aleshina Yu.A., Vasin Yu.G. Examination of Processes of Cultivation of *V. cholerae* strains – Producers of Protective Antigens of Cholera Bivalent Chemical Vaccine in Tablets – in the Engineered Bioreactor

Shikov A.N., Sergeeva E.I., Demina O.K., Ternovoy V.A., Ryabinin V.V., Kostina E.V., Malkova E.M., Sinyakov A.N., Agaphonov A.P. Development of DNA-Biochip for Identification of Influenza A Virus Subtypes

Brief Communications

Gorbunov A.V., Nefedova N.S., Shmidt M.A. Medico-Sanitary and Parasitological Aspects of Rock Pigeon Ecology (*Columba livia*)

Kogotkova O.I., Novakov P.B., Zuenko A.A., Lyapustina L.V., Gridina T.M., Egshatyan T.I., Kulichenko A.N. Quality Management System in Stavropol Research Anti-Plague Institute

Anniversaries

To the 60-th Anniversary of the Stavropol Research Anti-Plague Institute

To the 60-th Anniversary of Bakyt B. Atshabar

To the 65-th Anniversary of Zurab L. Devdariani

Instruction to Authors

УДК 616.995.42(571.63)

С.В.Балахонов¹, А.Я.Никитин¹, Т.В.Зверева², Р.В.Адельшин¹, А.В.Алленов², Е.И.Андаев¹,
Е.А.Борисенко², Т.И.Борисова¹, Ю.А.Вержущая¹, Е.А.Вершинин¹, Н.С.Гордейко², В.Т.Климов¹,
В.Н.Краснощекhov², Е.А.Сидорова¹

ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ ОСТРОВА РУССКИЙ И МЕРЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ НАСЕЛЕНИЯ И УЧАСТНИКОВ САММИТА АТЭС ИНФЕКЦИЯМИ, ПЕРЕДАЮЩИМИСЯ ИКСОДОВЫМИ КЛЕЩАМИ

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»,
Иркутск; ²ФКУЗ «Приморская противочумная станция», Уссурийск

Весной 2011 г. во время эпизоотологического обследования территории острова Русский выявлено пять видов иксодовых клещей: *Ixodes persulcatus*, *I. pavlovskyi*, *Haemaphysalis concinna*, *H. japonica douglasi*, *Dermacentor silvarum*, оказавшихся зараженными возбудителями вирусного клещевого энцефалита, клещевых боррелиозов и риккетсиозов, моноцитарного эрлихиоза.

Подготовка к проведению на острове в сентябре 2012 г. саммита АТЭС повлекла масштабное строительство на нем новых объектов различного назначения, трансформацию природных биотопов, значительное увеличение численности постоянно и временно проживающего населения. Рассматривается комплекс мер профилактики, необходимых для предотвращения заболеваемости участников саммита и местного населения инфекциями, передающимися иксодовыми клещами.

Ключевые слова: клещевой энцефалит, иксодовые клещевые боррелиозы, профилактика, фауна иксодовых клещей, Приморский край.

S.V.Balakhonov¹, A.Ya.Nikitin¹, T.V.Zvereva², R.V.Adel'shin¹, A.V.Allenov², E.I.Andayev¹, E.A.Borisenko²,
T.I.Borisova¹, Yu.A.Verzhutskaya¹, E.A.Vershinin¹, N.S.Gordeyko², V.T.Klimov¹, V.N.Krasnoshchekov²,
E.A.Sidorova¹

Epizootiological Survey of the Isle Russian and Measures Necessary for the Prophylaxis of Tick-Born Infections among Population of the Region and Participants of APEC Summit

¹Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk; ²Primorsk Plague Control Station, Ussuriysk

In spring, 2011 within the frames of epizootiological survey of the Isle Russian territory, identified were five species of Ixodic ticks: *Ixodes persulcatus*, *I. pavlovskyi*, *Haemaphysalis concinna*, *H. japonica douglasi*, *Dermacentor silvarum*. Those ticks were infected with the agents of tick-born encephalitis, borreliosis, rickettsiosis, and monocytic ehrlichiosis. Further preparations for the hosting of APEC Summit in the territory of the Isle in September 2012 involve large-scale construction of various facilities, transformation of natural biotopes, and significant increase in population numbers both permanently and temporally residing in the region. In this connection, a complex of preventive measures aimed at protection of local population and participants of the Summit from tick-borne infections is currently under consideration.

Key words: tick-born encephalitis, ixodic tick-born borrelioses, prophylaxis, fauna of ixodic ticks, the Primorsk Territory.

В 2010 г. в Дальневосточном федеральном округе зарегистрировано 68 (1,0 ‰) случаев клещевого энцефалита (КЭ), 271 (4,2 ‰) – иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ) и 227 (3,5 ‰) – клещевых риккетсиозов (КР). Наибольшая заболеваемость КЭ, ИКБ и КР характерна для жителей Приморского края. Причем на долю этого субъекта приходится 78 % всех региональных случаев КЭ при ежегодной регистрации тяжелых форм болезни с единичными летальными исходами [4].

Наибольшую опасность, как переносчик вируса КЭ и боррелий, в Приморском крае имеет таежный клещ. В отношении риккетсий эпизоотологическая роль клещей рода *Dermacentor* и *Haemaphysalis* неоспорима [5]. Однако их ведущее значение в «эпи-

демиологическом контакте» признается не всеми авторами [1].

В сентябре 2012 г. во Владивостоке и на о. Русский планируется проведение саммита АТЭС. Прибытие многочисленных участников мероприятия на остров требует оценки опасности их заражения, а в случае необходимости – разработки рекомендаций по защите людей от болезней, передающихся с укусами иксодовых клещей.

Материалы и методы

Остров Русский площадью около 98 км², (длина – 18, ширина – 13 км) расположен в заливе Петра Великого Японского моря. Наименьшее рас-

стояние между островом и континентальной частью (Владивосток) – 800 м. Постоянное население составляет 5200 человек.

Сбор клещей проводили на флаг с растений [7] во второй декаде мая 2011 г. Всего отработано 18 ч, пройдено около 60 км маршрутов и собрано 479 имаго трех родов иксодовых клещей: *Ixodes*, *Haemaphysalis* и *Dermacentor*. Наиболее полно обследованы территории, окружающие бухты Воеводиха, Рында, п-ов Саперный, с координатами точек массовых сборов клещей, определенных по GPS-приемнику: N 43,00° E 131,79°; N 43,02° E 131,80°; N 42,98° E 131,91°. Обследованные биотопы по характеру растительных комплексов разделены на две группы. Первая – лугополевая зона находится в непосредственной близости к населенным пунктам и включает территории освоенных земель. Для нее характерен обедненный травяно-кустарниковый состав растительности (доминируют злаковые, осоки, несколько видов полыни). Вторая группа представлена вторичными широколиственными лесами с малым количеством опада (дуб монгольский с примесью берез маньчжурской и даурской). В результате деятельности человека леса имеют разреженный характер, местами полностью лишены подлеска.

Антиген вируса КЭ выявляли на тест-системах двух производителей: ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирская область, п. Кольцово) и ФГУП НПО «Микроген» (Томск). Выявление РНК/ДНК возбудителей клещевого энцефалита, патогенных геномов возбудителей клещевых боррелиозов (*Borrelia burgdorferi* и др.), моноцитарного эрлихиоза (*Ehrlichia chaffeensis*) и гранулоцитарного анаплазмоза человека (*Anaplasma phagocytophilum*) проводили с помощью мультиплексной тест-системы АмплиСенс (ФГУН ЦНИИ эпидемиологии, Москва); ДНК риккетсий выявляли методом ПЦР с набором реагентов ЗАО «Синтол» (Москва) и праймерами RTF (5'-GTGGTGGCGGATCGC-AGAGATGCT-3'), RTR1 (5'-TCGCCGTCTTGCTTCCCTCTGTAAACA-3'), комплементарными участку гена 16S рибосомальной РНК микроорганизмов порядка *Rickettsiales*. В последующем для выявления микроорганизмов рода *Rickettsia* использовали праймеры, комплементарные участку гена *ompB* RtsfF (5'-GGGTGTAGGTCAGAACGTTA-CAACATTT-3'), RtsfR (5'-CCAGCTAA-ACCGCCTTCTTACTTT-3'), кодирующему поверхностный белок риккетсий.

Результаты и обсуждение

В ходе проведенных работ проанализирована фауна и численность клещей в отдельных биотопах острова, дана оценка их зараженности патогенами и опасности, которую они могут представлять для участников саммита АТЭС. На основе этого предложены меры по профилактике зоонозов.

При обследовании на острове выявлено пять видов иксодовых клещей: *Ixodes persulcatus*

Schulze (1930), *Ixodes pavlovskyi* Pomerantzev (1946), *Haemaphysalis concinna* Koch (1844), *Haemaphysalis japonica douglasi* Nuttall et Warburton (1915), *Dermacentor silvarum* Olenov (1932). Общая численность клещей по отдельным биотопам колебалась от 9,0 до 63,0 экз. на флаго-час. Непосредственно на полуострове Саперный, где в преддверии саммита развернуто основное строительство объектов и коммуникаций, обилие имаго составило 22,0 клеща на флаго-час. Подобные показатели численности следует считать достаточно высокими и, в случае зараженности клещей возбудителями болезней, представляющими эпидемиологическую опасность.

Наибольшая численность клещей (63,0 экз. на флаго-час) зарегистрирована на небольшом участке высокотравного болотистого луга (вейниково-осоковое сообщество), в зоне освоенных земель, где осуществляется выпас скота. Здесь выявлено три вида иксодид: *H. concinna*, *I. persulcatus*, *D. silvarum*. Абсолютно доминировал *H. concinna* (индекс доминирования (ИД) – 91,8 %); *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi* и *D. silvarum* представлены единичными особями. В зоне широколиственных лесов выявлено четыре вида иксодовых клещей: *I. persulcatus*, *I. pavlovskyi*, *H. concinna*, *H. j. douglasi*. По данным учета, проведенного вверх по течению реки Русская, ИД видов составил: *I. persulcatus* – 53,3; *H. concinna* – 33,3; *I. pavlovskyi* – 8,3; *H. j. douglasi* – 5,0 %.

Обнаружение имаго *I. pavlovskyi* (34 экз.) в одних биотопах с *I. persulcatus* позволяет считать популяцию первого вида на о. Русский самостоятельной. Ранее считали, что она поддерживается за счет постоянного заноса птицами. Симпатрия двух указанных видов характерна и для других районов Приморья [8].

Данные по зараженности четырех видов иксодовых клещей, собранных на о. Русский, приведены в таблице. Количество *D. silvarum* было недостаточным для оценки их зараженности. Показано, что все исследованные виды представляют эпидемиологическую угрозу.

РНК вируса КЭ обнаружена в 21,2 % *I. persulcatus*, 11,5 – *I. pavlovskyi*, 2,8 – *H. concinna* и 8,3 – *H. j. douglasi*. Таким образом, наибольшее эпидемиологическое значение, в силу большей вирусофорности и достаточно высокой численности, имеет таежный клещ.

Несмотря на количественное преобладание в сборах *H. concinna*, который доминировал в отдельных биотопах, его зараженность вирусом КЭ на порядок ниже, чем у таежного клеща, и самая низкая из исследованных видов. Вирусофорность *I. pavlovskyi* и *H. j. douglasi* фактически не различается (таблица). Но, учитывая более высокую численность *I. pavlovskyi* в обследованных биотопах острова, он играет большую роль в обеспечении циркуляции вируса КЭ. Меньшее эпидемиологическое значение *I. pavlovskyi* в отношении КЭ, по сравнению с *I. persulcatus*, соответствует данным, полученным исследователями в других частях ареала совместного обитания двух видов [6].

Результаты исследования клещей методом ПЦР

Вид клеща	Объем материала	Анализ на зараженность возбудителями				
		КЭ	ИКБ	КР	МЭЧ	ГАЧ
<i>I. persulcatus</i>	Исследовано	99	99	87	66	66
	Положительные: абс. и (%)	21 (21,2)	42 (42,4)	48 (55,2)	3 (4,5)	0 (0,0)
<i>I. pavlovskyi</i>	Исследовано	26	26	23	18	18
	Положительные: абс. и (%)	3 (11,5)	9 (34,6)	6 (26,1)	1 (5,6)	0 (0,0)
<i>H. concinna</i>	Исследовано	318	318	30	30	30
	Положительные: абс. и (%)	9 (2,8)	1 (0,3)	1 (3,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>H. j. douglasi</i>	Исследовано	12	12	10	12	12
	Положительные: абс. и (%)	1 (8,3)	0 (0,0)	2 (20,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Всего	Исследовано	455	455	150	126	126
	Положительные: абс. и (%)	34 (7,5)	52 (11,4)	57 (38,0)	4 (3,2)	0 (0,0)

Примечание. КЭ – клещевой энцефалит; ИКБ – иксодовые клещевые боррелиозы; КР – клещевые риккетсиозы; МЭЧ – моноцитарный эрлихиоз; ГАЧ – гранулоцитарный анаплазмоз.

Методом ИФА из 93 исследованных особей *I. persulcatus* антиген вируса КЭ обнаружен в 4 (4,3 %). Исходя из того, что средняя вирусофорность клещей по результатам применения этого метода в малоактивных очагах составляет 0,3 % [2], природный очаг КЭ на о. Русский следует отнести к эпидемически активному типу. При индивидуальном исследовании в ИФА 125 имаго *H. concinna*, 24 экз. *I. pavlovskyi* и 12 экз. *H. j. douglasi* антиген вируса КЭ не выявлен.

Патогенные для человека боррелии комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* выявлены в трех видах клещей, инфицированность которых составила: *I. persulcatus* – 42,4 %, *I. pavlovskyi* – 34,6 % и *H. concinna* – 0,3 % (таблица). Судя по этим данным, два вида рода *Ixodes* играют основную роль в обеспечении циркуляции боррелий в природных очагах ИКБ о. Русский.

Возбудитель моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ) выявлен в четырех иксодовых клещах, три из которых относятся к *I. persulcatus* (таблица). Возбудитель гранулоцитарного анаплазмоза не обнаружен.

На клещевые риккетсиозы исследовано методом ПЦР 150 иксодовых клещей четырех видов (таблица). В 57 особях зарегистрирована ДНК возбудителя, который может быть отнесен к роду *Rickettsia*: *I. persulcatus* – 48 (52,2 %), *I. pavlovskyi* – 6 (26,1 %), *H. concinna* – 1 (3,3 %), *H. j. douglasi* – 2 (20,0 %). В имаго иксодовых клещей выявляется также ДНК и других риккетсий порядка *Rickettsiales*: суммарное число особей, давших положительный результат – 76 (50,7 %).

Значительная зараженность риккетсиями клещей *Ixodes* согласуется с мнением Е.И.Болотина и др. [1] о возможно значительно большей, чем принято считать эпидемиологической значимости клещей этого рода в отношении клещевых риккетсиозов.

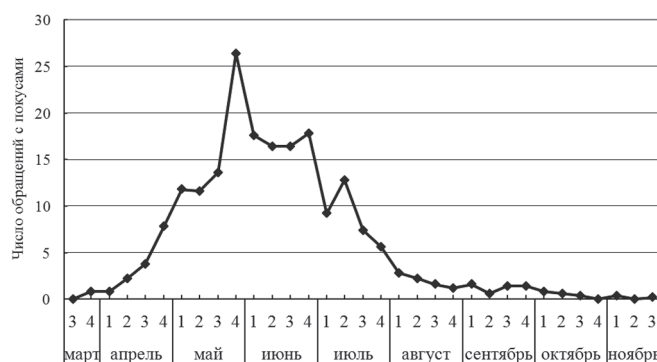
При индивидуальном исследовании зараженности клещей была установлена их микст-инфицированность, т.е. сочетанное заражение некоторых особей 2–3 видами возбудителей зоонозов: КЭ

и ИКБ обнаружены в 11 имаго *I. persulcatus* (11,1 %) и одном *I. pavlovskyi* (3,8 %); ИКБ и МЭЧ – в двух имаго *I. persulcatus* (2,0 %) и одном *I. pavlovskyi* (3,8 %); КЭ и КР – в семи *I. persulcatus* (8,0 %); ИКБ и КР – в 13 *I. persulcatus* (14,9 %); КЭ+ИКБ+КР – в пяти *I. persulcatus* (5,7 %).

Несомненно, что достаточно высокая численность и зараженность различными патогенами всех обнаруженных на о. Русский массовых видов иксодовых клещей, позволяет сделать вывод о серьезной эпидемиологической опасности в отношении зоонозов, передающихся с укусами этих переносчиков. Для полной оценки ситуации необходимы более репрезентативные наблюдения.

На рисунке приведены усредненные (за 2007–2011 гг.) еженедельные данные, отражающие характер сезонной активности переносчика, полученные на основе анализа обращаемости населения в Находкинское отделение Приморской противочумной станции для исследования на зараженность снятых с людей иксодовых клещей.

Из представленных данных следует, что несмотря на то, что саммит АТЭС будет проходить в сентябре месяце, когда активность всех видов иксодовых клещей значительно падает, опасность заражения людей сохраняется, т.к. случаи присасывания иксодид



Усредненные данные (2007–2011 гг.) еженедельной обращаемости населения в Находкинское отделение Приморской противочумной станции для исследования на зараженность присосавшихся особей иксодовых клещей

наблюдаются в течение всей осени. Это согласуется с данными литературы [3] об активности иксодовых клещей в Приморье до конца октября. Известно также, что *D. silvarum* и *H. j. douglasi* способны к зимовке на диких и домашних млекопитающих.

Выявленная сопряженность природных очагов болезней, микст-инфицированность клещей и предполагаемое прибытие на остров не вакцинированного от КЭ контингента, требует опираться на меры профилактики, связанные с акарицидными обработками территории, индивидуальным применением акарицидно-репеллентных средств и созданием пунктов, куда могут обратиться пострадавшие от укусов, с целью назначения этиотропных мер предотвращения болезней. В частности, весной–осенью 2012 г. необходимо провести углубленное весеннее эпизоотологическое обследование территории острова, обеспечить максимально широкий охват диагностическими исследованиями всех пострадавших от присасывания клещей, наметить участки природных биотопов, на которых в конце августа, в преддверии саммита АТЭС, должны быть проведены акарицидные обработки.

Следует учитывать, что подготовка к проведению саммита влечет существенную трансформацию природных биотопов острова. На нем происходит масштабное строительство новых объектов различного назначения, ожидается значительное увеличение численности постоянно проживающего и длительно находящегося на острове населения. В этой связи необходима разработка перспективного плана комплекса мер по профилактике заболеваемости инфекциями, передающимися клещами, среди населения острова. Несомненно, потребуется проведение вакцинации от КЭ. Возникает вопрос о целесообразности открытия на о. Русский собственного Центра по диагностике возбудителей трансмиссивных болезней. Исходя из дальнейших наблюдений за изменениями численности и видового состава иксодовых клещей, должны быть намечены участки, подлежащие обязательным акарицидным обработкам. Сроки обработок и их кратность требуют уточнения. Но, судя по полученным к настоящему времени данным о численности и сезонной активности клещей, существует необходимость проведения не менее двух акарицидных обработок (в середине апреля и в середине мая) эпидемиологически значимых территорий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болотин Е.И., Ананьев В.Ю., Бурухина Е.Г. Некоторые особенности экологии клещевых инфекций в Приморском крае. Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2009; 3(38):63–5.
2. Бочкова Н.Г., Башикиров В.Н., Левина Л.С. и др. Опыт

применения иммуноферментного метода для индикации вируса клещевого энцефалита в различных очагах. Вopr. вирусол. 1990; 2:165–7.

3. Бурухина Е.Г., Жигаев Д.С., Жебровская Е.В., Хомичук Т.Ф. Об опыте проведения акарицидных обработок на территории Всероссийского детского центра «Океан». Здоровье. Медицинская экология. Наука. 2009; 3(38):66–8.

4. Никитин А.Я., Сидорова Е.А., Андаев Е.И., Чеснокова М.В. Заболеваемость населения Сибирского и Дальневосточного федеральных округов инфекциями, передающимися клещами, в 2009–2010 гг. и прогноз на 2011 г. Пробл. особо опасных инф. 2011; 1(107):24–9.

5. Организация эпидемиологического надзора за клещевым риккетсиозом. Методические указания 3.1.1755-03. М.; 2004. 20 с.

6. Романенко В.Н., Кондратьева Л.М. Зараженность иксодовых клещей, снятых с людей, вирусом клещевого энцефалита на территории города Томска и его окрестностей. Паразитология. 2011; 1(45):3–10.

7. Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих – переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций. Методические указания 3.1.1027-01. М.; 2002. 55 с.

8. Таежный клещ *Ixodes persulcatus* Schulze (Acarina, Ixodidae). Морфология, систематика, экология, медицинское значение. Л.: Наука; 1985. 420 с.

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

1. Bolotin E.I., Anan'ev V.Yu., Burukhina E.G. [Some peculiarities of ecology of the tick-borne infections in Primorsk Territory]. Zdorov'e. Med. Ecologiya. Nauka. 2009; 3(38):63–5.

2. Bochkova N.G., Bashkirtsev V.N., Levina L.S. et al. [Experience in application of enzyme-linked immunoassay for indication of tick-borne encephalitis virus in different foci]. Vopr. Virusol. 1990; 2:165–7.

3. Burukhina E.G., Zhigayev D.S., Zhebrovskaya E.V., Khomichuk T.F. [Experience in application of acaricide treatment in the territory of the All-Russian child center "Ocean"]. Zdorov'e. Med. Ecologiya. Nauka. 2009; 3(38):66–8.

4. Nikitin A.Ya., Sidorova E.A., Andaev E.I., Chesnokova M.V. [Tick-borne infections incidence among the population of Siberian and Far East federal districts in 2009 and 2010 and prognosis for 2011]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2011; 107:24–9.

5. [Organization of epidemiological monitoring over tick rickettsiosis]. Methodological Regulations 3.1.1755-03. M., 2004. 20 p.

6. Romanenko V.N., Kondrat'eva L.M. [Infestation of ixodid ticks gathered from people with tick-borne encephalitis virus in the territory of the city Tomsk and its surroundings]. Parazitologia. 2011; 1(45):3–10.

7. [Collecting, survey, and preparation for laboratory analysis of blood-sucking arthropods – vectors of natural focal infections]. Methodological Regulations 3.1.1027-01. M., 2002. 55 p.

8. [Taiga Tick *Ixodes persulcatus* Schulze (Acarina, Ixodidae). Morphology, Taxonomy, Ecology, and Medicinal Significance]. L.: Nauka; 1985. 420 p.

Authors:

Balakhonov S.V., Nikitin A.Ya., Adel'shin R.V., Andaev E.I., Borisova T.I., Verzhutskaya Yu.A., Verzhinin E.A., Klimov V.T., Sidorova E.A. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russia. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Zvereva T.V., Allenov A.V., Borisenko E.A., Gordeyko N.S., Krasnoshchekov V.N. Primorsk Plague Control Station. 46, Dzerzhinskogo St., Ussuriysk, Primorsky Krai, 692512, Russia.

Об авторах:

Балахонov С.В., Никитин А.Я., Адельшин Р.В., Андаев Е.И., Борисова Т.И., Вержущкая Ю.А., Вершинин Е.А., Климов В.Т., Сидорова Е.А. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. 664047, Иркутск, ул. Триллссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Зверева Т.В., Алленов А.В., Борисенко Е.А., Гордейко Н.С., Краснощечков В.Н. Приморская противочумная станция. 692512, Приморский край, г. Уссурийск, ул. Дзержинского, 46. E-mail: ppchsadm@mail.ru

Поступила 13.01.12.

И.Г.Карнаухов¹, В.А.Старшинов¹, В.П.Топорков¹, А.В.Топорков¹, В.Б.Коротков²

ОСЛОЖНЕНИЯ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ОБСТАНОВКИ И РИСК ВОЗНИКНОВЕНИЯ ЧРЕЗВЫЧАЙНЫХ СИТУАЦИЙ В ОБЛАСТИ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО БЛАГОПОЛУЧИЯ ПРИ СТИХИЙНЫХ БЕДСТВИЯХ И АНТРОПОГЕННЫХ КАТАСТРОФАХ

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»;²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Саратовской области», Саратов

Дается обзор чрезвычайных ситуаций (ЧС) в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения по имеющимся литературным сведениям и данным проводившегося мониторинга (за 2010 г.) и определенных событий (стихийные бедствия, антропогенные катастрофы), в условиях которых такие ЧС возникают или могут возникнуть. В качестве условий, предшествующих ЧС, в обзоре рассмотрены стихийные бедствия (природные катастрофы) – землетрясения, извержения вулканов, наводнения, цунами, засухи и антропогенные катастрофы – гуманитарные, техногенные катастрофы, биотеррористические акты, аварии при работе с патогенными биологическими агентами. Определены нозологические формы инфекционных болезней, наиболее актуальные в условиях стихийных бедствий и антропогенных катастроф, а также обстоятельства и факторы, предрасполагающие к их активизации. Приведены данные по эпидемиологическим осложнениям в условиях стихийных бедствий и антропогенных катастроф, а также примеры применения биологических агентов в террористических и военных целях.

Ключевые слова: чрезвычайная ситуация, санитарно-эпидемиологическое благополучие, стихийные бедствия, антропогенные катастрофы.

I.G.Karnaukhov¹, V.A.Starshinov¹, V.P.Toporkov¹, A.V.Toporkov¹, V.B.Korotkov²

Complications of Sanitary-Epidemiological Situation and Risk of Emergency Situations Appearance in the Sphere of Sanitary and Epidemiological Well-Being in the Natural and Anthropogenic Catastrophes

¹Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov; ²Center of Hygiene and Epidemiology in the Saratov Region, Saratov

Presented is the survey of emergency in the sphere of sanitary and epidemiological well-being of the population as per reported cases and data of the monitoring which has been carried out in 2010. Natural and anthropogenic disasters where such emergency is appeared or can appear are considered too. Natural catastrophes - earthquakes, volcanic explosions, overflow water, tsunami, dry spell and anthropogenic catastrophes – humanitarian, technogenic catastrophes, bioterroristic acts, accidents, related to operation with pathogen biological agents are examined in this review as the conditions preceding the emergency. Nosological entities for the infection diseases, which are most common in natural and anthropogenic catastrophes as well as conditions and factors predisposing to their activation, are identified. Shown is the data of adverse epidemiological situation caused by natural and anthropogenic catastrophes and the examples of use of the biological agents for terroristic aims.

Key words: emergency situation, sanitary and epidemiological well-being, natural disasters, anthropogenic catastrophes.

При рассмотрении осложнений санитарно-эпидемиологической обстановки при стихийных бедствиях и антропогенных катастрофах необходимо остановиться прежде всего на определении самого термина «чрезвычайная ситуация». Определение чрезвычайных ситуаций в области общественного здравоохранения (санитарно-эпидемиологического благополучия населения), имеющих международное (национальное) значение, даны в Международных медико-санитарных правилах (ММСП, 2005 г.) [7], энциклопедических словарях [12, 15], статье А.В.Топоркова и соавт. [23]. В Российской Федерации санитарно-эпидемиологическими правилами СП 3.4.2318-08 «Санитарная охрана территории Российской Федерации», гармонизированными с ММСП (2005 г.) нормативно закрепляется термин «чрезвычайная ситуация в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения».

Существо определений состоит в том, что к ЧС отнесены экстраординарные события санитарно-эпидемиологического характера, требующие проведения мероприятий по их контролю (эпидемиологический надзор, санитарная охрана) на национальном и международном уровне при необходимости и неизбежности межведомственного (межсекторального) сотрудничества и взаимодействия.

В понятие ЧС входят инфекционные болезни и неинфекционные заболевания (алиментарные отравления), обусловленные действием биологических, химических, радиоактивных факторов, санитарно опасных товаров и грузов, которые могут создать угрозу санитарно-эпидемиологическому благополучию населения и препятствия для международных перевозок и торговли.

Что касается инфекционных болезней, то номенклатура их принадлежности к чрезвычайным ситуа-

циям приведена в приложении 2 ММСП (2005 г.) – 4 болезни и 10 нозологических форм, способных вызвать ЧС; санитарно-эпидемиологических правилах «Санитарная охрана территории Российской Федерации» (2008 г.) – 16 нозологических форм; документе по санитарной охране таможенной территории Таможенного союза – 24 нозологические формы. Во всех вышеперечисленных документах списки инфекционных болезней, ассоциируемых с ЧС, остаются открытыми, поскольку завершаются рубрикой «и другие». Это значит, что существуют другие инфекционные болезни и обстоятельства их эпидемического проявления, которые могут быть определены с помощью специального алгоритма (Приложение 2 ММСП-2005 г. и СП 3.4.2318 – 08).

В указанных выше документах поименованы и другие события санитарно-эпидемиологического характера, которые могут быть определены с помощью упомянутого алгоритма как чрезвычайная ситуация. С учетом приведенных выше определений и номенклатуры ЧС составлен данный обзор.

В литературе имеется значительное число публикаций, посвященных рассмотрению эпидемических осложнений и ЧС, возникающих при стихийных бедствиях (природных катастрофах) различного характера. Наиболее часто эпидемические осложнения возникают в условиях наводнений или цунами. В табл. 1 приведены нозологические формы инфекционных болезней, зарегистрированные по данным ли-

тературы [5, 8, 9, 16, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 48, 49].

В условиях наводнения и цунами наиболее часто наблюдаются следующие группы инфекций: кишечные (холера, дизентерия, сальмонеллез, колиэнтерит, гепатит А, криптоспориоз), природно-очаговые (чума, сибирская язва, малярия, лептоспироз, туляремия, лихорадка долины Рифт, лихорадка Денге), воздушно-капельные (корь, менингококковая инфекция).

Санитарно-эпидемиологические осложнения при землетрясениях, техногенных катастрофах, социальных конфликтах и гуманитарных кризисах представлены в табл. 2.

Санитарно-эпидемиологические осложнения землетрясений. Нозологические формы инфекционных болезней, осложнявших санитарно-эпидемиологическую обстановку в условиях землетрясений, представлены сравнительно небольшим кругом инфекций (чума, кокцидиомикоз, малярия, корь, ОКИ) [3, 31, 32, 42, 43, 45]. Это, в первую очередь, природно-очаговые инфекции, активизация которых происходит при нарушении экологического равновесия в популяции носителей и переносчиков в результате действия природных сил, а также инфекции кишечной группы и воздушно-капельные инфекции, актуальные для всех событий, сопровождающихся концентрацией большого количества вынужденно перемещенных лиц на ограниченной территории в неадекватных санитарно-гигиенических условиях.

Таблица 1

Санитарно-эпидемиологические осложнения наводнений, цунами

Год, территория	Условия, осложнившие санитарно-эпидемиологическую обстановку	Инфекции, по которым возникли осложнения
1989–1990, Ботсвана, Индия	Наводнения в период сезона дождей	Чума
1992, Карачаево-Черкесская Республика	Сочетание природного события (сильные ливни, приведшие к вымыванию из почвы скотомогильников возбудителя сибирской язвы) и социальных факторов, связанных с трудностями осуществления ветеринарного и эпидемиологического надзора	Сибирская язва
1994, Приморский и Хабаровский края	Наводнение	Дизентерия, сальмонеллез, колиэнтериты, гепатит А, лептоспироз, туляремия и менингококковая инфекция
1996, Индия	Наводнение	Малярия
1996, Бразилия	Наводнение	Лептоспироз
1997, Краснодарский край	Наводнение	Лептоспироз
1997–1998, Кения, Сомали	Наводнение	Лихорадка долины Рифт
1998, Индия	Наводнение	Холера
1998, Центральная Америка	Сочетание тайфуна и наводнения	Холера, желудочно-кишечные инфекции, лептоспироз, лихорадка Денге
1999, Индия	Наводнение	Лептоспироз (легочная форма)
2000, Индия	Наводнение	Лептоспироз
2001, Якутия	Наводнение	Дизентерия и ОКИ, гепатит А
2001, Тайвань	Тайфун	Лептоспироз
2001, Индонезия	Наводнения	Криптоспориоз
2002, Перу	Наводнение	Малярия
2004, Бангладеш	Наводнение	Холера и ОКИ
2004, страны Юго-Восточной Азии	Цунами	Острые респираторные инфекции и ОКИ, малярия, корь
2004, Индонезия	Цунами	ОКИ, гепатит А

Имеется также достаточное количество публикаций, касающихся эпидемических осложнений и возникновения ЧС вследствие антропогенных катастроф.

Санитарно-эпидемиологические осложнения техногенных катастроф. По нашему мнению, круг нозологических форм, могущих представлять угрозу в условиях техногенных катастроф, может быть достаточно широк и определяется, прежде всего, возбудителями инфекционных болезней, хранящимися в учреждениях, осуществляющих работу с инфекционными агентами. Прочие инфекционные агенты, при определенных аварийных ситуациях способные вызвать эпидемические вспышки, распространены повсеместно (легионеллез, инфекции кишечной группы) [14].

Санитарно-эпидемиологические осложнения социальных конфликтов, гуманитарных кризисов. Среди нозологических форм, осложняющих эпидемиологическую обстановку в условиях гуманитарных кризисов и вооруженных конфликтов можно

назвать практически любую природно-очаговую инфекционную болезнь, поскольку в первую очередь возникают предпосылки для активизации путей и факторов их передачи за счет полного или частичного прекращения профилактических мероприятий в природных очагах и среди населения [4, 6, 10, 20, 22]. Данное положение в полной мере относится и к иммуноуправляемым инфекциям (корь, полиомиелит, дифтерия, коклюш и др.) из-за прекращения вакцинации людей на протяжении ряда лет. Среди населения, сосредоточенного во временных лагерях, возможны эпидемические осложнения по инфекциям кишечной и воздушно-капельной групп.

Чрезвычайные ситуации, вызванные применением биологических агентов в террористических целях. Чрезвычайные ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения могут быть вызваны преднамеренным использованием патогенных биологических агентов, в том числе в террористических целях [1, 2, 17, 18, 19, 21].

Известно более 40 инфекционных болезней, воз-

Таблица 2

Санитарно-эпидемиологические осложнения землетрясений, техногенных катастроф, социальных конфликтов и гуманитарных кризисов, применение биологических агентов в военных и террористических целях

Год, территория	Условия, осложнившие санитарно-эпидемиологическую обстановку	Инфекции, по которым возникли осложнения
<i>Санитарно-эпидемиологические осложнения землетрясений</i>		
1991, Филиппины	Землетрясение	Корь
1991, Коста-Рика	Землетрясение	Малярия
1994, Индия	Сочетание землетрясения, последующего наводнения и массового скопления людей (фестиваль)	Чума
1994, Мексика	Землетрясение	Кокцидиомикоз
2005, Пакистан	Землетрясение	ОКИ, корь
<i>Санитарно-эпидемиологические осложнения техногенных катастроф</i>		
2003–2004, Карачаево-Черкесская Республика	Аварии на водоразводящей сети водопровода	Гепатит А
2007, Свердловская область	Авария на системе горячего водоснабжения	Легионеллез
<i>Санитарно-эпидемиологические осложнения социальных конфликтов и гуманитарных кризисов</i>		
1965, Южный Вьетнам	Вооруженный конфликт	Чума
1989, Узбекистан	Межнациональный конфликт	ОКИ
1994–1995, Чеченская республика	Социальный конфликт с гуманитарными последствиями	Корь, коклюш, дифтерия, полиомиелит, ОКИ, шигеллез, вирусный гепатит А, чесотка, педикулез
1995, Республика Ингушетия	Миграция населения вследствие гуманитарного кризиса в Чеченской республике	ОКИ, гепатит А, корь, дифтерия, полиомиелит
<i>ЧС, вызванные применением биологических агентов</i>		
1346, г. Каффа (Феодосия)	Осада татарами г. Каффы	Чума
1422, Чехия	Религиозная война	Чума
1754–1767,	Захватнические действия в Северной Америке	Натуральная оспа
1917	Распространение германскими войсками возбудителей опасных инфекционных болезней среди скота	Сибирская язва, сеп
1940–1942, Китай	Применение японской армией биологического оружия	Чума, сибирская язва, паратиф
1952, Корея, Китай	Диверсионное применение возбудителей опасных инфекционных болезней для заражения людей и сельскохозяйственных посевов	Чума, холера, сибирская язва, возбудители, уничтожающие сельскохозяйственные посевы
1981, Куба	Диверсионное применение зараженных комаров	Лихорадка Денге
1984, США	Террористический акт	Сальмонеллез
2001, США	Террористический акт	Сибирская язва

будители которых могут быть использованы в качестве патогенных агентов в террористических целях. К ним относятся чума, сибирская язва, холера, оспа, контагиозные вирусные геморрагические лихорадки и др., вызывающие тяжелые формы заболевания, способные к эпидемическому распространению, отличающиеся высокой контагиозностью и трудностью в обнаружении.

ЧС в области санитарно-эпидемиологического благополучия, возникшие вследствие стихийных бедствий или антропогенных катастроф и зафиксированные по данным мониторинга, проводимого центром мониторинга ЧС РосНИПЧИ «Микроб» в 2010 г.

Поиск чрезвычайных ситуаций в мире за 2010 г. проводился по данным сети Интернет (ведущие информационные агентства, международная медицинская гуманитарная организация «Врачи без границ», данные ВОЗ).

В результате мониторинга [24–30] в 2010 г. выявлены следующие эпидемические осложнения и ЧС (табл. 3).

Ярким примером эпидемического осложнения природной катастрофы (землетрясения) является эпидемия холеры на Гаити. 12 января 2010 г. на Гаити произошло разрушительное землетрясение, погибло более 230 тыс. человек. До сих пор почти 800 тыс. граждан страны проживают в палаточных городках, они в значительной мере лишены доступа к элементарным бытовым удобствам. Обстановку в стране осложнил ураган «Томас», в результате которого погибли 20 человек и были разрушены системы питьевого водоснабжения [13].

Эпидемия холеры началась на северо-востоке Гаити в конце октября 2010 г. По данным Панамериканской организации здравоохранения, на 8 апреля 2011 г. на Гаити зарегистрировано 274418 больных холерой, из них 4787 умерших. Из общего числа больных холерой 53,5 % были госпитализированы. Холерой поражены все 10 департаментов Гаити.

Общий показатель летальности по стране – 2,3 %. В настоящее время холерой оказалось поражено около 2 % населения страны. Зарегистрированы выносы холеры с Гаити: в Доминиканскую Республику – 1300 случаев, Венесуэлу – 452 случая, США – 9 случаев и Канаду – 1 случай. К возникновению эпидемии холеры на Гаити, по мнению французского эпидемиолога R.Piargoux, наиболее вероятно причастны военнотружущие миротворческих сил ООН, прибывшие из Непала. Штамм холерного вибриона, ставший этиологическим агентом эпидемии, был исследован в Центре контроля и профилактики заболеваний (CDC) и оказался генетически схожим со штаммами, циркулирующими в Юго-Восточной Азии. Особенностью штамма также является его повышенная вирулентность [13].

Таким образом, по данным научных публикаций и собственных наблюдений, эпидемические осложнения и ЧС в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения могут наблюдаться при многих стихийных бедствиях и антропогенных катастрофах. Тем не менее, по поводу частоты возникновения эпидемических осложнений существуют различные точки зрения.

В работе зарубежных специалистов [35], посвященной рассмотрению вопроса возникновения эпидемий после геофизических катастроф (землетрясения, извержения вулканов, цунами), проведен анализ медицинской литературы и данных, полученных от гуманитарных агентств и ВОЗ с 1985 по 2004 год. Из более 600 зафиксированных катастроф приводятся данные лишь о трех, явившихся причиной возникновения эпидемий (кори, возникшей после извержения вулкана Пинатубо на Филиппинах; кокцидиомикоза после землетрясения в Калифорнии, малярии, вызванной *Plasmodium vivax*, в Коста-Рике, после землетрясения и сильных дождей). На основании этого делается вывод о незначительном риске возникновения эпидемических осложнений природных катастроф.

Таблица 3

ЧС в области санитарно-эпидемиологического благополучия, зафиксированные по данным мониторинга, проводимого центром мониторинга ЧС РосНИПЧИ «Микроб» в 2010 г.

Территория	Условия, осложнившие санитарно-эпидемиологическую обстановку	Инфекции, по которым возникли осложнения
Замбия	Наводнение в результате обильных дождей, послужившее причиной загрязнения источников водоснабжения	Холера
Уганда	Наводнение в результате обильных дождей, послужившее причиной загрязнения источников водоснабжения	Холера
Бразилия	Обильные дожди, сформировавшие условия для размножения переносчиков инфекции – комаров <i>Aedes Aegypti</i>	Лихорадка Денге
Пакистан	Наводнение в результате обильных дождей	Вспышки ОКИ, глазных и кожных инфекций, малярии, кори во временных лагерях беженцев
Гватемала	Тайфун «Агата»	Случаи ОКИ и инфекции дыхательных путей во временных лагерях
Киргизия	Межнациональный конфликт	Обострение санитарно-эпидемиологической ситуации в Киргизском городе Ош, вызванное резким увеличением количества случаев заболевания дизентерией в связи с приобретением продуктов питания в стихийных местах торговли, в антисанитарных условиях
Гаити	Землетрясение, ураган «Томас»	Холера

Сходное исследование, проведенное другой группой авторов [47], также посвященное вопросу возникновения эпидемических осложнений природных катастроф, показывает, что риск возникновения вспышек инфекционных заболеваний после природных катастроф низок в том случае, если катастрофа не спровоцировала масштабного переселения людей и не сопровождается разрушением на пострадавшей территории объектов коммунальной инфраструктуры и прекращением функционирования служб здравоохранения. Авторами выделены группы заболеваний, риск возникновения которых велик при масштабном переселении людей в результате различных стихийных бедствий. Это инфекции кишечной группы (холера, сальмонеллез, криптоспориоз, лептоспироз, гепатит А и Е), воздушно-капельные (корь, менингит, ОРЗ), трансмиссивные (малярия), а также сапронозные инфекции (столбняк, кокцидиозидоз).

В соответствии с данными отечественных исследователей, существуют группы событий, в первую очередь, гуманитарные кризисы и масштабные природные катастрофы, при которых осложнения санитарно-эпидемиологической обстановки наблюдаются чаще прочих.

В монографии Г.Г.Онищенко и соавт. [11], посвященной противоэпидемическому обеспечению населения Республики Южная Осетия в период ликвидации последствий вооруженного конфликта, рассматриваются последствия различных событий, вызванных природными катастрофами, эпидемиями и гуманитарными кризисами. Авторы приходят к выводу, что эпидемические осложнения наиболее часто (в 63 %) наблюдаются при гуманитарных кризисах, приводящих к полному или частичному нарушению функционирования систем здравоохранения и объектов коммунальной инфраструктуры на пострадавшей территории, наличию большого числа беженцев, сосредоточенных в неудовлетворительных санитарно-гигиенических условиях. Это полностью согласуется и с данными зарубежных авторов [40].

Среди стихийных бедствий, наиболее часто сопровождающихся осложнениями санитарно-эпидемиологической обстановки и угрозой возникновения вспышек инфекционных болезней, на первом месте стоят крупные наводнения. Так, по данным Г.Г.Онищенко и соавт. [9], 90 % наиболее тяжелых последствий природных катастроф приходится на четыре вида: наводнения (40 %), тайфуны (20 %), землетрясения и засухи (по 15 %).

На формирование неблагоприятной эпидемиологической обстановки при стихийных бедствиях и антропогенных катастрофах оказывает влияние целый комплекс факторов [9, 22]:

- интенсивные миграции различных контингентов населения и, как следствие, заносы возбудителей инфекции;
- возникновение новых мест размножения грызунов и переносчиков болезней, миграция грызунов из природных биотопов в антропогенные зоны;

- нарушение экологического равновесия в природных очагах инфекций и, как следствие, их активизация;

- увеличение контактов населения с природными очагами инфекций;

- возникновение стрессовых ситуаций, ухудшение питания, значительное снижение показателей естественной резистентности организма человека;

- снижение уровня иммунных прослоек населения, обусловленное недостатками в проведении вакцинации;

- разрушение коммунальных объектов, ухудшение гигиенических условий окружающей среды, скученность населения;

- частичное или полное разрушение сети лечебных и противоэпидемических учреждений;

- активизация механизмов передачи местных инфекций.

Адекватное и своевременное проведение профилактических и противоэпидемических мероприятий при угрозе возникновения ЧС в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения, как правило, позволяет избежать санитарно-эпидемиологических осложнений.

Таким образом, подводя итог рассмотрения вопроса возникновения санитарно-эпидемиологических осложнений стихийных бедствий и антропогенных катастроф, можно сделать следующие выводы:

1. Наибольшее число нозологических форм различных инфекционных болезней наблюдается в условиях гуманитарных кризисов и военных конфликтов. При этом полностью или в значительной мере страдают системы жизнеобеспечения людей, коммуникации, инфраструктура, а также система здравоохранения, ответственная за профилактику и борьбу с инфекционными болезнями. Значительные массы людей оказываются сосредоточенными в лагерях беженцев без обеспечения надлежащих санитарно-гигиенических условий, качественной питьевой воды и продуктов. Данные обстоятельства определяют широкий перечень возбудителей инфекционных болезней, могущих осложнить санитарно-эпидемиологическую обстановку: природно-очаговые инфекции (чума, сибирская язва, малярия, лептоспироз, туляремия, арбовирусные лихорадки), иммуноуправляемые инфекции (корь, полиомиелит, дифтерия, коклюш и др.), воздушно-капельные и инфекции кишечной группы.

2. Для наводнений и цунами так же, как и в предыдущих ситуациях, характерно наличие широкого спектра угроз санитарно-эпидемиологическому благополучию населения в связи с разрушением систем жизнеобеспечения (водопровод, канализация) и объектов социальной инфраструктуры, попаданием отходов жизнедеятельности и производства в окружающую среду; активизацией механизмов передачи инфекции за счет неконтролируемого размножения переносчиков инфекции, распространением носителей в населенные пункты; концентрацией лю-

дей на изолированных территориях при отсутствии медицинской помощи и адекватных санитарно-гигиенических условий.

Тем не менее, органы и учреждения здравоохранения государства, в целом, сохранены, и возникают лишь трудности в своевременном оказании медицинской помощи населению в труднодоступных местах. Несмотря на то, что стихийные бедствия данного вида возникают сравнительно часто (21 анализируемый случай), тяжесть эпидемических осложнений в данном случае ниже, чем в условиях гуманитарных кризисов и военных конфликтов.

3. В условиях землетрясений риск возникновения эпидемических осложнений невелик. Ежегодно в мире регистрируются тысячи землетрясений различной силы. Зоной наибольшей сейсмической активности на Земле является так называемое «Огненное кольцо» (или Тихоокеанический пояс). Здесь происходит около 90 % всех землетрясений земного шара. Описанные в литературе случаи возникновения эпидемических осложнений редки и связаны с сочетанием других факторов, осложняющих обстановку на пострадавшей территории (связь с наводнением при вспышке чумы в Индии в 1994 г., скученность населения в местах временного размещения при вспышке кори на Филиппинах в 1991 г. и диареи в Пакистане в 2005 г.). Возникновение ЧС после землетрясения может быть связано также с заносом инфекции, как это имело место на Гаити в 2010 г.

4. В условиях техногенных катастроф возникают эпидемические осложнения в случаях аварий в учреждениях, использующих в своей деятельности культуры возбудителей опасных инфекционных болезней, или при ненадлежащем контроле ремонтно-восстановительных работ на объектах коммунальной инфраструктуры.

5. ЧС, связанные с применением патогенных биологических агентов в террористических целях, несмотря на редкие эпизоды (8 анализируемых случаев за 100 лет) представляют собой серьезную угрозу и требуют наличия развитой лабораторной базы для их верификации, а также хорошо оснащенных мобильных сил оперативного реагирования, предназначенных для ликвидации последствий их применения.

6. Обеспечение эпидемиологического благополучия населения в зоне стихийных бедствий и антропогенных катастроф, связанных со значительными разрушениями инфраструктуры и полным или частичным прекращением функционирования системы здравоохранения, достигается за счет быстрого и эффективного восполнения их санитарно-профилактической и противоэпидемической деятельности за счет прибывших специалистов санитарно-эпидемиологического и лечебно-профилактического профиля.

Работа выполнена по государственному контракту № 65-Д от 25.07.2011 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авхименко М.М., Бабенко О.В., Агапов В.И., Большаков В.Н. Терроризм: некоторые медицинские, социальные и психологические аспекты. Военно-мед. журн. 1999; 9:20–4.
2. Голубинский Е.П., Майборода А.А. Противодействие биотерроризму и биологическая безопасность. Иркутск: РИО ГУ НЦ РВХ ВСНЦ СО РАМН; 2006. С. 26–49.
3. Грижебовский Г.М., Топорков В.П., Брюханова Г.Д., Ефременко В.И., Бейер А.П., Мезенцев В.М. Эпидемиологическая характеристика вспышки чумы в Индии в 1994 г. Пробл. особо опасных инф. 2003; 85:28–37.
4. Дятлов А.И., Грижебовский Г.М. Экологические предпосылки чрезвычайных ситуаций с эпидемиологическими последствиями. Медицина катастроф. 1999; 4 (28):45–6.
5. Калашиников И.А., Мезенцев В.М., Мкртчян М.О., Грижебовский Г.М., Брюханова Г.Д. Особенности лептоспироза в Краснодарском крае. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2003; 6:8–71.
6. Коробкова Е.И. Вакцинация против чумы в зарубежных странах и в СССР. Эффективность вакцинации против легочной чумы. Пробл. особо опасных инф. 1968; 3:147–56.
7. Международные медико-санитарные правила (2005 г.). ВОЗ: Женева. 2006. 70 с.
8. Мельниченко П.И., Лобзин Ю.В., Корнюшко И.Г., Волжанин В.М., Огарков П.И., Васильев В.В. и др. Опыт предупреждения инфекционных заболеваний при ликвидации последствий цунами в Индонезии. Военно-мед. журн. 2005; 6:4–8.
9. Онищенко Г.Г., Ефременко В.И., Брюханова Г.Д. Обеспечение санитарно-эпидемиологической безопасности населения при наводнении в Южном федеральном округе России. М.: ГОУ ВУНМЦ; 2005. 250 с.
10. Онищенко Г.Г., Ефременко В.И., Грижебовский Г.М. Противоэпидемическое обеспечение населения в условиях вооруженного конфликта в Чеченской республике. Ставрополь: Ставрополье; 1996. 256 с.
11. Онищенко Г.Г., Куличенко А.Н., Грижебовский Г.М. Противоэпидемическое обеспечение населения Республики Южная Осетия в период ликвидации последствий вооруженного конфликта. Ставрополь: Ставропольбланкиздат; 2009. 196 с.
12. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Биологическая безопасность. Термины и определения. М.: Медицина; 2011. 152 с.
13. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Щуковская Т.Н., Смирнова Н.И., Никифоров А.К., Еремин С.А., Топорков В.П. Специфическая профилактика холеры в современных условиях. Пробл. особо опасных инф. 2011; 1(107):5–12.
14. Онищенко Г.Г., Лазикова Г.Ф., Чистякова Г.Г., Демина Ю.В., Никонов Б.И., Романенко В.В. и др. Эпидемиологические версии расследования вспышки легионеллеза в г. Верхняя Пышма. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2008; 2:77–82.
15. Онищенко Г.Г., Покровский В.И., редакторы. Профилактическая медицина и эпидемиология. Смоленск: Москва; 2010. 756 с.
16. Онищенко Г.Г., Протодаконов А.П., Чернявский В.Ф. Опыт обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения на примере ликвидации последствий наводнения (Якутия. Северные широты. Бассейновый подход). М.: Медицина; 2004. 432 с.
17. Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Мартынюк Р.А. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза. Вестник РАН. 2003; 73(3):195–204.
18. Онищенко Г.Г., Федоров Ю.М., Тихонова Н.Г., Липницкий А.В., Алексеев В.В. Противодействие биотерроризму как новая проблема эпидемиологии. Эпидемиол. и инф. бол. 2003; 2:4–6.
19. Онищенко Г.Г., Шапошников А.А., Субботин В.Г., Демина Ю.В., Никонов Б.И., Романенко В.В. и др. Противодействие биологическому терроризму. М.: Петит-А; 2003. 301 с.
20. Петров В.А., Чибуров В.И., Евченко Ю.М., Попов В.А., Грижебовский Г.М., Проценко С.Л. и др. Санитарный контроль в области гигиены питания в г. Грозном в чрезвычайной ситуации. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1996; 3(Приложение):53–7.
21. Супотницкий М.В., Супотницкая Н.С. Очерки истории чумы. Кн. 2. Чума бактериологического периода. М.: Вузовская книга; 2006. 696 с.
22. Тихонов Н.Г., Онищенко Г.Г., Яковлев А.Т. Руководство по организации и проведению санитарно-эпидемиологических мероприятий оперативными службами санэпиднадзора в чрезвычайных ситуациях. Волгоград: ВЕДО; 1995. 184 с.
23. Топорков А.В., Топорков В.П., Шиянова А.Е., Кутырев В.В. Чрезвычайная ситуация в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения как унифицированный объект надзора и оперативного реагирования в рамках современной стратегии борьбы с инфекционными болезнями. Пробл. особо опасных инф. 2009; 2(100):5–10.
24. Эпидемическая вспышка лихорадки Денге в Бразилии. <http://rian.ru/world/20100618/247477259.html>.

25. Эпидемические последствия наводнения в Пакистане. <http://www.rosbalt.ru/2010/08/03/758922.html>.
26. Эпидемические последствия наводнения в Пакистане. http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/pakistan_flood_20100803/ru/index.html.
27. Эпидемические последствия межнационального конфликта в Ошской области Кыргызстана. 30.06.2010. <http://www.oko-planet.ru/index.php>.
28. Эпидемическая вспышка холеры в Замбии. <http://rian.ru/society/20100416/222856551.html>.
29. Эпидемические последствия тайфуна «Арата». <http://eco.rian.ru/natural/20100605/242942673.html>.
30. Эпидемические последствия наводнения в Уганде. http://56.rosptrebznadzor.ru/epidemiologic_situation/rubezh/zabolevaemost/33038/30.06.2010
31. Acute jaundice syndrome. Weekly Morbidity and Mortality Report [Internet]. 2006; 23:8. [cited 20 Dec 2011]. http://www.who.int/hac/crises/international/pakistan_earthquake/sitrep/Pakistan_WMMR_VOL23_03052006.pdf
32. Acute watery diarrhea outbreak, Muzaffarabad. Weekly Morbidity and Mortality Report [Internet]. 2005; 1:6 [cited 20 Dec 2011]. Available from: http://www.who.int/hac/crises/international/pakistan_earthquake/sitrep/FINAL_WMMR_Pakistan_1_December_06122005.pdf
33. Barcellos C., Sabroza P.C. The place behind the case: leptospirosis risks and associated environmental conditions in a flood-related outbreak in Rio de Janeiro. Cad. Saude. Publica. 2001; 17(Suppl):59–67.
34. Brennan R.J., Kimba K. Rapid health assessment in Aceh Jaya District, Indonesia, following the December 26 tsunami. Emerg. Med. Australas. 2005; 17:341–50.
35. Floret N., Viel J.-F., Mauny F., Hoen B., Piarroux R. Negligible Risk for Epidemics after Geophysical Disasters. Emerg. Infect. Dis. 2006; 12(4):543–8.
36. Gagnon A.S., Smoyer-Tomic K.E., Bush A.B. The El Nino southern oscillation and malaria epidemics in South America. Int. J. Biometeorol. 2002; 46:81–9.
37. Karande S., Bhatt M., Kelkar A., Kulkarni M., De A., Varaiya A. An observational study to detect leptospirosis in Mumbai, India, 2000. Arch. Dis. Child. 2003; 88:1070–5.
38. Katsumata T., Hosea D., Wasito E.B., Kohno S., Hara K., Soeparto P. et al. Cryptosporidiosis in Indonesia: a hospital-based study and a community-based survey. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1998; 59:628–32.
39. Kondo H., Seo N., Yasuda T., Hasizume M., Koido Y., Ninomiya N. et al. Post-flood-infectious diseases in Mozambique. Prehosp. Disaster Med. 2002; 17:126–33.
40. Noji E.K. Public health in the aftermath of disasters. BMJ. 2005; 330:1379–81.
41. Qadri F., Khan A.I., Faruque A.S.G., Begum Y.A., Chowdhury F., Nair G.B. et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* diarrhea, Bangladesh. Emerg. Infect. Dis. 2005; 11:1104–7.
42. Saenz R., Bissell R.A., Paniagua F. Post-disaster malaria in Costa Rica. Prehosp. Disaster Med. 1995; 10:154–60.
43. Schneider E., Hajjeh R.A., Spiegel R.A., Jibson R.W., Harp E.L., Marshall G.A. et al. A coccidiomycosis outbreak following the Northridge, Calif. earthquake. JAMA. 1997; 277:904–8.
44. Sur D. Severe cholera outbreak following floods in a northern district of West Bengal. Indian J. Med. Res. 2000; 112:78–82.
45. Surmieda M.R., Lopez J.M., Abad-Viola G., Miranda M.E., Abellanosa I.P., Sadang R.A. et al. Surveillance in evacuation camps after the eruption of Mt. Pinatubo, Philippines. MMWR CDC Surveill. Summ. 1992; 41:963.
46. Vanasco N.B., Fusco S., Zanuttini J.C., Manattini S., Dalla Fontana M.L., Prez J. et al. Outbreak of human leptospirosis after a flood in Reconquista, Santa Fe, 1998. Rev. Argent. Microbiol. 2002; 34:124–31.
47. Watson J. T., Gayer M., Connolly M. A. Epidemics after Natural Disasters. Emerg. Infect. Dis. 2007; 13(1):1–5.
48. World Health Organization. Epidemic-prone disease surveillance and response after the tsunami in Aceh Province, Indonesia. Wkly Epidemiol. Rec. 2005; 80:160–4.
49. Yang H.Y., Hsu P.Y., Pan M.J., Wu M.S., Lee C.H., Yu C.C. et al. Clinical distinction and evaluation of leptospirosis in Taiwan – a case-control study. J. Nephrol. 2005; 18:45–53.
5. Kalashnikov I.A., Mezentshev V.M., Mkrtchyan M.O., Grizhebovsky G.M., Bryukhanova G.D. [Specific features of leptospirosis in the Krasnodar Territory]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2003; 6:8–71.
6. Korobkova E.I. [Vaccination against plague in foreign countries and in the USSR. The efficiency of vaccination against pneumonic plague]. Probl. Osobo. Opasn. Infek. 1968; 3:147–56.
7. International Health Regulations (2005). WHO: Geneva; 2006. 70 p.
8. Mel'nichenko P.I., Lobzin Yu.V., Korniyushko I.G., Volzhanin V.M., Ogarkov P.I., Vasil'ev V.V. et al. [The experience of how the infectious diseases were anticipated while liquidating the consequences of tsunami in Indonesia]. Voenno-Meditsinsky Zh. 2005; 6:4–8.
9. Onishchenko G.G., Efremenko V.I., Bryukhanova G.D. [Ensuring sanitary and epidemiological safety for the people at flood zones in the South Federal Region of Russia]. M.; 2005. 250 p.
10. Onishchenko G.G., Efremenko V.I., Grizhebovsky G.M. [Anti-epidemic ensuring of population under the conditions of armed conflict in the Chechen Republic]. Stavropol: Stavropol'e; 1996. 256 p.
11. Onishchenko G.G., Kulichenko A.N., Grizhebovsky G.M. [Anti-epidemic ensuring of population in the Republic of South Ossetia in the period of liquidation of consequences of military conflict]. Stavropol; 2009. 196 p.
12. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors. [Biological safety. Terms and definitions]. M.: Meditsina; 2011. 152 p.
13. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., Shchukovskaya T.N., Smirnova N.I., Nikiforov A.K., Eremin S.A., Toporkov V.P. [Cholera specific prophylaxis in modern conditions]. Probl. Osobo. Opasn. Infek. 2011; 107:5–12.
14. Onishchenko G.G., Lazikova G.F., Chistyakova G.G., Demina Yu.V., Nikonov B.I., Romanenko V.V. et al. [Epidemiologic versions in investigation of Legionnaires' disease outbreak in town Verkhnyaya Pyshma]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2008; 2:77–82.
15. Onishchenko G.G., Pokrovsky V.I., editors. [Preventive medicine and epidemiology]. Smolensk-Moskva; 2010. 756 p.
16. Onishchenko G.G., Protod'yakonov A.P., Chernyavsky V.F. [The example in ensuring sanitary and epidemiological well-being of the population during the liquidation of flood sequences. (Yakutia. Northern latitude. Basin approach)]. M.: Meditsina; 2004. 432 p.
17. Onishchenko G.G., Sandakhchiev L.S., Netesov C.V., Martynuk R.A. [Bioterrorism: national and global threat]. Vestnik RAN. 2003; 73(3):195–204.
18. Onishchenko G.G., Fedorov Yu.M., Tikhonova N.G., Lipnitsky A.V., Alekseev V.V. [Countermeasures to bioterrorism as a new problem for epidemiology]. Epidemiol. Infek. Bol. 2003; 2:4–6.
19. Onishchenko G.G., Shaposhnikov A.A., Subbotin V.G., Demina Yu.V., Nikonov B.I., Romanenko V.V. et al. [Countermeasures to biological terrorism]. M.: Pettit-A; 2003. 301 p.
20. Petrov V.A., Chiburaev V.I., Evchenko Yu.M., Popov V.A., Grizhebovsky G.M., Protchenko S.L. et al. [Sanitary control in the sphere of food hygiene in Grozny in emergency situation]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 1996; 3(Supplement):53–7.
21. Supotnitsky M.V., Supotnitskaya N.S. [Outline of plague history. Book 2. Plague of bacteriological period]. M.: Vuzovskaya kniga; 2006. 696 p.
22. Tikhonov N.G., Onishchenko G.G., Yakovlev A.T. [Handbook on organization and carrying out sanitary and epidemiological measures by the state sanitary and epidemiological operations in emergency]. Volgograd: Vedo; 1995. 184 p.
23. Toporkov A.V., Toporkov V.P., Shiyanova A.E., Kuttyrev V.V. [Emergency situation in the sphere of population sanitary and epidemiologic welfare as unified object of surveillance and active response in the scope of up-to-date strategy of infectious diseases control]. Probl. Osobo. Opasn. Infek. 2009; 100:5–10.
24. Outbreak of dengue hemorrhagic fever in Brazil [Internet]. Available from: <http://www.rosbalt.ru/2010/08/03/758922.html>.
25. Epidemic sequences of flood in Pakistan [Internet]. Available from: <http://www.rosbalt.ru/2010/08/03/758922.html>.
26. Epidemic sequences of flood in Pakistan [Internet]. Available from: http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/pakistan_flood_20100803/ru/index.html.
27. Epidemic sequences of ethnic conflict in the Osh region of Kyrgyzstan [Internet]. Available from: <http://www.oko-planet.ru/index.php.30.06.2010>
28. Cholera outbreak in Zambia [Internet]. Available from: <http://rian.ru/society/20100416/222856551.html>.
29. Epidemic sequences of typhoon “Agatha” [Internet]. Available from: <http://eco.rian.ru/natural/20100605/242942673.html>.
- 30/ Epidemic sequences of flood in Uganda [Internet]. Available from: http://56.rosptrebznadzor.ru/epidemiologic_situation/rubezh/zabolevaemost/33038/30.06.2010

Authors:

Karnaukhov I.G., Starshinov V.A., Toporkov V.P., Toporkov A.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrap@microbe.ru
 Korotkov V.B. Center of Hygiene and Epidemiology in the Saratov Region. 69, Bolshaya Gornaya St., Saratov, 410031, Russia. E-mail: fguz@gigiena-saratov.ru

Об авторах:

Карнаухов И.Г., Старшинов В.А., Топорков В.П., Топорков А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru
 Коротков В.Б. Центр гигиены и эпидемиологии в Саратовской области. 410031, Саратов, ул. Большая Горная, 69. E-mail: fguz@gigiena-saratov.ru

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

1. Avkhimenko M.M., Babenko O.V., Agapov V.I., Bol'shakov V.N. [Terrorism: some medicine, social and psychological aspects]. Voenno-Meditsinsky Zh. 1999; 9:20–4.
2. Golubinsky E.P., Maiboroda A.A. [Countermeasures to bioterrorism. Biological safety]. Irkutsk. 2006; 26–49.
3. Grizhebovsky G.M., Toporkov V.P., Bryukhanova G.D., Efremenko V.I., Beier A.P., Mezentshev V.M. [Epidemiologic characteristic of plague outbreak in India in 1994]. Probl. Osobo. Opasn. Infek. 2003; 85:28–37.
4. Dyatlov A.I., Grizhebovsky G.M. [Environmental prerequisites of emergency followed by epidemiological sequences]. Meditsina Katastrof. 1994; 4(28):45–6.

Поступила 07.11.11.

А.Н.Матросов¹, А.А.Кузнецов¹, Т.В.Князева¹, Д.Б.Вержущий², А.Я.Никитин², Л.С.Немченко²,
М.П.Григорьев³, Б.И.Левченко³, О.А.Бобенко³, А.Ю.Газиева³, В.Б.Коротков⁴

СОВРЕМЕННАЯ КОНЦЕПЦИЯ КОНТРОЛЯ ЧИСЛЕННОСТИ НОСИТЕЛЕЙ И ПЕРЕНОСЧИКОВ ЧУМЫ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

²ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск;

³ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь;

⁴ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Саратовской области», Саратов

В природных очагах чумы основными разделами неспецифической профилактики заболеваний остаются дезинсекция и дератизация. Современные стратегия, тактика, методы и средства борьбы с носителями и переносчиками чумы и сочетанных с ней природно-очаговых болезней выбираются с учетом эпидемического потенциала территорий, эпизоотической активности очагов, особенностей популяционной экологии животных, имеющих медицинское значение, необходимости сохранения биологического разнообразия животных в природных экосистемах, требований охраны природной среды и среды обитания человека от загрязнителей.

Ключевые слова: носители и переносчики чумы, природные очаги чумы, контроль численности животных, неспецифическая профилактика болезней, дезинсекция, дератизация.

A.N.Matrosov¹, A.A.Kuznetsov¹, T.V.Knyazeva¹, D.B.Verzhutsky², A.Ya.Nikitin², L.S.Nemchenko²,
M.P.Grigor'ev³, B.I.Levchenko³, O.A.Bobenko³, A.Yu.Gazieva³, V.B.Korotkov⁴

Modern Conception of the Control over the Abundance of Carriers and Vectors of Plague in the Territory of the Russian Federation

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov; Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk; Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol; Center of Hygiene and Epidemiology in the Saratov Region, Saratov

Disinfestation and deratization remain the main ways of non-specific disease prophylaxis in natural plague foci. Modern strategies, tactics, methods and means of control over carriers and vectors of plague and associated infectious diseases are selected with due consideration to epidemiological potential of territories, epizootic activity of a foci, peculiarities of population ecology of animals that are of a medical significance, preservation of biodiversity in natural ecosystems, and the requirements for human and natural environments protection from pollutants.

Key words: carriers and vectors of plague, natural plague foci, control over animal abundance, non-specific prophylaxis of infectious diseases, disinfestation, and deratization.

В настоящее время ситуация по чуме в мире остается сложной [34]. В государствах, имеющих общие границы с Россией, отмечаются заболевания людей чумой, нередко приобретающие групповой характер. Расширение международных связей со странами Африки, Азии и Америки, неблагоприятными по этой инфекции, увеличивает опасность завоза больных людей и инфицированных животных [2, 18]. На территории Российской Федерации и государств ближнего зарубежья выделяют 45 природных очагов чумы, в 31 из которых наблюдается высокая эпизоотическая активность [3, 4, 8]. Специалисты прогнозируют сохранение напряженной обстановки по чуме в ее природных очагах в ближайшее десятилетие [29]. Специфическая профилактика в очагах чумы, которая проводится в экстренных случаях при эпидемических осложнениях, постоянно совершенствуется, но она трудозатратна и не всегда может предотвратить заражение людей [35]. В этой связи одним из основных разделов эпидемиологического надзора за этой особо опасной болезнью является неспецифическая профилактика.

В границах Российской Федерации на ее южных рубежах выделяют 11 природных очагов чумы, отно-

сящих к степному, пустынному и горному типам. Все они отличаются по размерам, биоценотической структуре, характеру эпизоотических проявлений и эпидемическому потенциалу. Для каждого из них разработан регламент проведения профилактических мероприятий, в комплексе которого важное место отводится неспецифической профилактике заболеваний чумой и другими инфекционными болезнями [16, 19, 26].

Противочумная служба России и стран ближнего зарубежья накопила большой опыт по профилактике этой опасной инфекции. По мере выяснения роли грызунов в эпизоотологии чумы вытекал логически простой вывод о возможности оздоровления или ликвидации природных очагов путем тотального истребления носителей. В 30–60-х годах прошлого века при развитии разлитых (экстенсивных) эпизоотий чумы и эпидемиологических осложнениях применяли дератизационные обработки на больших площадях методом «сплошных очисток» [13, 21]. В 70-е годы обратили внимание на эффективность дезинсекционных обработок и объемы полевой дератизации несколько сократились [10, 11].

С 80-х годов прошлого века произошло сниже-

ние эпизоотической активности природных очагов чумы: даже при устойчивом ее проявлении эпизоотии стали носить локальный характер, на территории России заболевания чумой среди людей не регистрировались. Изучение вопросов эффективности истребительных мероприятий в различных очагах этого заболевания позволило пересмотреть тактику неспецифической профилактики: были прекращены дератизационные обработки на больших площадях с применением авиации, увеличены объемы работ по полевой дезинсекции [7, 31, 32].

С 90-х годов XX века в противочумную практику стали внедрять новые средства борьбы с носителями и переносчиками – более безопасные родентициды-антикоагулянты и инсектициды-пиретроиды [33]. Произошло критическое переосмысление опыта отечественной противочумной службы по неспецифической профилактике в очагах этого заболевания [9, 25, 31]. В современный период в результате обработки информационной базы данных о проявлениях чумы была осуществлена дифференциация всей энзоотичной территории России по уровню эпидемической опасности, что позволило оптимизировать все мероприятия по борьбе с грызунами и кровососущими членистоногими [19, 20, 24].

На территории природных очагов чумы в связи с естественными природными процессами, а также под усиливающимся или снижающимся антропогенным прессом на природные экосистемы, происходят значительные изменения в биоценозах, вызывающие трансформацию пространственной структуры очагов. Так, при смене климата, гидрологии, ландшафтов меняются видовой состав и ареалы животных – носителей и переносчиков чумы, характер их распределения по территории [1, 12]. В результате хозяйственной деятельности человека происходят глубокие, иногда необратимые процессы деградации природных систем, влияющие на активность природных очагов инфекционных болезней [17, 28, 36]. Наряду с этим, при ослаблении антропогенной нагрузки (снижение поголовья домашних животных, смена агротехники, разрушение системы орошаемого земледелия и др.) в аридных зонах происходит восстановление естественных биоценозов, приводящее к смене растительности и животного мира [23, 38]. В этой связи эффективная неспецифическая профилактика в очагах инфекционных болезней невозможна без постоянного эколого-эпизоотологического мониторинга, включающего комплексные наблюдения за абиотическими и биотическими условиями, эпизоотической активностью, состоянием популяций животных – носителей и переносчиков возбудителей зоонозов [24].

В настоящее время в границах энзоотичной по чуме территории установлены изменения ареалов, видового состава, численности и характера размещения носителей и переносчиков чумы, а также сочетанных с ней инфекций. В первое десятилетие XXI века численность основных и второстепенных носителей и переносчиков чумы в природных очагах России в большинстве случаев колебалась в пределах невысо-

ких значений, лишь на пиках численности достигая эпидемиологически опасных уровней. По-видимому, именно этим объясняется невысокая современная эпизоотическая активность большинства природных очагов чумы на территории России. Вместе с тем, сохранение на локальных участках стойкой энзоотии группировок зверьков и блох с численностью в несколько раз, а местами на порядок выше фоновой, обеспечивает достаточные условия для устойчивого сохранения возбудителя чумы в микроочагах. Все это определяет необходимость постоянного эпизоотологического мониторинга на энзоотичной по этой инфекции территории с целью предотвращения возможных эпидемиологических осложнений.

В современный период формируется и внедряется в практику новая концепция контроля численности носителей и переносчиков чумы. Изменилась сама его стратегия при планировании и проведении дезинсекции и дератизации. На участках очагов с высоким уровнем эпидемической опасности, суммарная площадь которых составляет лишь 3,4 %, эти мероприятия проводятся как в населенных пунктах, так и в природных биотопах. На участках со средним уровнем эпидемической опасности, занимающих 7 % площади очагов, дезинсекцию и дератизацию осуществляют при наличии эпизоотий только в населенных пунктах, их окрестностях и рекреационных зонах. На большей части территории природных очагов (около 90 % площади), где плотность населения низкая и проявления чумы до настоящего момента не отмечались, отсутствует необходимость в проведении экстренных мероприятий по дезинсекции и дератизации. Однако здесь, как и на всей энзоотичной по чуме территории, осуществляют заблаговременные мероприятия, включающие проведение санитарно-гигиенических и технических работ, дератизацию и дезинсекцию в населенных пунктах и на их незастроенных территориях при выявлении высокой численности грызунов и кровососущих членистоногих.

В настоящее время в природных биотопах полностью отказались от проведения дезинсекции и дератизации по типу заблаговременной профилактики с применением высокоперсистентных, то есть длительно сохраняющихся в окружающей среде химических средств. Обязательно учитывают, что при проведении дезинсекции длительность остаточного действия препаратов будет зависеть от времени существования убежищ млекопитающих. Так, таксоценозы нор сусликов, сурков, пищух в плотных грунтах могут длительно не восстанавливаться после обработок инсектицидами, в то время как норы песчанок, мышей и полевков эфемерны, и пулелицидный эффект в их микробиоценозах может быть краткосрочным.

В населенных пунктах, их окрестностях и рекреационных зонах при проведении заблаговременной профилактики основное внимание уделяют санитарно-техническим мероприятиям, направленным на разрушение среды обитания синантропных и экзантропных видов носителей и переносчиков зоонозов, предупреждающим их массовое размножение и

расселение. Однако при высокой численности с этими целями могут использоваться механические средства и химические пестициды. При выявлении эпизоотий чумы и эпидемических осложнениях преимущественно используют химические средства дезинсекции и дератизации, которые могут обеспечить купирование и ликвидацию очага заражения в сжатые сроки. Для проведения экстренной профилактики в современном арсенале средств дезинсекции (дезакаризации) преобладают пиретроидные препараты, а также фосфорорганические соединения и карбаматы. Перспективно использование неоникотиноидов и фенилпиразолов. Для дератизации применяют в основном антикоагулянты, но в экстренных случаях для ликвидации эпидемических очагов приходится использовать приманки с ядами острого действия [6]. Экстренная профилактика заболеваний чумой в ее природных очагах финансируется противочумными учреждениями из бюджета. Санитарно-гигиенические мероприятия, включающие дезинсекцию и дератизацию в населенных пунктах, в обязательном порядке организуют и оплачивают все хозяйственные субъекты на основе заключаемых договоров с соответствующими организациями и частными предпринимателями, имеющими право на этот вид деятельности.

При планировании и проведении мероприятий по неспецифической профилактике чумы и сочетанных с ней инфекций одной из основных проблем является сохранение биологического разнообразия животных в природных биоценозах [14, 37]. Вместе с тем, истребление инвазивных видов животных (синантропных, агрофильных) не противоречит принципам сохранения биоразнообразия: борьба с опасными чужеродными видами, имеющими медицинское, хозяйственное или интрузивное значение, необходима. Использование химических средств борьбы с возбудителями, носителями и переносчиками инфекций приводит к сохранению и накоплению токсических продуктов (поллютантов) в живых организмах, почве, воде и воздухе. Это может негативно отражаться на здоровье людей, домашних и диких нецелевых видов животных [5, 27]. В целях охраны редких видов животных, во избежание загрязнения природной среды и среды обитания человека пестицидами, ограничивают объемы профилактических обработок с применением высокотоксичных и высокоперсистентных химических средств. В природных биотопах дезинсекцию и дератизацию проводят на локальных участках проявлений чумы и других опасных инфекций против целевых видов животных только при наличии риска заболеваний людей.

Таким образом, даже при обнаружении эпизоотий чумы на участках, располагающихся вдали от населенных пунктов и не посещаемых человеком, истребительные мероприятия в поселениях диких грызунов проводить нецелесообразно. Лишь при появлении больных чумой и другими опасными инфекциями, или выявлении эпизоотий на территориях населенных пунктов, в зонах массового отдыха населения осуществляют дератизационные обработки в поселениях

синантропных и экзоантропных грызунов (сооружения, пустыри, парки, лесополосы, заросли кустарниковой и бурьянистой растительности и др.), а также дезинсекцию (дезакаризацию) мест концентрации и выплода кровососущих насекомых и клещей на эпидемиологически значимых территориях и объектах.

При проведении истребительных мероприятий необходимо предварительное экологическое обоснование планируемых работ. В этой связи следует учитывать такие характеристики популяций грызунов и членистоногих, как видовой состав сообществ, популяционная и половозрастная структура группировок (микропопуляций), сезонные особенности фенологии, пространственного размещения, активности и подвижности животных, их генеративное и физиологическое состояние [15, 25, 26, 39].

Современную концепцию контроля численности носителей и переносчиков чумы в ее природных очагах можно представить в виде следующих положений:

1. При обеспечении эпидемического благополучия населения в очагах чумы и сочетанных с ней инфекций основное внимание уделяют мероприятиям экстренной профилактики заболеваний зооантропонозами: дезинсекцию и дератизацию проводят при выявлении заболеваний среди людей, обнаружении эпизоотий в населенных пунктах или в непосредственной близости от них.

2. Все экстренные мероприятия с применением механических и химических средств дезинсекции и дератизации проводят только на небольших по площади участках против целевых видов носителей и переносчиков инфекций в местах высокого риска заражения человека.

3. Основным разделом истребительных работ в очагах чумы является дезинсекция. Дератизация проводится параллельно с ней или после дезинсекции (во избежание нападения голодных инфицированных блох на человека). Основной объем дезинсекции и дератизации осуществляют в населенных пунктах, их окрестностях и местах массового сосредоточения населения.

4. При заблаговременной профилактике основное внимание уделяют санитарно-гигиеническим и санитарно-техническим мероприятиям, направленным на разрушение среды обитания грызунов и кровососущих членистоногих в населенных пунктах и местах массового пребывания людей. Дезинсекция и дератизация в целях заблаговременной профилактики заболеваний осуществляется при обнаружении высокой численности синантропных грызунов, а также блох и клещей, активно нападающих на человека.

5. В целях сохранения биологического разнообразия животных и во избежание загрязнения природной среды токсическими веществами в очагах чумы и сочетанных с ней инфекций ограничивают применение высокотоксичных и стабильных химических средств борьбы с грызунами и кровососущими членистоногими, не проводят обработки против редких и узкоареальных видов животных.

Таким образом, можно заключить, что контроль численности носителей и переносчиков зоонозов невозможен без проведения регулярных наблюдений за изменениями фауны и структуры ареалов возбудителей, носителей и переносчиков чумы и других природно-очаговых инфекционных болезней. Изучение популяционной экологии мелких млекопитающих и их эктопаразитов, динамики численности и распределения по территории, изменения эпизоотологического статуса животных в разные периоды (циклы) активности конкретных природных очагов чумы во многом определяет наши возможности по управлению численностью видов, имеющих эпидемиологическое значение. В этой связи оптимизация и развитие неспецифической профилактики заболеваний зооантропонозами безусловно предусматривает осуществление комплекса санитарных, технических, гигиенических и истребительных мероприятий, направленных, в первую очередь, на разрушение среды обитания возбудителей, носителей и переносчиков болезней. При этом речь, естественно, идет только о территориях высокого риска заражения людей особо опасными инфекционными болезнями. Основным объемом дезинсекционных и дератизационных обработок осуществляют в строениях и сооружениях населенных пунктов, зонах отдыха и промышленных, на объектах транспортной инфраструктуры. Дезинсекцию и дератизацию в природных биотопах проводят только в окрестностях населенных пунктов и зонах рекреации.

Одним из основных элементов эпидемиологического надзора в природных очагах чумы остается наблюдение за здоровьем населения, характером его хозяйственной деятельности, социальными и бытовыми условиями жизни, миграционными и демографическими процессами. Противочумные учреждения, по-прежнему, будут уделять внимание информационно-разъяснительной работе с населением, в первую очередь с контингентом, проживающим на участках стойкой энзоотии чумы. Крайне важна регулярная подготовка работников медицинской и ветеринарной сетей по особо опасным инфекциям. Необходимы и комплексные санитарно-технические профилактические мероприятия с целью предотвращения возможности проникновения инфекционного агента в постоянные и временные населенные пункты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абатуров Б.Д. Экологические последствия пастбы копытных млекопитающих для экосистем полупустыни. В кн.: Экологические процессы в аридных биогеоценозах. М.: РАСХН; 2001. С. 57–83.
2. Адъясурэн З., Цэрэнноров Д., Отгонбаатар Д., Балахонов С.В., Иннокентьева Т.И., Агиймаа Ш., Косилко С.А. Клинико-эпидемиологические особенности чумы в Монголии. Пробл. особо опасных инф. 2010; 1(103):30–3.
3. Айкимбаев А.М., Сагиев З.А. Эпидемический потенциал природных очагов чумы в Казахстане. Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане. 2004; 10:34–7.
4. Балахонов С.В., Вержуцкий Д.Б., Иннокентьева Т.И. эпидемиологическая оценка современного состояния природных очагов в Сибири. Эпидемиол. и вакцинопрофилактика. 2010; 2:34–7.
5. Белик В.П. Воздействие фосфида цинка на птиц в районах дератизационных работ в XX столетии. Пест-менеджмент. 2009; 4:16–24.
6. Бурделов Л.А., Мека-Меченко В.Г., Бурделов Д.Л.

Некоторые общие проблемы борьбы с грызунами и пути их решения на современном этапе. 18.05.2011. http://dezirs.ru/informations/article.php?ELEMENT_ID=347 (дата обращения 18.05.2011).

7. Голубинский Е.П., Жовтый И.Ф., Лемешева Л.Б. О чуме в Сибири. Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та; 1987. 243 с.
8. Гриздобовский Г.М., Брюханова Г.Д. Чума как возвращающаяся инфекция. Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане. 2004; 10:38–43.
9. Дятлов А.И. Перспектива борьбы с чумой в ее природных очагах. Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол. 2001; 6:64–6.
10. Жовтый И.Ф. Дезинсекция нор грызунов – ведущий метод профилактики в сибирских природных очагах чумы. В кн.: Профилактика чумы в природных очагах. Саратов; 1973. С. 197–9.
11. Жовтый И.Ф., Кириллов В.В. Экологические особенности блох и место дезинсекции в профилактике чумы и оздоровлении сибирских очагов. Пробл. особо опасных инф. 1970; 2:60–3.
12. Злотокрылин А.Н. Климатическое опустынивание. М.: Наука; 2003. 246 с.
13. Карпузи К.С. Теоретические предпосылки и перспективный план мероприятий, направленных на ликвидацию энзоотии чумы в Волго-Уральском междуречье. В кн.: Природная очаговость и эпидемиология особо опасных инфекционных заболеваний. Саратов; 1960. С. 263–75.
14. Карякин И.В. Катастрофические последствия дератизации с использованием бромациолона в Монголии в 2001–2003 гг. для российских популяций птиц. Пест-менеджмент. 2010; 1:20–6.
15. Кузнецов А.А., Матросов А.Н. Влияние профилактических мероприятий на возрастную и половую структуру популяции малых песчанок в Волго-Уральских песках. В кн.: Вопросы паразитологии и неспецифической профилактики зоонозов. Саратов; 1988. С. 32–9.
16. Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Осипов В.П., Князева Т.В., Поршаков А.М., Попов В.Н. Принципы организации эпизоотологического мониторинга сочетанных природных очагов чумы и других опасных инфекционных болезней в регионе Нижнего Поволжья. Пробл. особо опасных инф. 2009; 4(102):17–20.
17. Кучерук В.В. Антропогенная трансформация окружающей среды и природно-очаговые болезни. Вестн. АМН СССР. 1980; 10:24–32.
18. Марамович А.С., Косилко С.А., Иннокентьева Т.И., Воронова Г.А., Базанова Л.П., Никитин А.Я., Окунев Л.П. Чума в Китае. Опасность заноса в регионы Сибири и Дальнего Востока. Журн. эпидемиол. микробиол. и иммунобиол. 2008; 1:95–9.
19. Матросов А.Н., Карнаузов И.Г., Князева Т.В., Шиллов М.М., Кузнецов А.Н., Слудский А.А. и др. Дезинфекция, дератизация и дератизация в природных очагах чумы на территории Российской Федерации. Пробл. особо опасных инф. 2004; 1(87):14–21.
20. Матросов А.Н., Кузнецов А.А., Попов Н.В., Удовиков А.И., Григорьева Г.В. Эпизоотическая активность и эпизоотологическое районирование природных очагов чумы Российской Федерации. Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане. 2001; 3:178–81.
21. Некителов Н.В. Перспективы дальнейшего оздоровления Забайкальского очага чумы. Докл. Иркут. противочум. ин-та. 1963; 6:21–8.
22. Немченко Л.С. Воздействие профилактических мероприятий на ядра популяции длиннохвостого суслика в Тувинском природном очаге чумы. Журн. инф. патол. 2009; 16(3):156–7.
23. Немченко Л.С., Вершинин Е.А., Кардаш А.И., Осипов В.Н. Современные особенности условий обитания носителей чумы в Забайкальском природном очаге. Журн. инф. патол. 2009; 16(3):157–8.
24. Никитин А.Я. Оптимизация приемов профилактики трансмиссивных зоонозов низкоперсистентными пестицидами. Дез. дело. 2008; 2:35–7.
25. Никитин А.Я., Очиров Ю.Д. Пути оптимизации полевой дезинсекции в Сибирских очагах чумы на современном этапе. Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане. 2000; 2:165–7.
26. Никитин А.Я., Очиров Ю.Д., Вержуцкий Д.Б., Корзун В.М., Чумаков А.В., Ткаченко В.А. Экстренная дезинсекция в сибирских горных очагах чумы пестицидами с малым временем остаточного действия. Пробл. особо опасных инф. 2005; 1(89):29–33.
27. Очиров Ю.Д., Никитин А.Я., Васильев Г.И., Кураев А.М., Осыкина Л.А. Качественные и количественные изменения в популяциях переносчиков чумы и нецелевых объектов под влиянием химических обработок. Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане. 2000; 2:173–5.
28. Попов Н.В., Сурвилло А.В., Князева Т.В., Варшавский Б.С., Подсвилов А.В., Яковлев С.А. Биоценологические последствия антропогенной трансформации ландшафтов Черных земель. В кн.: Биота и природная среда Калмыкии. М., Элиста; 1995. С. 211–21.
29. Попов Н.В., Удовиков А.И., Кузнецов А.А., Матросов

А.Н., Яковлев С.А., Гаджирезаева А.Р. Современные аспекты прогнозирования эпизоотической активности природных очагов чумы России и стран СНГ. Пробл. особо опасных инф. 2006; 1(91):24–7.

30. Протопопан М.Г. Полевая дезинсекция в природных очагах чумы СССР. В кн.: Эпидемиология, эпизоотология и профилактика особо опасных инфекций. Саратов; 1986. С. 55–68.

31. Руденчик Ю.В., Солдаткин И.С. История борьбы с природной очаговостью чумы. Отечественные уроки. В кн.: Занимательные очерки о деятельности и деятелях противочумной системы России и Советского Союза. М.: Информатика; 1995. С. 60–86.

32. Солдаткин И.С., Хрулев М.В., Руденчик Ю.В. К вопросу об оптимизации мероприятий по снижению численности носителей и переносчиков с профилактическими целями в Среднеазиатском равнинном очаге чумы. В кн.: Вопросы природной очаговости зоонозов. Саратов; 1983. С. 74–80.

33. Сурвилло А.В., Корнеев Г.А. Проблемы неспецифической профилактики в природных очагах чумы на современном этапе. Дез. дело. 1993. 2–3:29–32.

34. Топорков В.П., Величко Л.Н., Шиянова А.Е., Кедрова О.В. Динамика заболеваемости чумой в мире. Пробл. особо опасных инф. 2008; 3(97):22–5.

35. Федорова В.А., Панькина Л.Н., Голова А.Б. Перспективы создания эффективных безопасных противочумных вакцин нового поколения. В кн.: Молекулярная медицина и биобезопасность. М.; 2009. С. 232–4.

36. Шилова С.А. Популяционная организация млекопитающих в условиях антропогенного воздействия. Усп. совр. биол. 1999; 119(5):487–503.

37. Шилова С.А. Биологическое разнообразие и контроль численности «проблемных» видов животных: компромиссы, противоречия, перспективы. РЭТ-инфо. 2005; 56:8–10.

38. Шилова С.А., Чабовский А.В., Исаев С.И., Неронов В.В. Динамика сообщества и популяций грызунов полупустынь Калмыкии в условиях снижения нагрузки на пастбища и увлажнения климата. Изв. АН. Сер. биол. 2000; 3:332–44.

39. Шипанов Н.А. Экологические основы управления численностью мелких млекопитающих. М.; 2001. 182 с.

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

1. Abaturov B.D. [Ecological implications for semi-desert ecosystems caused by the hoofed mammals grazing]. In: [Ecological Processes in Arid Biogeocoenosis]. M.: RAAS; 2001. P. 57–83.
2. Ad'yasuren Z., Tserennorov D., Otgonbaatar D., Balakhonov S.V., Innokentyeva T.I., Agiymaa Sh., Kosiklo S.A. [Clinical-epidemiological features of plague in Mongolia]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; 103:30–3.
3. Aikimbaev A.M., Sagiev Z.A. [Epidemiological potential of natural plague foci in Kazakhstan]. [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]. 2004; 10:34–7.
4. Balakhonov S.V., Verzhutsky D.B., Innokentyeva T.I. [Epidemiological evaluation of the baseline conditions in natural foci of Siberia]. Epidemiol. Vaksinoprofilakt. 2010; 2:34–7.
5. Belik V.P. [Effect of the phosphine on the birds, habitants of the areas under deratization in the XX century]. Pest-Management. 2009; 4:16–24.
6. Burdelov L.A., Meka-Mechenko V.G., Burdelov D.L. [A number of shared problems in view of deratization and ways of their solution in the modern period]. 05 Aug 2009 [cited 18 May 2011]. Available from: http://dezirs.ru/informations/article.php?ELEMENT_ID=347.
7. Golubinsky E.P., Zhovty I.F., Lemesheva L.B. [Regarding Plague in the Siberia Region]. Irkutsk: Irkutsk University; 1987. 243 p.
8. Grizhebovsky G.M., Bryukhanova G.D. [Plague as an emerging infectious disease]. [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]. 2004; 10:38–43.
9. Dyatlov A.I. [Prospective of plague control in its natural foci]. Zh. Mikrobiol. Immunobiol. 2001; 6:64–6.
10. Zhovty I.F. [Desinsection of rodent holes – basic methods of prophylaxis in the Siberian natural plague foci]. In: [Plague Control and Prophylaxis in Its Natural Foci]. Saratov; 1973. P. 197–9.
11. Zhovty I.F., Kirillov V.V. [Ecological peculiarities of fleas and the role of desinsection in plague control and prophylaxis as well as in Siberian foci sanitation]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 1970; 2:60–3.
12. Zlotokrylin A.N. [Climatic Desertification]. M.: Nauka; 2003. 246 p.
13. Karpuzidi K.S. [Theoretical foundations and prospective plan of control measures aimed at eradication of enzootic outbreaks of plague in the Volga-Uralian Interfluv]. In: [Natural Focality and Epidemiology of Particularly Dangerous Infectious Diseases]. Saratov; 1960. P. 263–75.
14. Karyakin I.V. [Disastrous deratization using bromadiolone preparation in the territory of Mongolia in 2001–2003 that affected Russian bird populations]. Pest-Management. 2010; 1:20–6.
15. Kuznetsov A.A., Matrosov A.N. [Influence of the preventive measures on gender and age structure of smaller sand gerbil populations in the territory of Volga-Uralian sand hills]. In: [Problems of Parasitology and Non-Specific Prophylaxis of Zoonoses]. Saratov; 1988. P. 32–9.
16. Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Osipov V.P., Knyazeva T.V., Porshakov A.M., Popov V.N. [Principles of management of the epizootological monitoring of combined natural foci of plague and other dangerous infectious diseases in the Lower-Volga Region]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2009; 102:17–20.
17. Kucheruk V.V. [Anthropogenic transformation of natural environment and natural foci infectious diseases]. Vestn. USSR AMS. 1980; 10:24–32.
18. Maramovich A.S., Kosiklo S.A., Innokentyeva T.I., Voronova G.A., Bazanova L.P., Nikitin A.Ya., Okunev L.P. [Plague in the territory of China. Risk of importing plague into Siberian and Far East Regions]. Zh. Epidemiol. Mikrobiol. Immunobiol. 2008; 1:95–9.

19. Matrosov A.N., Karnaukhov I.G., Knyazeva T.V., Shilov M.M., Kuznetsov A.N., Sludsky A.A. et al. [Disinfection, desinsection, and deratization in natural plague foci in the territory of the Russian Federation]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2004; 87:14–21.

20. Matrosov A.N., Kuznetsov A.N., Popov N.V., Udovikov A.I., Grigor'eva G.V. [Epizootic activity and epizootological zoning of natural plague foci in the territory of the Russian Federation]. [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]. 2001; 3:178–81.

21. Nekipelov N.V. [Prospects of further sanitation of Trans-Baikalian plague foci]. [Reports of the Irkutsk Anti-Plague Institute]. 1963; 6:21–8.

22. Nemchenko L.S. [Influence of the preventive measures on the population nucleus of long-tailed marmots in the Tuvian natural plague foci]. Zh. Infek. Patol. 2009; 16(3):156–7.

23. Nemchenko L.S., Verzhutsky D.B., Kardash A.I., Osipov V.N. [Peculiarities of the current habitat conditions of plague carriers in the Transbaikal natural foci]. Zh. Infek. Patol. 2009; 16(3):157–8.

24. Nikitin A.Ya. [Optimization of prophylaxis techniques applied for the control over vector-borne zoonotic diseases using low-persistence pesticide preparations]. Dets. Delo. 2008; 2:35–7.

25. Nikitin A.Ya., Ochirov Yu.D. [Ways of optimization of field desinsection practices in the Siberian plague foci in the modern period]. In: [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]. 2000; 2:165–7.

26. Nikitin A.Ya., Ochirov Yu.D., Verzhutsky D.B., Korzoon V.M., Chumakov A.V., Tkachenko V.A. [Urgent desinsection of the Siberian mountainous natural plague foci using pesticidal preparations with short-time residual effects]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2005; 1(89):29–33.

27. Ochirov Yu.D., Nikitin A.Ya., Vasil'ev G.I., Kuraev A.M., Os'kina L.A. [Qualitative and quantitative changes in populations of plague vectors and non-target objects under the influence of chemical treatment]. [Quarantine and Zoonotic Infections in Kazakhstan]. 2000; 2:173–5.

28. Popov N.V., Survillo A.V., Knyazeva T.V., Varshavsky B.S., Podsvirov A.V., Yakovlev S.A. [Biocoenotic impact of anthropogenic landscape transformation of "Black lands"]. In: [Biota and Natural Environment of Kalmykia]. M.; Elista. 1995. P. 211–21.

29. Popov N.V., Udovikov A.I., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Yakovlev S.A., Gadzhirzezaeva A.R., Bezsmertny V.E., Kutyrev V.V. [Contemporary aspects of predicting epizootic activity of plague natural foci in Russia and CIS countries]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2006; 91:24–7.

30. Protopyan M.G. [Field desinsection in natural plague foci of the USSR]. In: [Epidemiology, Epizootology and Prophylaxis of Particularly Dangerous Infectious Diseases]. Saratov; 1986. P. 55–68.

31. Rudenchik Yu.V., Soldatkin I.S. [Records related to control over plague natural focality. Lessons learned by the national researches]. In: [Feature Writings Concerning the Scientists and their Work for the Russian and Soviet Union Plague Control Service]. M.: Informatika; 1995. P. 60–86.

32. Soldatkin I.S., Khrulev M.V., Rudenchik Yu.V. [Regarding optimization of procedures aimed at reduction of numbers of plague carriers and vectors, used for prophylactic purposes in the Central Asian plain foci]. In: [Issues of Natural Focality as Related to Zoonotic Infectious Diseases]. Saratov; 1983. P. 74–80.

33. Survillo A.V., Korнеев Г.А. [Problems of non-specific prophylaxis in natural plague foci in the modern period]. Dets. Delo. 1993; 2–3:29–32.

34. Toporkov V.P., Velichko L.N., Shiyanova A.E., Kedrova O.V. [The tendency of plague morbidity dynamics in the world]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2008; 97:22–5.

35. Fedorova V.A., Pan'kina L.N., Golova A.B. [Prospective of construction of the effective and safe anti-plague vaccines of new generation]. In: [Molecular Medicine and Biological Safety]. M.; 2009. P. 232–4.

36. Shilova S.A. [Population organization of mammals under the conditions of anthropogenic intervention]. Usp. Sovr. Biol. 1999; 119(5):487–503.

37. Shilova S.A. [Biological diversity and control over the numbers of animal species that are of a particular concern: compromises, contradictions, and prospective studies]. RET-Info. 2005; 56:8–10.

38. Shilova S.A., Chabovsky A.V., Isaev S.I., Neronov V.V. [Dynamic processes within rodent conenoses and populations under the conditions of pasture load reduction and climate humidification in the semi desert areas of Kalmykia]. Izv. A.S. Ser. Biol. 2000. P. 332–44.

39. Shchipanov N.A. [Ecological Foundations of the Control over the Numbers of Small Mammals]. M.; 2001. 182 p.

Authors:

Matrosov A.N., Kuznetsov A.A., Knyazeva T.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Verzhutsky D.B., Nikitin A.Ya., Nemchenko L.S. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russia. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Grigor'ev M.P., Levchenko B.I., Bobenko O.A., Gazieva A.Yu. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Korotkov V.B. Center of Hygiene and Epidemiology in the Saratov Region. 69, Bolshaya Gornaya St., Saratov, 410031, Russia. E-mail: fguz@gigiena-saratov.ru

Об авторах:

Матросов А.Н., Кузнецов А.А., Князева Т.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Вержущий Д.Б., Никитин А.Я., Немченко Л.С. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и ДВ. 664047, Иркутск, ул. Трилессера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Григорьев М.П., Левченко Б.И., Бобенко О.А., Газиева А.Ю. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Коротков В.Б. Центр гигиены и эпидемиологии в Саратовской области. 410031, Саратов, ул. Большая Горная, 69. E-mail: fguz@gigiena-saratov.ru

Поступила 03.06.11.

А.И.Удовиков, Н.В.Попов, Л.В.Самойлова, С.И.Толоконникова

КЛИМАТ И ТРАНСФОРМАЦИЯ ЭКОСИСТЕМ НА ПРИМЕРЕ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЧУМЫ ЮГО-ВОСТОКА РОССИИ

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

Рассмотрено влияние современного потепления климата и некоторых других факторов на природные очаги чумы европейского юго-востока России. Проанализированы основные механизмы трансформации биоценотической структуры природно-очаговых комплексов. Показано, что вследствие дальнейшего потепления климата сохранится тенденция постепенной смены доминирующих видов носителей, в результате чего продолжится экспансия полигостальных природных очагов чумы полупустынного типа.

Ключевые слова: природный очаг чумы, потепление климата, антропогенное воздействие, носители чумы.

A.I.Udovikov, N.V.Popov, L.V.Samoilova, S.I.Tolokonnikova

Climate and Transformation of Ecosystems by the Example of Natural Plague Foci of South-East of Russia

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Shown was the influence of modern day warming and some other factors on natural plague foci of the European South-East of Russia. Analyzed were the basic mechanisms of transformation of biocenotic structure of natural foci complexes. It was shown that the tendency of gradual change of dominant carriers species would be preserved due to further warming of climate. As a result, the expansion of polyhostal natural foci of plague of semidesert type would be continued.

Key words: natural plague focus, climate warming, human intervention, plague carriers.

Природные очаги чумы представляют собой частный случай биогеоценотической структуры Земли. Биосфера, одна из основ этой структуры, обладает определенным гомеостазом: средняя приземная температура на протяжении почти 4 млрд лет составляет около 15 °С с амплитудой 5 °С.

В настоящее время скорость роста приповерхностной температуры не менее чем в 200 раз превышает те скорости, о которых известно по палеоклиматическим реконструкциям, что приводит к разбалансировке климатической системы, в результате чего биоценозы испытывают беспрецедентный антропогенный пресс, при этом наиболее существенным фактором является сокращение биоразнообразия. Именно оно определяет потенциал адаптации биоты в целом к изменяющимся условиям ее существования.

В последние десятилетия степные и полупустынные экосистемы претерпели существенные изменения, которые в определенной степени изменили сложившиеся представления о биоценотической структуре природных очагов чумы.

Материалы и методы

Использованы собственные материалы, полученные при проведении эколого-эпизоотологического обследования Прикаспийского песчаного, Прикаспийского Северо-Западного степного, Волго-Уральского степного очагов чумы в 1980–2006 гг., а также архивные материалы Астраханской, Элистинской и Дагестанской противочумных стан-

ций за период 1945–2010 гг., данные банка унифицированных документов РосНИПЧИ «Микроб» с 1977 по 1993 год. При определении численности мелких млекопитающих применялись методы, рекомендованные к использованию в противочумных учреждениях России [7].

Результаты и обсуждение

Природные очаги чумы представляют собой пример саморегулирующейся динамической экосистемы с определенным набором биотических и абиотических составляющих. За последнее столетие возникли беспрецедентные обстоятельства, ведущие к деструктуризации очаговых комплексов. Изменения климата, несомненно, могут влиять как на границы ареалов возбудителя (в частности чумы), его носителей, так и на общий характер размещения очагов внутри ареала. В конечном итоге, распространение возбудителя, как и любого другого биологического вида, зависит от наличия необходимых для него условий, которые складываются под влиянием типично зональных, интразональных и экстразональных явлений и их сочетаний [6]. Это определяет неравномерность и мозаичность природных очагов. При этом смена природно-очаговых комплексов скорее закономерность, чем исключение.

По некоторым данным, в прошлом на территории Средней и Юго-Восточной Европы существовал обширный природный очаг чумы [14]. Еще несколько десятков лет назад на территории современной Волгоградской, Ростовской, Саратовской областей

отмечались как эпизоотические, так, местами, и эпидемические проявления чумы. Современная северо-западная граница эпизоотий сдвинулась на несколько сотен километров к югу. Интересно, что северо-восточные, азиатские границы энзоотии чумы, по крайней мере, по факту новых обнаружений микроба расширяются. Несомненно, на современном этапе природные очаги чумы, как и прочие биосистемы, претерпевают значительные структурные изменения. Частично это объясняется прямым антропогенным воздействием.

Так, по состоянию на 2001 г. в Республике Калмыкия в различной степени сбой находилось 77 % пастбищ. Из них 55 % – на стадии сильного и очень сильного сбоя [2]. Пастбищная дигрессия привела к нивелировке комплексности растительного покрова. В результате активизировались эрозионные процессы, засоление, заболачивание и подтопление. С 1990 по 1995 год площадь подтопленных и заболоченных пастбищ увеличилась более чем в 5 раз [4]. Ширина фильтрационных потерь вдоль оросительных каналов достигает 2–3 км, в результате чего происходит накопление солей в верхних почвенных горизонтах, что вызывает галофитизацию растений. За последние 10 лет экосистемы Калмыкии претерпевают экспансию таких видов, как солянки древовидная (*Salsola arbuscula*) и мясистая (*S. crassa*), тамарикс многоветвистый (*Tamarix sp.*).

При прогнозе климатических условий Прикаспийского региона с помощью моделей общей циркуляции атмосферы [15] показано, что при удвоении концентрации углекислого газа в атмосфере ожидаемое увеличение сумм среднесуточных положительных температур воздуха может составить в среднем от 35 до 51 %, изменение сумм годовых осадков – от –3 до +21 %. Коэффициенты увлажнения (отношение годовой суммы осадков к испаряемости) уменьшаются на 10–26 % в зависимости от климатической модели и наблюдается некоторое продвижение зоны пустыни к северу за пределы южной границы степной зоны; гидротермические же коэффициенты (отношение суммы осадков за период со среднесуточными температурами воздуха выше 10 °С к сумме среднесуточных температур воздуха за то же время) меняются по разным сценариям от –12 до +10 %.

Аридизация экосистем отразится прежде всего на фитоценозах. При смене засушливых и сухих степных экосистем опустыненными следует ожидать уменьшения общей фитомассы примерно в 4 раза (до 9 т/га), общего проективного покрытия растительности в 2–2,5 раза (до 30–40 %), числа видов на 1 м² в 4 раза [11]. При движении с севера на юг для степей характерны следующие закономерности: травостой все более разреживается, уменьшается число двудольных растений, усиливается роль однолетников, уменьшается число широколистных злаков, сменяется ряд ковылей – от крупнодерновинных до мелкодерновинных, уменьшается видовое разнообра-

зие, увеличивается относительная масса подземных частей растений в сравнении с надземной, сезонная динамика растительного покрова становится все более аритмичной [8]. Кроме того, аридизация климата приводит к увеличению воздействия на экосистемы пирогенного фактора. Под воздействием огня происходит изменение конкурентной способности различных видов растений. Полукустарнички, почки которых расположены над почвой, повреждаются огнем сильнее, чем травянистые растения [13]. Изменение фитоценозов неизменно влечет за собой смену фаунистического комплекса.

Одна из наиболее значимых для степных экосистем группа – грызуны, среди которых, в свою очередь, ведущую роль в природной очаговости чумы играл малый суслик (*Spermophilus pygmaeus*). Однако в последнее время доминирующее значение постепенно приобретают мелкие песчанки (*Meriones meridianus*, *M. tamariscinus*) и мышевидные грызуны. При этом уровень плотности и динамика численности малого суслика после снижения интенсивности сельскохозяйственной деятельности определяются главным образом первичными природными факторами, то есть влиянием климатических условий.

На территории Нижнего Поволжья в период с 70-х годов по настоящее время отмечено превышение среднегодовой температуры над климатической нормой на 0,6 °С, с одновременным направленным увеличением годовых сумм осадков [10].

В Саратовской области, на северной границе ареала малого суслика, в 60–70-х годах двадцатого столетия в Заволжье наибольшая плотность поселений малого суслика отмечена на территории Перелюбского района (северо-восток Саратовской области), где среднее количество нор на 1 га достигало 350; максимальное – 728. Однако в 80–90-х годах прошлого столетия в условиях комплексного негативного влияния антропогенных и климатических факторов показатели фоновой численности зверьков значительно снизились [9]. В Александрово-Гайском районе в 2001 г. плотность этого вида достигала 21,2 особей на 1 га, при среднем значении 6,0. Рекогносцировочное обследование 2003–2004 гг. показало резкое падение численности до единичных особей.

На юге Волгоградской области, где в настоящее время земледелием занято до 80–90 % земель, площадь поселений малого суслика за период 1933–1956 гг. сократилась, по меньшей мере, в 10 раз [1]. Учетные данные 1993–1999 гг. показали среднюю плотность в 11–20 ос/га. Однако за счет гибели особей в результате засухи к весне 1999 г. площади с высокой плотностью поселений малого суслика сократились в сравнении с 1998 г. с 48,6 до 34,4 % [3].

Рекогносцировочные обследования этой территории и смежных районов Ростовской области в 80–90-х годах прошлого столетия показали, что уровень численности малого суслика к северу от Цимлянского водохранилища повсеместно характеризуется очень низкими показателями. Подобные же данные полу-

чены при изучении современного состояния зоны контакта ареалов малого и крапчатого сусликов на территории от Волги до Северского Донца [5].

По данным Элистинской ПЧС, в конце 80-х – начале 90-х годов прошлого столетия плотность малого суслика в различных ландшафтных регионах составляла в большинстве случаев около 10–15 ос/га. На территории Терско-Кумского междуречья в 1979 г. общая площадь сохранившихся поселений сусликов не превышала 1 млн га, из которых 92,3 % было заселено с плотностью менее 1 зверька на 1 га; 6,6 % – менее 5 ос/га и лишь 1,1 % – с плотностью 6–10 ос/га и более.

К 1984 г. площадь поселений сусликов сократилась здесь до 211 тыс. га, из которых 94,1 % было заселено сусликами с плотностью 0,01–0,5 ос/га. В последующий период популяции малого суслика продолжали оставаться в состоянии глубокой депрессии. Аналогичная ситуация отмечена и на смежной территории Калаусско-Кумского междуречья, что указывает на наличие тенденции расширения современной западной границы Прикаспийского песчаного очага. Существенно, что синхронное падение численности малого суслика в этот период имело место также в Ногайской степи Дагестана, на Черных землях в Калмыкии, в Волго-Уральском междуречье в среднем до 5 ос/га. Эта тенденция в настоящее время прослеживается в пределах всего ареала.

Причины этого явления, очевидно, многофакторные: изменение фитоценоза (меняются качественное и количественное состояние кормовых ресурсов, степень покрытия и высота травостоя становятся некомфортными для обитания); изменение эдафических факторов: структуры и химизма почв, колебания уровня грунтовых вод. Распашка земель в свое время, несомненно, отрицательно сказалась на численности малого суслика. Однако следует отметить, что значительная часть популяции этого вида всегда обитала в малоприспособленных для земледелия степях. Также нельзя считать решающим фактором в ограничении численности и непосредственное уничтожение малого суслика как носителя чумы. Несмотря на огромные масштабы дератизации популяции смогли сохранить потенциал для восстановления и стабилизации вида. Одной из причин снижения численности малого суслика может явиться подъем уровня грунтовых вод, как следствие – меньшая глубина залегания в спячку и вымерзание. Помимо того, это ведет к засолению почв, т.е. уменьшению биотопов, пригодных для рытья нор.

Далее, несомненно, непосредственное влияние климатических факторов и их флуктуаций на популяционную экологию любого вида. Из всего многообразия возможных схем такого воздействия нагляднее всего выглядят фенологические наблюдения. Так, на территории Республики Калмыкия наметилась тенденция более раннего пробуждения малого суслика: если 15–20 лет назад этот процесс начинался во 2–3 декадах апреля и даже в марте, то в последние годы

это происходит в 1–2 декадах февраля, а в 2000 г. – в 3 декаде января. Все это отрицательно сказывается на состоянии популяции этого вида. В целом, температурные отклонения от нормы в период 1995–2004 гг. на территории Калмыкии составили в январе от –0,2 до +5,2 °C; в феврале от +0,4 до +8,6 °C; в марте от +1,0 до +5,4 °C. Одним из механизмов развившейся глубокой депрессии численности зверьков явилась высокая смертность молодняка в результате часто повторявшихся сильных весенне-летних засух.

В итоге следует констатировать, что на фоне глобальных изменений климатических факторов происходит в первую очередь существенная трансформация структуры биоценозов (в том числе природно-очаговых), которая в силу своих беспрецедентных темпов может привести к дестабилизации экосистемы в целом. При этом нарушается целый ряд общебиологических законов. Это закон внутреннего динамического равновесия, при котором любое изменение среды неизбежно приводит к развитию природных цепных реакций, идущих в сторону нейтрализации произведенного изменения, или формированию новых природных систем, образование которых при значительных изменениях среды может принять необратимый характер [12]. При этом даже слабое воздействие или изменение одного из показателей может вызвать сильные отклонения в других и во всей системе. При нестабильном состоянии любой популяции, снижающей численность, достаточно изъять 10 % особей для ее уничтожения (правило десяти процентов). А чтобы вывести природную систему из равновесного (квазистационарного) состояния, достаточно изменить ее энергетику в пределах 1 %. Глобальная же природная, или природно-антропогенная катастрофа (в том числе и резкое изменение климата) приводит к существенным эволюционным перестройкам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агафонов А.В. Сокращение поселений и численности малого суслика на юге Волгоградской области под влиянием развития земледелия. Пробл. особо опасных инф. 1969; 3(7):191–3.
2. Бакинова Т.И., Борликов Г.М., Джапова Р.Р. и др. Кормовые ресурсы сенокосов и пастбищ Калмыкии. Ростов н/Д; 2002. 184 с.
3. Денисов П.С., Тихонов Н.Г., Ларионов Г.М. и др. Современное состояние численности малого суслика на энзоотичной по чуме территории заводских районов Волгоградской области в связи с антропогенным преобразованием ландшафта. В кн.: Природно-очаговые инфекции в Нижнем Поволжье. Волгоград; 2000. С. 63–70.
4. Джапова Р.Р. Современное состояние пастбищных экосистем республики Калмыкия. В кн.: Биоресурсы и биоразнообразие экосистем Поволжья: прошлое, настоящее, будущее. Саратов; 2005. С. 17–9.
5. Ермаков О.А., Титов С.В., Быстракова Н.В. Сведения о современном состоянии зоны контакта ареалов малого (*Spermophilus pygmaeus* Pallas, 1778) и крапчатого сусликов (*S. suslicus* Guldenstaedt, 1770) в Поволжье. В кн.: Биоресурсы и биоразнообразие экосистем Поволжья: прошлое, настоящее, будущее. Саратов; 2005. С. 153–4.
6. Коренберг Э.И. Основы современных представлений о природной очаговости болезней. РЭТ-инфо. 2000; 1:18–20.
7. Методические указания по отлову, учету и прогнозу численности мелких млекопитающих и птиц в природных очагах инфекций. М.; 2002. 71 с.
8. Мордкович В.Г. Степные экосистемы. Новосибирск: Наука; 1982. 260 с.

9. Опарин М.Л., Опарина О.С. Эколого-историческая характеристика степей Волго-Уральского междуречья. В кн.: Биоресурсы и биоразнообразие экосистем Поволжья: прошлое, настоящее, будущее. Саратов; 2005. С. 34–8.
10. Опарин М.Л., Опарина О.С. Изменение ареалов сусликов (*Citellus pygmaeus* Pall., *C. major* Pall., *C. fulvus* Licht.) в Саратовском Заволжье на протяжении двадцатого столетия. В кн.: Вопросы степеведения. Оренбург; 2000. С. 137–42.
11. Работнов Т.А. Экспериментальная фитоценология. М.: Наука; 1998. 240 с.
12. Реймерс Н.Ф. Природопользование. М.: Мысль; 1990. 637 с.
13. Сажин А.Н. Природно-климатический потенциал Волгоградской области. Научное исследование природно-климатических ресурсов области за 100-летний период. Волгоград; 1993. 28 с.
14. Супотницкий М.В., Супотницкая Н.С. Очерки истории чумы. М.: Вузовская книга; 2006. 694 с.
15. Шумова Н.А. Оценка воздействия возможных изменений климата на динамику гидротермических условий Прикаспийского региона. В кн.: Биоресурсы и биоразнообразие экосистем Поволжья: прошлое, настоящее, будущее. Саратов; 2005. С. 72–5.

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

1. Agaphonov A.V. [Decrease in the number and settlements of little souslik under the influence of agriculture development at the South of Volgograd Region]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 1969; 3(7):191–3.
2. Bakinova T.I., Borlikov G.M., Dzhapova R.R. et al. [Food Resources of Kalmykia's Hay Lands and Pastures]. Rostov-on-Don; 2002. 184 p.
3. Denisov P.S., Tikhonov N.G., Larionov G.M. et al. [Modern state of a number of little souslik at enzootic plague territory in Volgograd regions (Trans-Volga areas) due to anthropogenic change of landscape]. In: [Natural Focal Infections in the Lower Volga Region]. Volgograd; 2000. P. 63–70.
4. Dzhapova R.R. [The modern state of pasturable ecosystems in the Republic of Kalmykia]. In: [Bioresources and Biodiversity. Ecosystem of the Volga Region. Past, Present and Future]. Saratov; 2005. P. 17–9.
5. Ermakov O.A., Titov S.V., Bystrakova N.V. [Information about the current situation of contact areas of little souslik (*Spermophilus pygmaeus* Pallas, 1778) and spotted souslik (*S. suslicus* Guldenstaedt, 1770) in Povolzh'e]. In:

- [Bioresources and Biodiversity. Ecosystem of the Volga Region. Past, Present and Future]. Saratov; 2005. P. 153–4.
6. Korenberg E.I. [Population principles in research into natural focal-ity of zoonoses]. RAT-Info. 2000; 1:18–20.
7. [Methodic instructions for catching, counting and prognosis of a number of small mammals and birds in natural foci of infections]. M.; 2002. 71 p.
8. Mordkovich V.G. [Desert Ecosystems]. Novosibirsk: Nauka; 1982. 260 p.
9. Oparin M.L., Oparina O.S. [Ecological and historical characteristics of deserts in Volgo-Ural interstream area]. In: [Bioresources and Biodiversity. Ecosystem of the Volga Region. Past, Present and Future]. Saratov; 2005. P. 34–8.
10. Oparin M.L., Oparina O.S. [Area changes of sousliks (*Citellus pygmaeus* Pall., *C. major* Pall., *C. fulvus* Licht.) in Zavolzh'e, region of Saratov, throughout the 20th century]. In: [Problems of Steppe Research]. Orenburg; 2000. P. 137–42.
11. Rabotnov T.A. [Experimental Phytocenology]. M: Nauka; 1998. 240 p.
12. Reimers N.F. [Management of Natural Resources]. M.: Mysl'; 1990. 637 p.
13. Sazhin A.N. [Natural and Climatic Potential of Volgograd Region. Research Investigation of Natural and Climatic Resources of the Region for the Period of 100 Years]. Volgograd; 1993. 28 p.
14. Supotnitsky M.V., Supotnitskaya N.S. [Outline of Plague History]. M.; 2006. 694 p.
15. Shumova N.A. [Assessment of impact of possible climate changes to dynamics of hydrothermal conditions in the Caspian region]. In: [Bioresources and Biodiversity. Ecosystem of the Volga Region. Past, Present and Future]. Saratov; 2005. P. 72–5.

Authors:

Удовиков А.И., Попов Н.В., Самойлова Л.В., Толоконникова С.И. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Удовиков А.И., Попов Н.В., Самойлова Л.В., Толоконникова С.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 24.02.11.

УДК: 616.981.452: 575

Г.А.Ерошенко, Е.И.Кошель, Г.Н.Одинок, Н.Ю.Шавина, Я.М.Краснов, Н.П.Гусева, В.В.Кутырев

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОВ *phoP/phoQ* И *rovA* – ГЛОБАЛЬНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

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

Проведено сравнение нуклеотидных последовательностей генов – глобальных регуляторов транскрипции *phoP/phoQ* и *rovA* у природных штаммов *Yersinia pestis* разных подвидов. Выявлена полная идентичность у них последовательности секвенированного фрагмента *phoQ* и высокий консерватизм гена *rovA*. В гене *phoP* у всех штаммов возбудителя чумы основного подвида присутствует миссенс-мутация – замена единичного нуклеотида G→A в позиции 643 от начала гена, которая вызывает смену аминокислотного остатка Gly → Ser в позиции 215 а.о. полипептидной цепи белка PhoP и, возможно, является причиной изменения транскрипционной активности PhoP у штаммов *Y. pestis* основного подвида.

Ключевые слова: возбудитель чумы, регуляторные гены, вариативность нуклеотидных последовательностей.

G.A.Eroshenko, E.I.Koshel', G.N.Odinokov, N.Yu.Shavina, Ya.M.Krasnov, N.P.Guseva, V.V.Kutyrev

Variability of *phoP/phoQ* and *rovA* Genes Sequences – Global Regulators of the Plague Agent Life Span

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Compared are the gene sequences of the global *phoP/phoQ* and *rovA* transcription regulators in original *Yersinia pestis* strains of different subtypes. Detected is overall identity of the sequenced *phoQ* fragment and high conservatism of the *rovA* gene. All the plague agent strains belonging to the main subspecies have a missense mutation in *phoP* gene. It is a substitution of a single nucleotide G→A in the position 643 from the beginning of the gene, which causes amino-acid residue shift Gly→Ser in the position 215 in polypeptide chain of the PhoP protein, and, is a possible cause of alteration of the PhoP transcription activity in *Yersinia pestis* strains belonging to the main subspecies.

Key words: plague agent, regulatory genes, variability of the nucleotide sequences.

Жизненный цикл *Yersinia pestis* – возбудителя особо опасной природно-очаговой инфекции представляет собой последовательную смену фаз существования, включающих пребывание в организме хозяина – грызуна (или других теплокровных животных) и вне его – в переносчике блохе или во внешней среде. Возбудитель чумы имеет сложную систему генетической регуляции дифференциальной экспрессии систем жизнеобеспечения на разных стадиях своего жизненного цикла. Важное место в этой системе занимают глобальные регуляторные гены, такие как *phoP/phoQ* и *rovA*, осуществляющие контроль транскрипции значительного числа генов патогенности и жизнеобеспечения в соответствии с сигналами, поступающими из внешней среды [5, 7, 8, 9, 11, 13].

Для эффективной трансмиссии *Y. pestis* переносчиком-блохой необходимо формирование в преджелудке насекомого массивной биопленки – «чумного» блока [2, 4]. Недавно было показано, что для образования биопленки в пищеварительном тракте блохи обязательно наличие двухкомпонентной сенсорной системы PhoP/PhoQ [12]. У мутантного штамма $\Delta phoP$ – производного *Y. pestis* KIM6+ в преджелудке блохи значительно снижалась экспрессия 133 генов и существенно повышалась экспрессия других 62 генов. Это

означает, что ген *phoP* необходим для повышения выживаемости *Y. pestis* в пищеварительном тракте блох и для длительного сохранения при хронической инфекции этого переносчика чумы [12]. Наличие гена *phoP* также обязательно для развития инфекционного процесса в теплокровном хозяине, поскольку транскрипционный регулятор PhoP необходим для выживания в макрофагах и, следовательно, для проявления вирулентности возбудителем чумы [7, 9].

Все патогенные виды иерсиний содержат также транскрипционный регулятор *RovA*, который у энтеропатогенных иерсиний контролирует экспрессию фактора инвазии – инвазина-адгезина *Inv*, обеспечивающего транслокацию бактерий через эпителий кишечника [5]. У возбудителя чумы этот инвазин инактивирован, однако *RovA* все же участвует в проявлении вирулентности *Y. pestis*, поскольку установлено, что мутант $\Delta rovA$ в 80 раз снижал свою вирулентность (LD_{50}) и терял способность к распространению/колонизации селезенки и легких после заражения. Показано также, что *RovA* участвует в регуляции таких генов, как *psaEFABC*, и тем самым, вносит вклад в вирулентность возбудителя [5].

Штаммы возбудителя чумы существенно отличаются друг от друга по вирулентности и эпидемической значимости. Штаммы *Y. pestis*, относящиеся

к основному подвиду, как правило, высоковирулентны и имеют высокий эпидемический потенциал, в то время как штаммы неосновных – кавказского, алтайского, гиссарского и улегейского подвидов имеют избирательную вирулентность и низкий эпидемический потенциал. По сравнению с основным подвидом штаммы неосновных подвидов хуже колонизируют блох и с меньшей эффективностью образуют биопленку на кутикуле нематод [1, 6]. Они приспособлены к существованию в определенных ландшафтно-географических условиях, в то время как штаммы основного подвида распространены по всему миру. Причины различий в патогенности и в особенностях экологии у разных подвидов возбудителя чумы остаются до сих пор не выясненными. Возможно, они связаны с наличием различий в регуляции экспрессии систем жизнеобеспечения и патогенности у разных подвидов *Y. pestis*.

В этой работе нами впервые проведено сравнение нуклеотидных последовательностей генов *phoP/phoQ* и *rovA* у природных штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов для выявления возможных различий между ними в

структурно-функциональной организации этих регуляторных генов.

Материалы и методы

В работе использовано 22 природных штамма *Y. pestis*, полученных из Государственной коллекции патогенных бактерий (таблица). Штаммы культивировали на 1,5 % агаре и бульоне LB (pH 7,2) при 28 °C в течение 18–24 ч. Выделение ДНК штаммов проводили общепринятым способом [3]. ПЦР выполняли в стандартных условиях при следующем температурном режиме: 1 цикл – 94 °C в течение 5 мин, 30 циклов – 94 °C 30 с, 55 °C 30 с, 72 °C 1 мин и завершающий цикл – 72 °C в течение 5 мин. Продукты, полученные в ПЦР, анализировали методом электрофореза в 1 % агарозном геле.

Аmplифицированные фрагменты гена *phoP/phoQ* и *rovA* у штаммов *Y. pestis* секвенировали на генетическом анализаторе модели «CEQ 8000» (Beckman Coulter) по методу F.Sanger [10]. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов проводили с использованием ал-

Вариабельность нуклеотидных последовательностей генов *phoP/phoQ* и *rovA* у штаммов *Y. pestis* разных подвидов

Штамм, природный очаг	ГЕНЫ		
	<i>phoP</i> (G → A, 643*) 346**	<i>phoQ</i> (G → A, 214) 729	<i>rovA</i> (A → C, 65) 539
<u>Основной подвид:</u>			
CO92 (NCBI GenBank)	+	-	-
M956 Волго-Уральский песчаный	+	-	-
A-1822 Кызылкумский пустынный	+	-	-
A-1824 Кызылкумский пустынный	+	-	+C после 351
807 Кобыстанский равнинно-предгорный	+	-	-
A-1793 Зауральский степной	+	-	-
И-1270 Забайкальский степной	+	-	-
И-1996 Забайкальский степной	+	-	-
И-3244 Боян-Улегейский аймак, МНР	+	-	-
177 Прикаспийский песчаный	+	-	-
C-471 Центральнo-Кавказский высокогорный	+	-	-
212 Африка	+	-	-
<u>Кавказский</u>			
pestodies F (NCBI GenBank)	-	+	-
3544 Арм Ленинанканский горный	-	-	-
1146 Зангезуро-Карабахский горный	-	-	-
<u>Алтайский</u>			
И-2359 Алтайский горный	-	-	-
И-2998 Алтайский горный	-	-	-
И-3086 Баян-Хонгорский аймак, МНР	-	-	T → A в позиции 200
<u>Улегейский</u>			
И-3068 Убур-Хангай, МНР	-	-	A → G в позиции 203
И-3071 Южно-Гобийский аймак, МНР	-	-	T → A в позиции 204
И-3130 Южно-Гобийский, МНР	-	-	-
<u>Гиссарский</u>			
A-1633 Гиссарский высокогорный	-	-	-
A-1728 Гиссарский высокогорный	-	-	-
A-1724 Гиссарский высокогорный	-	-	-

*Положение мутации. **Размер секвенированного фрагмента гена.

горитма BLAST (NCBI) и программного обеспечения MEGA 5.0.

Результаты и обсуждение

На первом этапе нами был проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов *phoP/phoQ* и *rovA* у штаммов *Y. pestis* CO92 (orientalis), KIM (medievalis), Antiqua (antiqua), Nepal516 (antiqua), Angola, 91001 (microtus), Pestoides F (кавказский подвид), Z176003, D106004, D182038, представленных в базе данных NCBI GenBank. В результате было установлено, что ген *phoQ*, имеющий размер 1455 пар нуклеотидов (п.н.) и кодирующий сенсорный белок PhoQ, имеет идентичное строение у штаммов CO92, KIM, Antiqua, Nepal516, Angola, 91001, Z176003, D106004 возбудителя чумы. В отличие от них у штамма Pestoides F в 214 позиции от начала гена *phoQ* присутствует миссенс-мутация G → A, приводящая к смене кодона GTT → ATT и кодируемой аминокислоты Val → Ile в позиции 72 аминокислотного остатка (а.о.) белка PhoQ. Только у одного штамма – D182038, относящегося к основному подвиду, присутствует миссенс-мутация T → G в 662 позиции от начала гена *phoQ*, вызывающая смену кодона CTG → CGG и кодируемой им аминокислоты Leu → Arg в позиции 221 а.о. Кроме того, у штамма D182038 в гене *phoQ* содержится еще одна мутация – делеция единичного нуклеотида (ΔC) в 719 позиции, приводящая к сдвигу рамки считывания и терминации трансляции белка PhoQ после 247 а.о. Однако данная мутация может не вызвать потери функции сенсорного белка PhoQ, поскольку она не затрагивает структуру его активного центра.

В гене *phoP* (размер гена 672 п.н.) у всех штаммов *Y. pestis* основного подвида (CO92, KIM, Antiqua, Nepal516, Z176003, D106004, D182038) наблюдалось наличие миссенс-мутации в 643 позиции от начала гена – замены единичного нуклеотида G → A относительно штаммов Angola, 91001, Pestoides F, которая приводит к смене аминокислотного остатка Gly → Ser в позиции 215 а.о. полипептидной цепи, кодируемой этим геном. Выявленная мутация в гене *phoP*, по-видимому, может быть связана с различной патогенностью или разной выживаемостью в блохах, поскольку присутствует у всех штаммов основного подвида и отсутствует у штаммов неосновных подвидов.

Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности еще одного глобального регулятора – гена *rovA* (размер гена 432 п.н.) – выявил идентичность его структуры у всех штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* за исключением штамма Antiqua, у которого в 65 позиции этого гена обнаружена миссенс-мутация A → C, приводящая к смене триплета CAT → CCT и кодируемой аминокислоты His → Pro в позиции 22 а.о. полипептидной цепи белка – регулятора транскрипции RovA.

Для выявления изменчивости генов *phoP*, *phoQ* и *rovA* у природных штаммов возбудителя чумы основ-

ного и неосновных подвидов нами с использованием программы Primer Express были рассчитаны праймеры на вариабельные участки этих генов, которые имели следующий состав:

phoP-S	TTATCCGCAACGCAGGGGAAAGT
phoP-As	ATGGGCTCTGAAGGTGCTTT
phoQ-S	CGGTGGTAGGTTATATCG
phoQ-As	TAAGGCTGTGAGTGAGGT
rovA-S	ATAGACTGGACTCTGGGA
rov-As	GTA CTGTGGGGCTTGTTT

Размеры амплифицированных с помощью этих праймеров фрагментов ДНК составляли для *phoQ* – 729 п.н., *phoP* – 346 п.н., *rovA* – 539 п.н. Полученные с применением рассчитанных праймеров ПЦР фрагменты природных штаммов *Y. pestis* были секвенированы и определены нуклеотидные последовательности вариабельных фрагментов генов *phoP*, *phoQ* и всего гена *rovA*. Всего изучено 22 природных штамма *Y. pestis*, 11 из которых принадлежали к основному подвиду и 11 (по три штамма алтайского, гиссарского и улегейского подвидов и два штамма кавказского подвида) – к неосновным подвидам (таблица).

Сравнение нуклеотидных последовательностей фрагментов генов *phoP* у штаммов *Y. pestis* выявило наличие вариабельного локуса в позиции 643 от начала гена. У всех 11 штаммов неосновных подвидов в этой позиции присутствовал нуклеотид G. У штаммов предшественника возбудителя чумы – псевдотуберкулезного микроба *Y. pseudotuberculosis* PB1+, YPIII, IP 32953, IP 31758, представленных в базе NCBI GenBank, в этой позиции также содержался нуклеотид G. В отличие от них все 11 секвенированных нами штаммов *Y. pestis* основного подвида содержали миссенс-мутацию в 643 позиции от начала гена – замену единичного нуклеотида G → A, которая приводит к замене аминокислотного остатка (Gly → Ser) в позиции 215 регуляторного белка PhoP. Регуляторный белок PhoP состоит из 223 а.о. и включает согласно базе данных Pfam (<http://pfam.janelia.org/>) два домена. Первый из них – N-концевой регуляторный домен (3–112 а.о.) и второй C-концевой домен (146–220 а.о.), обладающий ДНК-связывающей активностью с НТН (от англ. helix-turn-helix) мотивом. Выявленная в штаммах *Y. pestis* основного подвида мутация приводит к замене аминокислоты в положении 215 а.о. C-концевого ДНК-связывающего домена, что, возможно, вызывает изменение активности белка PhoP у штаммов *Y. pestis* основного подвида по сравнению со штаммами неосновных подвидов.

Сравнение нуклеотидных последовательностей другого гена – *phoQ* этой двухкомпонентной сенсорной системы PhoP/PhoQ выявило полную идентичность секвенированного фрагмента гена (729 п.н.) у всех 22 изученных штаммов основного и неосновных подвидов, в том числе и у двух штаммов кавказского подвида (таблица). Ранее у штамма кавказского подвида *Y. pestis* pestoides F, представленного в базе данных NCBI GenBank, нами выявлено наличие замены единичного нуклеотида G → A в позиции 214 от нача-

ла гена, однако ее отсутствие у двух изученных нами природных штаммов этого подвида означает, что выявленная у *pestoides* F мутация является либо индивидуальной для этого штамма, либо она характерна для определенной группы штаммов этого подвида.

В гене *rovA* у исследованных штаммов *Y. pestis* установлено наличие индивидуальных замен, встречающихся только у отдельных штаммов. У штамма алтайского подвида *Y. pestis* И-3086 присутствовала замена единичного нуклеотида Т → А в позиции 200, у штаммов гиссарского подвида И-3068 замена А → Г в позиции 203 и у И-3071 – Т → А в позиции 204. Все три штамма выделены на территории Монголии. У других штаммов эти мутации отсутствовали. Только у одного из штаммов основного подвида – А-1824 из Кызылкумского песчаного очага чумы выявлена другая мутация – вставка единичного нуклеотида С после 351 позиции. Эта мутация приводит к сдвигу рамки считывания, что влечет за собой изменение аминокислотного состава белка RovA в его концевой части (таблица).

Таким образом, в этой работе нами проведено сравнение нуклеотидных последовательностей генов *phoP/phoQ* и *rovA*, кодирующих глобальные транскрипционные регуляторы PhoP/PhoQ и RovA. В гене *phoP* у всех штаммов основного подвида присутствует миссенс-мутация, которая вызывает замену единичного нуклеотида и смену кодируемого аминокислотного остатка глицина на серин в позиции 215 регуляторного белка PhoP. Возможно, что эта мутация, общая для всех штаммов основного подвида, приобретенная на ранней стадии эволюции этого подвида, привела к изменению вторичной структуры одного из доменов белка PhoP, что вызвало изменение его регуляторной активности. Известно, что штаммы основного подвида обладают большей патогенностью и способностью выживать в блохах по сравнению со штаммами неосновных подвидов. Последовательность гена *phoQ*, кодирующего сенсорный белок двухкомпонентной системы PhoP/PhoQ, была высококонсервативна у штаммов всех подвидов, несмотря на большой размер секвенированного нами фрагмента (729 п.н.) этого гена, что указывает на важность сохранения структурно-функциональной целостности гена *phoQ* и кодируемого им белка PhoQ.

Последовательность небольшого (432 п.н.) гена *rovA* оказалось достаточно консервативной у исследованных штаммов *Y. pestis* разных подвидов, что также свидетельствует о важности сохранения его структурно-функциональной целостности для патогенности *Y. pestis*.

Работа выполнена по государственному контракту № 70-Д от 25 июля 2011 г. в рамках федераль-

ной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Базанова Л.П., Иннокентьева Т.И. О роли блох – основных и второстепенных переносчиков чумы – в циркуляции возбудителя в сибирских природных очагах. Мед. паразитол. и паразитарн. бол. 2008; 3:4–60.
2. Кутырев В.В., Коннов Н.П., Волков Ю.П. Возбудитель чумы: ультраструктура и локализация в переносчике. М.: Медицина; 2007. 222 с.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир; 1984. 480 с.
4. Bacot A.W., Martin C.J. Observation on the mechanism of the transmission of plague by fleas. J. Hyg. (Lond). 1914; 13 (Suppl.):423–39.
5. Cathelyn J.S., Grosby S.D., Lathem W.W., Goldman W.E., Miller V.I. RovA – a global regulator of *Yersinia pestis*, specifically required for bubonic plague. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006; 103:13514–19.
6. Eroshenko G.A., Vidyayeva N.A., Kutyrev V.V. Comparative analysis of biofilm formation by main and nonmain subspecies of *Yersinia pestis* strains. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2010; 59:513–20.
7. Grabenstein J.P., Fukuto H.S., Palmer L.E., Bliska J.B. Characterization of phagosome trafficking and identification of PhoP-regulated genes important for survival of *Yersinia pestis* in macrophages. Infect. Immun. 2006; 74:3727–41.
8. Hitchen P.G., Prior G.L., Oyston P.C., Panico M., Wren B.W., Titball R.W. et al. Structural characterization of lipo-oligosaccharide (LOS) from *Yersinia pestis*: regulation of LOS structure by the PhoPQ system. Mol. Microbiol. 2002; 44:637–50.
9. Oyston P.C.F., Dorell N., Williams K., Li S.-R., Green M., Titball R.W., Wren B.W. The response regulator PhoP is important for survival under conditions of macrophage-induced stress and virulence in *Yersinia pestis*. Infect. Immun. 2000; 68:3419–25.
10. Sanger F., Nicklen L., Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977; 74:5463–7.
11. Tran H.J., Heroven A.K., Winkler L., Spreter T., Beatrix B., Dersch P. Analysis of RovA, a transcriptional regulator of *Yersinia pseudotuberculosis* virulence that acts through antirepression and direct transcriptional activation. J. Biol. Chem. 2005; 280:42423–32.
12. Vadivaloo V.V. PhoP regulation of *Yersinia pestis* during flea infection. In: *Yersinia* 2010. 10th Intern. Symp.; 2010 Oct 23–27. Brazil; 2010. P. 67.
13. Zhou D., Han Y., Qin I., Chen Z., Qin J., Song Y. et al. Transcriptome analysis of the Mg²⁺-responsive PhoP regulator in *Yersinia pestis*. FEMS Microbiol. Lett. 2005; 250:85–95.

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

1. Bazanova L.P., Innokent'eva T.I. [Concerning the role of fleas – primary and secondary vectors of plague – for the agent circulation in the Siberian natural foci]. Med. Parazitol. Parazitarn. Bol. 2008; 3:54–60.
2. Kutyrev V.V., Konnov N.P., Volkov Yu.P. [Plague Agent: Ultrastructure and Localization in the Vector]. M.: Meditsina; 2007. 222 p.
3. Maniatis T., Frich E., Sambrook G. [Molecular Cloning]. M.: Mir; 1984. 480 p.

Authors:

Eroshenko G.A., Koshel' E.I., Odinkov G.N., Shavina N.Yu., Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Ерошенко Г.А., Кошель Е.И., Одинокоев Г.Н., Шавина Н.Ю., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 20.12.11.

Н.П.Коннов, Ю.П.Волков, О.С.Кузнецов

СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИЗУЧЕНИЯ ТРЕХМЕРНОЙ (3D) УЛЬТРАТОНКОЙ СТРУКТУРЫ И ВИЗУАЛИЗАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

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

Представлен обобщенный обзор литературных данных по современным приборным подходам изучения пространственной (3D) субмикроскопической организации биологических объектов с высоким пространственным разрешением.

Возможности приборной визуализации и анализа трехмерного биообъекта в значительной мере способствуют более полной характеристике его структурно-функциональных свойств.

Ключевые слова: трансмиссионная, растровая электронная микроскопия, сканирующая зондовая, конфокальная микроскопия, рентгеновская, цифровая голографическая микроскопия.

N.P.Konnov, Yu.P.Volkov, O.S.Kuznetsov

Modern Technologies for Examination of Three-Dimensional (3-D) Ultra-Fine Structure and Visualization of Microorganisms

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Outlined is a review of the literature data on the modern technologies for examination of the spatial (3-D) submicroscopic structural arrangement of biological objects with a high spatial resolution.

Capacities of the instrumental visualization and analysis of a three-dimensional biological object significantly facilitate the overall characterization of its structural-functional properties.

Key words: transmission, raster electronic microscopy, scanning probe, confocal microscopy, X-ray, digital, holographic microscopy.

Развитие микроскопии уже произвело революцию в мире клеточной и молекулярной биологии и остается важнейшей предпосылкой ее будущих открытий.

Применение электронной микроскопии в биологии существенно изменило и углубило прежние представления о тонкой структуре клетки и ее внеклеточных компонентов, что способствовало дополнительному пониманию ее функциональных особенностей.

Визуализация биологических объектов является, по-видимому, наиболее сложной задачей для микроскопии любого типа. Это связано со специфическими особенностями биообъекта: малыми размерами, сложным рельефом поверхности, прозрачностью, мягкостью и легкой повреждаемостью при исследованиях. Возможность проведения структурно-функционального анализа клеток неразрывно связана с изобретением и дальнейшим усовершенствованием световых, электронных и зондовых микроскопов [1, 3–5, 15, 16]. Такая необходимость вызвана стремлением ученых в более полном понимании механизмов сложных пространственных процессов и происходящих в клетке на ультраструктурном уровне (менее 100 нм). Более того, появилась возможность изучения биообъектов в трехмерном – 3D изображении с высоким пространственным разрешением (0,2–0,5 нм).

Получение объемной информации на ультраструктурном уровне существенно расширяет воз-

можность традиционных подходов при изучении микромира, а именно:

- позволяет получать новую информацию об объекте исследования – анализировать и хранить информацию о форме, рельефе поверхности и пространственных параметрах клетки в ее трехмерной субмикроскопической морфологии [2, 3, 6];
- осуществлять моделирование микрообъектов с сохранением их истинных размеров и форм [2, 10];
- проводить компьютерную видовую диагностику в трехмерном режиме [6, 12, 22, 29];
- накапливать информацию об их нативной архитектонике и биоразнообразии [8, 9, 14, 16].

Наиболее часто применяются следующие типы микроскопии, которые позволяют изучать и визуализировать ультраструктуру биологических объектов в трехмерном изображении с высоким пространственным разрешением:

- трансмиссионная (просвечивающая) электронная микроскопия – ТЭМ;
- растровая (сканирующая) электронная микроскопия – РЭМ;
- сканирующая зондовая микроскопия – СЗМ, включающая сканирующую туннельную микроскопию – СТМ, атомно-силовую микроскопию – АСМ, сканирующую оптическую микроскопию ближнего поля – СОМБП;
- лазерная сканирующая конфокальная микроскопия – ЛСКМ;

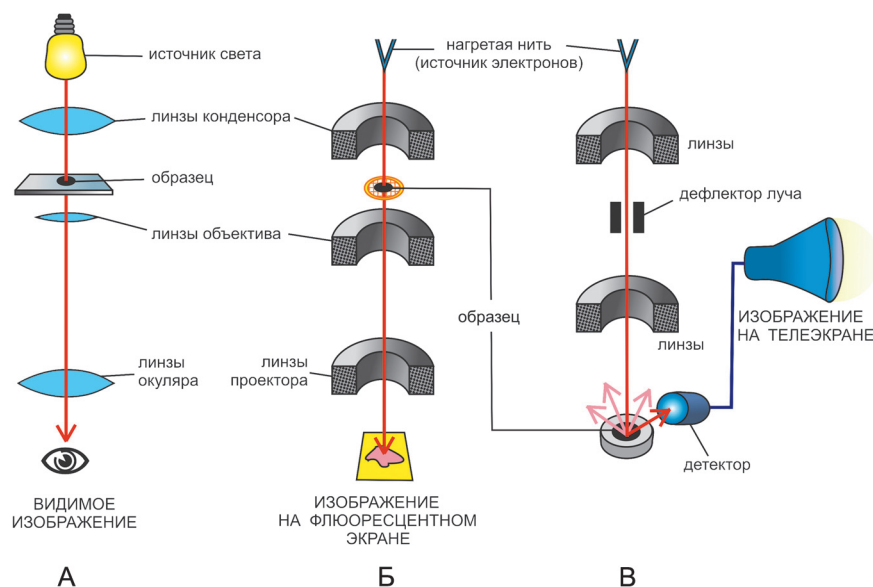


Рис. 1. Схема основных узлов светового микроскопа (А) и электронных микроскопов: просвечивающего (Б) и сканирующего (В)

- рентгеновская микроскопия – РМ;
- цифровая голографическая микроскопия – ЦГМ.

Каждый из указанных выше микроскопов имеет как преимущества, так и определенные недостатки.

Трансмиссионная электронная микроскопия

Этот вид микроскопии более известен, чем другие. В общих чертах ТЭМ очень напоминает световой микроскоп (рис. 1, А).

Источником освещения в ТЭМ является нить катода, излучающего электроны. Для формирования когерентного пучка электронов между катодом и анодом прикладывается ускоряющее напряжение (порядка 50–150 кВ) в условиях высокого вакуума. В качестве линз используются электромагниты, которые фокусируют электронный луч. Изучаемый объект через воздушный шлюз помещают в вакуум, где он попадает под сфокусированный пучок электронов. Часть электронов, которые проходят через образец, рассеиваются (в зависимости от плотности вещества в данном месте), а остальные фокусируются и образуют изображения, которые просматриваются на флуоресцентном экране и фиксируются на фотопленке (рис. 1, Б).

С помощью ТЭМ можно получать сведения о трехмерной структуре клеток. Известно, что в ТЭМ изображения представляют собой проекцию на плоскость структуры заметной толщины. Проекция и сечения этих структур описываются двумерными функциями оптической плотности. Дальнейший путь исследования может состоять в анализе изображения, ограничивающемся плоскими представлениями о пространственной структуре, либо в определении некоторых количественных характеристик трехмерной структуры по имеющемуся в наличии набору плоских картин [2, 3, 22, 32, 34]. Набрав достаточное количество таких изображений клеточной структуры, строят ее объемную пространственную модель с помощью компьютерных программ [6, 20, 22, 32].

Разрешающая способность ТЭМ для биологиче-

ских объектов составляет 0,5–1 нм. Основным недостатком – наличие высокого вакуума и тепловое воздействие пучка электронов на объект.

Растровая (сканирующая) электронная микроскопия

РЭМ является прибором, позволяющим получать обширную информацию от изображения, создаваемого взаимодействием между исследуемым образцом и электронным зондом [9, 12, 21, 30]. Растровый электронный микроскоп основан на использовании предварительно сформированного тонкого электронного луча (зонда), положением которого управляют с помощью электромагнитных полей. Это управление (сканирование) во многом аналогично процессу развертки в телевизионных кинескопах. Исследуемый образец, в условиях высокого вакуума, сканируется сфокусированным электронным пучком средних энергий (рис. 1, В). В зависимости от механизма регистрирования сигнала различают несколько режимов работы РЭМ: отраженных электронов, вторичных электронов, катодolumинесценции, рентгеновского излучения и др. Разработанные методики позволяют исследовать не только свойства поверхности образца, но получать и визуализировать информацию о поверхностных структурах и, по мере надобности, проводить элементный анализ на микроучастке исследуемого объекта [5, 7, 12].

Одним из основных преимуществ растрового электронного микроскопа является большая глубина резкости.

При подготовке биологических препаратов для РЭМ требуются определенные методические приемы – образец должен быть токопроводящим. Для этого в условиях высокого вакуума (в вакуумном посту) образец оттеняется (напыляется) высокоочищенными тяжелыми металлами (золото, платина, палладий и их сплавы). В результате изучаемые объекты, показанные с помощью РЭМ, выглядят трехмерными. При этом разрешающая способность для биологических объектов составляет от 10 до 20 нм.

Растровая электронная микроскопия признана классическим методом изучения пространственных объектов биологической природы и прекрасно себя зарекомендовала на практике.

Сканирующая зондовая (туннельная, атомно-силовая, оптическая ближнего поля) микроскопия

Принципиально новые возможности открылись благодаря созданию в начале 1980-х годов различных сканирующих зондовых микроскопов, к основным типам которых относятся: сканирующий туннельный микроскоп (СТМ), позволяющий исследовать проводящие объекты [11, 13, 18], сканирующий силовой микроскоп (ССМ или АСМ), исследующий как проводящие, так и диэлектрические объекты [1], и сканирующий оптический микроскоп ближнего поля (СОМБП), исследующий тонкие и преимущественно прозрачные объекты [1, 11, 13]. Зондовые микроскопы являются уникальными нанoeлектронными приборами, сочетающими свойства микроскопа атомарного разрешения (около 0,2 нм в плоскости исследуемого объекта) и технологического устройства, с помощью которого могут создаваться наноразмерные элементы с программируемыми свойствами, например, микрочипы.

С возникновением и развитием СЗМ связаны значительные надежды на существенное повышение разрешения структур биологических объектов и возможность проведения исследования живых клеток в условиях, близких к нативным. В настоящее время биологические приложения СЗМ находятся в начальной стадии: отрабатываются методики приготовления объектов, учитывающие специфику зондовой микроскопии, устанавливаются особенности артефактов, свойственных СЗМ, совершенствуются алгоритмы отслеживания рельефа поверхности биологических объектов и др. В настоящее время наиболее широкое

применение в медико-биологических исследованиях нашла атомно-силовая микроскопия [28].

В АСМ в качестве чувствительного элемента служит микрозонд, представляющий собой тонкую пластинку-консоль (кантилевер, от английского слова «cantilever» – консоль, балка).

На конце кантилевера расположен острый шип (радиус закругления от 1 до 10 нм). При перемещении микрозонда вдоль поверхности образца острие шипа приподнимается и опускается, очерчивая микрорельеф поверхности подобно тому, как скользит по грампластинке патефонная игла. На выступающем конце кантилевера (над шипом) расположена зеркальная площадка, на которую падает и от которой отражается луч лазера. Когда шип опускается или поднимается на неровностях поверхности, отраженный луч отклоняется, и это отклонение регистрируется фотодетектором. Данные фотодетектора используются в системе обратной связи, которая обеспечивает постоянную силу давления острия на образец. Пьезоэлектрический преобразователь может регистрировать изменение рельефа образца в режиме реального времени (рис. 2, А).

Разрешающая способность метода составляет примерно 0,1–1 нм по горизонтали и 0,01 нм по вертикали. Однако при исследовании биологических объектов разрешающая способность АСМ ограничивается 10–20 нм, что обусловлено углублением острия кантилевера в биообъект, в результате чего рельеф исследуемой поверхности усредняется по площади контакта. Современные АСМ воздействуют на исследуемый объект с силой около 10^{-9} Н в контактном режиме и примерно на порядок, меньший в полуконтактном. Дальнейшему снижению силы взаимодействия в полуконтактных режимах препятствуют силы поверхностного натяжения пленки воды

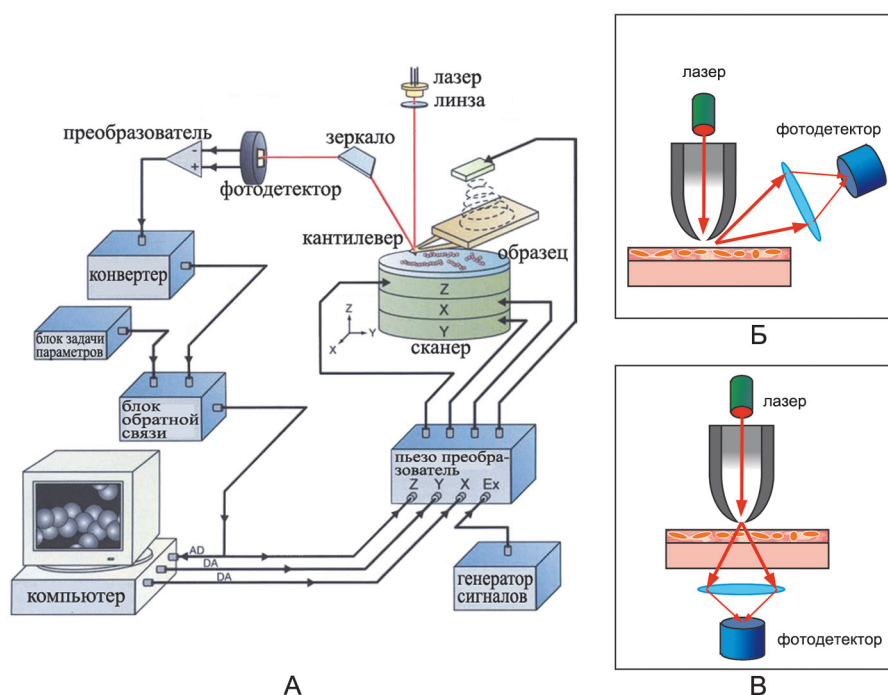


Рис. 2. Схема работы атомно-силового микроскопа [29] (А); возможные конфигурации ближнепольного оптического микроскопа [11]: исследование образцов на отражение (Б) и на просвет (В)

(образующейся на исследуемых объектах при их изучении на воздухе), которое прижимает острие кантилевера к исследуемому объекту. Переход на бесконтактную (резонансную) силовую микроскопию, в которой острие отделено от поверхности расстоянием в несколько десятков нанометров позволяет снизить силу взаимодействия до 10^{-15} Н, при этом снижается локальность исследования поверхности до 10–20 нм. Таким образом, для дальнейшего повышения разрешения необходимо либо уменьшить силу взаимодействия острия с поверхностью путем перехода на другие схемы устройств кантилеверов (например, использование крутильных кантилеверов [10, 11]), либо повысить жесткость исследуемого объекта (например, путем его заморозки в глубоком вакууме для препятствия образования пленок льда) [15].

Что касается сканирующего оптического микроскопа ближнего поля, то на практике используются несколько конструктивных схем (рис. 2, Б, В). Наиболее часто реализуется схема, в которой оптическое излучение лазера локализуется в пространстве с помощью волоконного зонда. Такая схема позволяет получить максимальную мощность излучения в области субволнового отверстия и проводить исследование образцов как на отражение (рис. 2, Б), так и на просвет (рис. 2, В). Для увеличения чувствительности излучение, отраженное от образца или прошедшее сквозь образец, собирается на фотоприемнике с помощью фокусирующего зеркала или линзы.

Конфокальная лазерная микроскопия

Оптическая микроскопия уже более 300 лет находит все более разнообразное и широкое применение. Наиболее простым, но весьма информативным, является метод изучения окрашенных срезов тканей и клеток в проходящем белом свете. Применение оптической микроскопии и сегодня остается неотъемлемой частью клинических и медико-лабораторных исследований. Данный подход основан на использовании различий в интенсивности и цвете естественной или искусственной окраски определенных веществ в клетках и тканях, в комбинации с анализом морфологических признаков [14, 31]. Разработка оптических систем для реализации методов темного поля, фазового и дифференциального интерференционного контраста открыла исследователям возможность наблюдения и исследования микроструктур в неокрашенных и слабоконтрастных биологических объектах, таких как живые клетки. Создание флуоресцентных микроскопов позволило на фоне огромного числа разнообразных молекул избирательно наблюдать флуоресцирующие объекты и стимулировало развитие новых методов для изучения структуры и функции клеток [16].

Изобретение конфокальной системы регистрации сигнала обеспечило измерение флуоресцентных сигналов с трехмерным субмикронным разрешением и существенно расширило возможности неразрушающего анализа прозрачных образцов.

В настоящее время наибольшее распространение

получила лазерная сканирующая конфокальная микроскопия (ЛКСМ). Объемное изображение в ЛКСМ получается при помощи регистрации флуоресценции в фокусе лазерного луча (рис. 3). Излучаемые фотоны фокусируются объективом на небольшом («pinhole», $\sim 50 \mu\text{m}$) отверстии, которое ослабляет флуоресцентный сигнал от участков, находящихся не в фокусе. Получаемые с их помощью трехмерные изображения позволяют заглянуть в микромир, по информативности они несопоставимы с обычными двухмерными картинками. Благодаря своему высокому разрешению и контрасту наиболее часто встречающейся задачей в изучении структуры клеток и их органоидов является исследование цитоскелета клеток, ядра, хромосом, или даже локализации в них отдельных генов [15, 31].

Исследуется также колокализация в клетке двух и более веществ, например белков [31]. Предварительно белки метятся антителами разными флуорохромами. При обычной микроскопии трудно разобрать, находятся они рядом или один под другим. Конфокальная микроскопия позволяет определить их местонахождение. Записав в памяти компьютера серию срезов, можно провести объемную реконструкцию объекта и получить его трехмерное изображение, не используя трудоемкую методику изготовления и фотографирования серийных гистологических срезов.

Еще одна задача решается этими приборами – исследование динамических процессов, происходящих в живых клетках [31]. Например, движение через клеточные мембраны ионов кальция или других веществ. Однако для этого нужен высокоскоростной конфокальный микроскоп.

Новыми перспективными направлениями конфо-

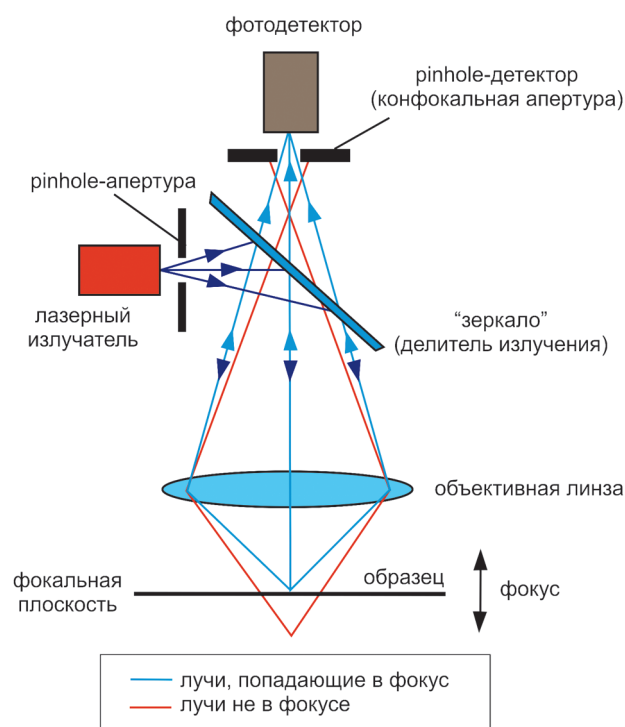


Рис. 3. Оптическая схема конфокальной сканирующей системы [31]

кальной микроскопии являются методики FRAP – Fluorescence Recovery After Photobleaching (Восстановление флуоресценции после фотовыжигания) и FRET – Fluorescence Resonance Energy Transfer (передача энергии посредством флуоресцентного резонанса).

FRAP применяется для исследования подвижности биоорганических молекул посредством инициации фотохимического разложения флуорохрома в зоне облучения и последующего его рассоединения с молекулами. После выжигания молекулы с флуорохромом из необлученной зоны движутся (вследствие диффузии) в облученную зону образца. По времени нарастания в ней флуоресценции можно судить о подвижности молекул.

FRET используется при определении расположения, взаимодействия и расстояния между молекулами разных типов. В этом случае молекулы метятся двумя флуорохромами, один со спектром испускания (донор), второй со спектром поглощения (акцептор). В результате резонанса между энергетическими уровнями молекул, энергия от донора передается к акцептору. Далее энергия, излучаемая акцептором в видимой области спектра, регистрируется микроскопом.

Как и у любого метода, у ЛКСМ имеется ряд недостатков, одним из которых является относительно невысокое разрешение, по сравнению с другими видами трехмерной микроскопии (см. выше). Предел разрешающей способности конфокальной микроскопии составляет 150–300 нм. Тем не менее, конфокальный микроскоп дает две неопределимые возможности: он позволяет исследовать ткани на клеточном уровне в состоянии физиологической жизнедеятельности, а также оценивать результаты исследования (т.е. клеточной активности) в четырех измерениях – высота, ширина, глубина и время.

Рентгеновская микроскопия

Известно, что рентгеновское излучение, имея малую длину волны (менее 10 нм), потенциально способно создавать 3D изображения объекта с высоким разрешением (до половины длины волны). В настоящее время в силу многих технических причин разрешение, получаемое с помощью лабораторных рентгеновских микроскопов, не превышает 200 нм. Исключение составляют микроскопы на основе синхротронного излучения или рентгеновских лазеров, дающие атомарное разрешение [26]. Однако имея большие технические сложности и высокую стоимость, данные приборы не нашли широкого применения в медико-биологических приложениях.

Цифровая голографическая микроскопия

Еще одним способом получения трехмерного изображения биологических объектов является лазерная голографическая микроскопия. Это интенсивно развивающаяся методика позволяет проводить исследование неокрашенных живых клеток в реальном масштабе времени, получая при этом данные о внутренней структуре с глубиной резкости несколько

миллиметров [27]. Принцип работы голографического микроскопа основан на регистрации исследуемого объекта, в котором лазерное излучение, проходя по двум путям (через объект и минуя его), объединяется, строя его голограмму. С помощью фотоматрицы высокого разрешения голограмма регистрируется компьютером. Для последующего восстановления изображения используются различные алгоритмы математической обработки. Микроскопы подобного рода серийно не выпускаются, разработаны только прототипы нескольких вариантов конструкций, имеющих различные ограничения по скорости и разрешению.

В заключение следует отметить, что представленные выше материалы следует рассматривать как предельно сжатое обобщение о возможности изучения биологического микромира, где важным условием развития работ по использованию вышеприведенных приборов является особое внимание к подготовке объекта для изучения, от которой в значительной мере зависят возможности метода. В соответствии с целями и задачами исследования методика такой подготовки может быть различной.

В настоящее время в РосНИПЧИ «Микроб» проводятся работы по изучению тонкой структуры и визуализации в трехмерном измерении с высоким пространственным разрешением бактерий чумы, холеры и сибирской язвы, применяя при этом три типа микроскопии: ТЭМ, СЭМ, АСМ [1, 8, 9]. Такие исследования способствуют получению более полной информации по ультраструктурно-функциональной организации вышеуказанных возбудителей и тонкому пониманию взаимодействия макро- и микроорганизмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Байбури В.Б., Волков Ю.П., Коннов Н.П. Многофункциональный комплекс сканирующей зондовой микроскопии и его применение. Саратов: Изд-во Сарат. ун-та; 1998. 120 с.
2. Вайнштейн Б.К., Орлов С.С. К теории восстановления функций по их проекциям. Кристаллография. 1972; 17:253–6.
3. Вайнштейн Б.К. Трехмерная электронная микроскопия биологических макромолекул. Усп. физ. наук. 1973; 109:454–40.
4. Вайнштейн Б.К. Электронная микроскопия атомного разрешения. Усп. физ. наук. 1987; 152:75–122.
5. Володин А.П. Новое в сканирующей микроскопии. Приборы и техника эксперимента. 1998; 6:3–42.
6. Иванюк Г.Р., Кринский В.И., Сельков Е.Е. Математическая биофизика клетки. М.: Наука; 1978. 309 с.
7. Кару В.Я. Электронная микроскопия. Киев: Вища школа; 1984. 137 с.
8. Коннов Н.П., Волков Ю.П., Кузнецов О.С., Якименко Р.Д., Новикова О.В., Мишиш Н.И. Трехмерная микроскопия бактериальных клеток с высоким пространственным разрешением. Пробл. особо опасных инф. 2002; 1(13):86–90.
9. Кутырев В.В., Коннов Н.П., Волков Ю.П. Возбудитель чумы: ультраструктура и локализация в переносчике. М.: Медицина; 2007. 222 с.
10. Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. СПб.: Наука; 1994. 400 с.
11. Миронов В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии. М.: Техносфера; 2005. 144 с.
12. Растровая электронная микроскопия и рентгеновский микроанализ. М.: Мир; 1984. Т. 1. 303 с.
13. Суслов А.А., Чижик С.А. Сканирующие зондовые микроскопы (обзор). Материалы, Технологии, Инструменты. 1997; 2(3):78–89.
14. Феофанов А.В. Конфокальная микроскопия в биологических исследованиях. Усп. биол. химии. 2007; 47:371–410.
15. Чандлер Д., Робертсон Р. Оптическая и электронная микроскопия в медицине и биологии. М.: Интеллект; 2009. 234 с.
16. Ченцов Ю.С. Введение в клеточную биологию. М.:

- МГУ; 2004. 495 с.
17. Baker T.S., Olson N.H., Fuller D. Adding the third dimension of virus life cycle: three-dimensional reconstruction of viruses from cryo-electron micrographs. *Microbiology and molecular biology reviews*. 1999; 63(4):862–922.
18. Binnig G., Rohrer H. Scanning tunneling microscopy IBM. *J. Res. Develop.* 1986; 30(9):930–3.
19. Bron C., Gremillet P. 3D reconstruction by image-processing of serial section in electron microscopy. In: Kriete A., editor. *Visualisation in biomedical microscopies, 3D imaging and computer applications*. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft; 1992. P. 75–104.
20. Cabado R., Machado-Santelli G.M. Image Analysis and 3D Reconstruction: An Innovating Methodology in Microscopy. *Acta Microscopica*. 2003; 12:55–8.
21. Engel A., Schonenberger C.A., Muller D.J. High resolution imaging of native biological sample surfaces using scanning probe microscopy. *Curr. Opin. Struct. Biology*. 1997; 7:279–84.
22. Fiala J.C. Reconstruct: a free editor for serial section microscopy. *J. Microscopy*. 2005; 218:52–61.
23. Frank J., Radermacher M., Penczek P., Zhu J., Li Y., Ladjadj M., Leith A. SPIDER and WEB: Processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J. Structural Biology*. 1996; 116:190–9.
24. Frank J. *Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies*. San Diego: Academic Press; 1996. 340 p.
25. Giessibl F. Advances in Atomic Force Microscopy. *Reviews of Modern Physics*. 2003; 75(3):949–83.
26. Guehrs E., Gunther C., Konnecke R., Pfau B., Elisebitt S. Holographic soft X-ray omni-microscopy of biological specimens. *Optics express*. 2009; 17(8):6710–20.
27. Kemper B., Langehanenberg P., von Bally G. Digital Holographic Microscopy: A new Method for surface Analysis and Marker-Free Dynamic Life cell imaging. *Optik & Photonik*. 2007; 2(2):41–4.
28. Morris V.J., Kirby A.R., Gunning A.P. *Atomic Force Microscopy for Biologists*. USA: Imperial College Press; 1999. 220 p.
29. Moss V.A. Acquisition and visualisation of serial section images. In: Kriete A., editor. *Visualisation in biomedical microscopies, 3D imaging and computer applications*. Weinheim: Verlagsgesellschaft; 1992. P. 19–44.
30. Mullard A. Microscopy: Eukaryotic cell, now showing in 3D. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007; 8:272–3.
31. Murray J.M. Confocal microscopy, deconvolution and structured illumination methods. In: Goldman R.D., Spector D.L., editors. *Live cell imaging. Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2005. P. 239–79.
32. Verbeek F.J., Huijsmans D.P., Baeten R.W.A.M., Schoutsen N.C.J., Lamers W.H. Design and Implementation of a database and a program for 3D-reconstruction from serial sections: A data driven approach. *Microscopy Res. Tech.* 1995; 30:1–17.
33. Verbeek F.J. 3D reconstruction from serial sections, applications and limitations *Microscopy and Analysis (UK version)*. 1996; 56:33–5.
34. Verbeek F.J. Theory and Practice of 3D-reconstructions from serial sections. In: Baldock R.A., Graham J., editors. *Image Processing, a Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press; 1999. P. 153–95.

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

1. Baiburin V.B., Volkov Yu.P., Konnov N.P. [Multifunctional Complex for Scanning Probe Microscopy and its Application]. Saratov: Izd. Sar. Univ; 1998. 120 p.
2. Vainshtein B.K., Orlov S.S. [Regarding the theory of functions recovery based on their projections]. *Kristallografiya*. 1972; 17:253–6.
3. Vainshtein B.K. [Three-dimensional electronic microscopy of biological molecules]. *Usp. Fiz. Nauk*. 1973; 109:454–60.
4. Vainshtein B.K. [Atomic-resolution electronic microscopy]. *Usp. Fiz. Nauk*. 1987; 152:75–122.
5. Volodin A.P. [New trends in the sphere of scanning microscopy. Equipment and experimental procedure]. 1998; 6:3–42.
6. Ivanitsky G.R., Krinsky V.I., Sel'kov E.E. [Mathematical Biophysics of the Cell]. M.: Nauka; 1978. 309 p.
7. Karup V.Ya. [Electronic microscopy]. Kiev; 1984. 137 p.
8. Konnov N.P., Volkov Yu.P., Kuznetsov O.S., Yakimenko R.D., Novikova O.V., Mikshis N.I. [Three-dimensional microscopy of bacterial cells with high spatial resolution]. *Probl. Osobo. Opasn. Infek.* 2002; 83:86–90.
9. Kutyrev V.V., Konnov N.P., Volkov Yu.P. [Plague Agent: Ultra-Structure and Localization in the Vector]. M.: Meditsina; 2007. 222 p.
10. Mironov A.A., Komissarchik Ya.Yu., Mironov V.A. [Methods of Electronic Microscopy in Biology and Medicine]. St. Petersburg: Nauka; 1994. 400 p.
11. Mironov V.L. [Fundamentals of Scanning Probe Microscopy]. M.: Tekhnosfera; 2005. 144 p.
12. [Raster Electronic Microscopy and X-ray Microanalysis]. M.: Mir; 1984. Vol. 1. 303 p.
13. Suslov A.A., Chizhik S.A. [Scanning Probe Microscopes (Review)]. *Materialy Tekhnol. Instrum.* 1997; 2(3):78–89.
14. Feofanov A.V. [Confocal microscopy in biological investigations]. *Usp. Biol. Khimii*. 2007; 47:371–410.
15. Chandler D., Roberson R. [Visible-Light and Electronic Microscopy in Medicine and Biology]. M.: Intellekt; 2009. 234 p.
16. Chentsov Yu.S. [Introduction to Cellular Biology]. M.: MSU; 2004. 495 p.

Authors:

Konnov N.P., Volkov Yu.P., Kuznetsov O.S. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrap@microbe.ru

Об авторах:

Коннов Н.П., Волков Ю.П., Кузнецов О.С. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Поступила 01.04.11.

А.Б.Мазрухо, В.В.Лобанов

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В ОБЛАСТИ ИЗУЧЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА И ОСОБЕННОСТЕЙ ПИТАНИЯ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону

В обзоре рассматриваются современные представления о физиологии холерных вибрионов в разных условиях существования. Описаны особенности метаболизма *V. cholerae* при выращивании на питательных средах, *in vivo*, а также в организме больного холерой на разных стадиях болезни. Особый акцент сделан на изменениях синтеза факторов патогенности при развитии холеры. Рассмотрена роль биопленки в сохранении *V. cholerae* в межэпидемический период. Отмечено, что регуляция роста холерных вибрионов зависит от сигналов окружающей среды, которые переключают метаболизм и меняют питательные потребности.

Ключевые слова: холерный вибрион, среда роста, метаболизм, физиология.

А.В.Мазрухо, V.V.Lobanov

Modern Trends in Analysis of Cholera Vibrios Metabolism and Nutrient Requirements

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

Modern insights into cholera vibrios physiology in different life conditions are considered in the review. Described are metabolic peculiarities of *V. cholerae* growing on nutrient media and *in vivo*, as well as in cholera patient organism, with special emphasis on alterations of pathogenicity factors synthesis at different stages of the disease. Considered is biofilm role in *V. cholerae* preservation in inter-epidemic period. Regulation of cholera vibrios growth is shown to depend upon environmental signals which shift metabolism and alter nutrient requirements.

Key words: cholera vibrios, growth medium, metabolism, physiology.

Бактерии отличаются большой гибкостью метаболизма, им свойственна экономичность в использовании веществ и энергии. Адаптация – сложный процесс, происходящий на гено- и фенотипическом уровне, сопровождаемый изменениями метаболизма и типа питания. Она осуществляется под контролем уровня роста и размножения, и в условиях «голодания» регуляторные механизмы тормозят рост большинства клеток популяции [12].

У представителей рода *Vibrio* хромосома содержит сотни кассет, повышающих адаптационные свойства бактерий [3]. *Vibrio cholerae* является гетеротрофным микроорганизмом и факультативным анаэробом [7, 11]. Контроль колонизации и размножения холерных вибрионов проводит группа генов, мощным индуктором которых является глюкоза [25]. В условиях пониженной аэрации происходит сбраживание глюкозы, как у облигатных анаэробов. При повышении уровня O_2 продукты анаэробного расщепления окисляются кислородом. В питательных средах глюкоза используется холерными вибрионами не только в качестве генератора энергии, но и для синтеза аминокислот, нуклеотидов.

Азотистый обмен холерных вибрионов связан с их мощной протеолитической системой, которая есть практически у всех штаммов и при самых разнообразных условиях существования. В одних случаях она обеспечивает холерный вибрион продуктами питания, в других – способностью адгезировать к слизистой кишечника (гемагглютинин/протеаза) [39]. Известно несколько протеолитических ферментов холерных вибрионов, в частности желатиназа, коллагеназа, и протеазы, осуществляющие плазмокоагулазную и фибринолитическую активность

[1]. Уровень гидролиза белка сказывается на жизнеобеспечении вибрионов. Утилизацию азота они осуществляют, отщепляя аминокрупы от других соединений. В качестве источника азота *V. cholerae* способен использовать аммиак, пурины. Холерный вибрион синтезирует нуклеиновые кислоты и различные по сложности нуклеопротеиды. Они связаны с углеводным обменом, в частности НАД играет важную роль в цикле трикарбоновых кислот. В синтезе некоторых метаболитов (холерный токсин) никотинамид необходим в питательной среде.

Липиды в холерных вибрионах являются составной частью клеточных мембран и липополисахарида. Гидролиз липосодержащих продуктов питательных сред осуществляется с помощью липазы, лецитиназы, фосфатазы, происходит также окисление липидов. Выявлена эстеразная активность вибрионов. Они расщепляют длинноцепочечные жирные кислоты [2]. Все эти ферменты составляют комплекс гидролаз, которые необходимы для жизнеобеспечения холерного вибриона [1, 15]. На питательной среде с глицерином наблюдали гидролазную активность преимущественно у атоксигенных штаммов холерных вибрионов. Вибрионы классического биовара (вирулентные) растут на среде с жиром, не проявляя гидролитической активности. Способность гидролизовать жир и глицерин коррелирует с гемолитической активностью.

Холерные вибрионы хорошо растут в щелочной (до pH 9,2) среде, размножаются в присутствии хлористого натрия (0,5–2,0 %) при температуре от 10 до 40 °C. При выращивании в бульоне через 6 ч падает до минимума окислительно-восстановительный потенциал и понижается pH среды. Холерные вибрионы выравнивают потенциал путем окисления аминокис-

лот, и при длительной инкубации он активно повышается, что сопровождается изменением pH (до уровня 7,6–8,0). Кислород окружающей среды активирует эти метаболические пути. На понижение уровня аэрации холерные вибрионы реагируют по-разному [9]. Выращивание в 10 мл 1 % пептонной воды в течение 20 ч в стационарных условиях 170 штаммов холерных вибрионов 1-й группы биохимической активности по Хейбергу позволило разделить их на три группы с такими средними значениями времени достижения М-концентрации: 5,5 ч *V. cholerae* non O1 / non O139; 10,0 и 10,9 ч *V. cholerae cholerae* и *V. cholerae* O139; 13,2 ч *V. cholerae* eltor [35]. В условиях ограниченного доступа кислорода некоторые штаммы могут расти и размножаться на минеральной среде с добавлением глюкозы [9].

Холерные вибрионы способны обитать в нескольких экологических нишах. Это определяет биологическое многообразие фенотипических признаков вибрионов. Отмечено соответствие генотипов условиям обитания: популяция холерных вибрионов может образовать биогеографический профиль на региональном уровне [30]. Следует обратить внимание на тот факт, что в современный период эволюция генома возбудителя холеры продолжается [13]. При анализе путей формирования атипичных штаммов выявлены не только изменения клеточного метаболизма, но и утрата способности синтезировать токсин.

Холерные вибрионы – типичные R-стратеги, характерной чертой которых является наличие периода «взрывного» роста популяции. Питательные потребности вирулентных холерных вибрионов «обслуживают» 92 метаболических пути, множество ферментативных реакций [36]. На ранних стадиях холеры выявлена высокая экспрессия белков, кодируемых на острове патогенности, в том числе пилей адгезии, необходимых для прикрепления к слизи кишечника. Адгезия осуществляется при активной роли нескольких ферментов [27, 39, 43], среди которых нейраминидаза оказывает влияние на регуляцию генов вирулентности холерных вибрионов [20]. Ключевым сигналом синтеза факторов колонизации может быть анаэробизм, поскольку патогенность *V. cholerae* проявляется в кишечнике в условиях низкого содержания кислорода. Другим важным регуляторным сигналом является концентрация водородных ионов. Показано [5], что сигналом внешней среды, влияющим на изменения в природных популяциях холерного вибриона, является щелочная реакция среды (pH 9,0). В этих условиях происходит переключение экспрессии генов вирулентности и персистенции: изменяется содержание белков, влияющих на проницаемость мембраны, деление клеток, подвижность, участвующих в энергетическом обмене, синтезе экзополисахарида, холерного токсина, гемолизина, растворимой гемагглютинин/протеазы [4]. При высокой солености среды в координации с определенной концентрацией водородных ионов меняется морфология и подвижность холерных вибрионов, а также уровень продукции экзополисахари-

да и гемагглютинин/протеазы [24].

В организме человека, в верхнем отделе кишечника, где вибрионы персистируют во время холеры, в начале инфекционного процесса возбудитель обеспечен всем необходимым для бурного роста. Сialовые кислоты поверхности слизистой являются источником углерода и энергии, а продукты пристеночного пищеварения позволяют использовать азотистые продукты и глюкозу. В переключении метаболических процессов вирулентных штаммов после попадания в кишечник, по мнению исследователей, главное – повышение энергетики анаэробизма. Одним из индукторов такого переключения считается бикарбонат. В верхней части тонкого кишечника присутствует в большой концентрации CO₂. Превращение двуокиси углерода в бикарбонат стимулирует транскрипцию генов вирулентности возбудителя холеры в тонком кишечнике [18]. В организме холерных больных метаболизм вибрионов зависит от нехватки железа и кислорода [21]. В связи с этим экспрессируется не менее 24 генов, вовлеченных в транспорт железа, и 13 генов анаэробного энергетического метаболизма, которые способствуют синтезу факторов колонизации [18, 33]. Смена фенотипа *V. cholerae* сопровождается изменением энергетического и белкового обмена, структурных компонентов внешней мембраны, транспорта и секреции [4]. К исходу заболевания, которое иногда длится всего несколько часов, содержимое кишечника уже не может обеспечить условия для хорошего роста холерного вибриона. Когда питательные субстраты исчезают, начинается утилизация резервных соединений, что отражается на специфических функциях малой хромосомы, где располагаются гены, которые индуцируются при аминокислотном голодании [12]. Показано [43], что при выращивании вибрионов *in vivo* в перевязанной петле кишечника кролика и *in vitro* в «богатой» питательной среде экспрессия генов, ответственных за инфицирование, особенно выражена в середине фазы экспоненциального роста. В этот период *in vivo* экспрессируются гены, которые влияют на размножение холерных вибрионов в кишечнике; *in vitro* – вовлеченные в подвижность, хемотаксис, колонизацию. Если у штаммов с повышенной скоростью роста активнее амплифицируются гены большой хромосомы, то при сниженной скорости роста увеличивается число копий генов, имеющих отношение к синтезу токсина. Это соответствует огромным энергетическим затратам на обеспечение «взрывного» роста холерных вибрионов и перераспределению энергии в следующей фазе роста популяции. Отмеченные закономерности токсиногенеза используют для продукции СТ *in vitro*. Применяют метод культивирования холерных вибрионов, при котором относительно анаэробные условия во время начальной фазы выращивания меняют на ярко выраженный аэробизм (метод Iwanaga) [26]. Добавление в среду бикарбоната индуцирует экспрессию генов вирулентности. В кишечнике на поздней стадии холерной инфекции происходит экспрессия оперонов, которые вновь меняют метаболизм

инфекционного агента. Усиливается потребление аминокислот и железа, транскрипция генов, связанных с утилизацией хитина, что становится важным для холерных вибрионов в преддверии выхода в новую среду обитания [21, 42].

В регионах, где холерные эпидемии часты, до 99,2 % выделенных из воды штаммов холерных вибрионов лишены главных факторов вирулентности – холерного токсина (СТ) и пилей адгезии (TCP) [23]. Вместе с тем, отмечено генетическое разнообразие популяции, представленной свободноживущими планктонными, связанными с биотической или абиотической поверхностью, а также сгруппированными в биопленке клетками. В межэпидемический период, когда патогенные вибрионы наравне с комменсалами водной среды, обитают в реках, морях, эстуариях, засоленных водоемах, жизнеобеспечение возбудителям холеры обеспечивают особые физиологические состояния и метаболические пути [37, 42]. При неблагоприятных условиях микробные клетки уменьшаются в размерах, приобретают склонность к агрегации, концентрации в биопленках. Часть их составляют неподвижные покоящиеся формы, а в крайних случаях они превращаются в некультивируемые формы [16]. Этот тип неблагоприятного воздействия, как и другие виды стресса, индуцирует общие пути изменения физиологии клеток: снижение скорости роста, нарушение целостности внешней мембраны и метаболизма железа [38]. Чтобы выжить в окружающей среде в условиях голодания, холерные вибрионы на какое-то время выбирают стратегию «энергетического сдерживания» [29]. Замедление и прекращение роста позволяет бактериям пережить трудности с питанием, впад в покоящееся состояние, при котором выключены почти все жизненные функции [12]. При ухудшении условий роста на питательных средах холерные вибрионы перестраивают энергетический метаболизм, увеличивают активность ключевого фермента сапрофитов – рибулозодифосфат карбоксилазы [14]. Многие исследователи считают, что в водных резервуарах холерные вибрионы могут надолго сохраняться в форме биопленок [28, 32]. Регуляция процесса формирования биопленки, ее архитектуры, плотности клеток и их открепления, происходит под влиянием гемагглютинин/протеазы (Нар) и системы «чувства кворума» (QS) [8]. Главным компонентом матрикса биопленки является экзополисахарид. Активаторами *vps* гена являются сигналы окружающей среды в виде моносахаридов (арабиноза), нуклеозидов, солей желчи, соленость среды обитания [19, 31]. Они регулируют питание микробных клеток внутри биопленки [32, 40]. При выращивании в щелочной пептонной воде репрессорами являются сахароза, декстроза, фруктоза, мальтоза, цитрат, соли желчи, тиосульфат [19]. Наличие в среде моносахаридов и последующее их усвоение микробом важно для накопления резервных питательных веществ внутри биопленки, что может повлиять на длительность сохранения возбудителя холеры в окружающей среде [31]. Регуляторные механизмы поддерживают много-

образии физиологических свойств бактерий, образующих пленку, что признается многими авторами. В составе биопленки могут быть как продуценты холерного токсина, так и утратившие способность его продуцировать.

В водной среде вибрионы находятся в окружении антагонистов. В донных отложениях морского побережья важным фактором, влияющим на вибрионы, является присутствие там амёб [34, 41]. Испытывая трудности с питанием, холерный вибрион ассоциирует с фито- и зоопланктоном, ракообразными и яйцами насекомых. Есть сведения, показывающие роль некоторых амёб в качестве хозяина холерных вибрионов в окружающей среде [17]. Холерный вибрион способен колонизовать поверхности животных благодаря наличию у него хитин-связывающих пилей, глюкозамин-связывающего белка, маннозочувствительного гемагглютинина. Паразитирование на покрытых хитином поверхностях животных обуславливает высокая активность хитинолитической системы вибрионов [22]. По мнению исследователей [10], катаболизм полисахарида хитина является одним из главных механизмов поддержания патогенных штаммов *V. cholerae* в природе. При заносе возбудителя холеры в условия более холодного климата рост его популяции зависит от прогревания воды, размножения хитинсодержащих животных планктона и наступления периода цветения определенных видов водорослей. Массовое развитие цианобактерий и обилие хлорококковых зеленых водорослей совпадает с периодом обнаружения вибрионов [16].

В заключение можно сказать, что современные тенденции в области изучения физиологии холерных вибрионов связаны с регуляторными процессами, влияющими на добывание пищи бактериями. Гетерогенность популяции *V. cholerae* во многом зависит от разнообразия условий обитания холерных вибрионов. Хорошее снабжение питательными веществами приводит к «взрывному» росту популяции, но подобное состояние – редкость, поэтому для вибрионов более характерно ограничение питательных потребностей. В процессе размножения происходит гибель части клеток, однако вирулентность оставшихся может сохраняться. Это заставляет активно исследовать механизмы, регулирующие физиологию питания холерных вибрионов в соответствии с целевыми задачами жизнеобеспечения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамов А.К., Наумишина М.С. Холерные вибрионы. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та; 1984. 328 с.
2. Дуванова О.В., Шиманюк Н.Я., Мишанькин Б.Н. Способность расщеплять твин 20 как дифференциальный тест для вибрионов O139 серовара различного происхождения. Клин. лаб. диагн. 2000; 5:48–9.
3. Ерошенко Г.А. Основные направления современных исследований биологии холерных вибрионов. Пробл. особо опасных инф. 2008; 1(95):37–41.
4. Заднова С.П., Исаев Н.Д., Кутейкин-Тепляков К.Б., Тихонова О.В., Торопыгин И.Ю., Арчаков А.И. и др. Протеомный анализ двух изогенных вариантов *Vibrio cholerae* классического биовара с альтернативной экспрессией генов вирулентности. Пробл. особо опасных инф. 2006; 3:11–6.
5. Заднова С.П., Ливанова Л.Ф., Лозовский Ю.В., Смирнова Н.И. Выявление в природных популяциях холерного вибриона

клонов с различной экспрессией факторов вирулентности и персистенции и их фенотипический анализ. Пробл. особо опасных инф. 2009; 3(101):39–41.

6. Исаев Н.Д., Лозовский Ю.В., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Популяционная неоднородность природных штаммов *Vibrio cholerae* классического биовара: координационное изменение морфологии колоний, подвижности, токсигенности и ферментативных свойств. Пробл. особо опасных инф. 2005; 1(89):43–6.

7. Лабораторная диагностика холеры: Методические указания МУК 4.2.2218-07. М.; 2007. 87 с.

8. Лобанов В.В. Проблемы колонизации кишечника холерными вибрионами. Эпидемиол. и инф. бол. 2009; 3:37–9.

9. Милютин В.Н., редактор. Механизмы и диапазон изменчивости холерных вибрионов. Ростов-н/Д: Кн. изд-во; 1981. 175 с.

10. Мишанькин Б.Н., Шиманюк Н.Я., Водопьянов С.О. Изучение хитинолитического комплекса *Vibrio cholerae* O139. В кн.: Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. М., 2006. С. 303–5.

11. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство. М.: Медицина, Шико; 2009. 472 с.

12. Прозоров А.А., Даниленко В.Н. Система «токсин-антитоксин» у бактерий: инструмент апоптоза или модуляторы метаболизма? Микробиология. 2010; 79(2):147–59.

13. Смирнова Н. И., Горяев А. А., Кутырев В.В. Эволюция генома возбудителя холеры в современный период. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2010; 4:11–9.

14. Соколенко А.В., Ломов Ю.М., Асеева Л.Е. Особенности обмена некультивируемых форм холерного вибриона. Усп. совр. естествознания. 2002; 2:22–30.

15. Телесманич Н.Р. Триацилглицероллипазная активность гемолитических холерных вибрионов. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2004; 2:11–4.

16. Титова С.В., Соколенко А.В., Ломов Ю.М. и др. Морфологические изменения в популяции холерных вибрионов при переходе в некультивируемое состояние под влиянием отдельных абиотических и биотических факторов в эксперименте. Пробл. особо опасных инф. 2004; 2(88):45–9.

17. Abd Y., Saeed A., Weintraub A., Sandstrom G. *Vibrio cholerae* O139 requires neither capsule nor LPS O side chain to grow inside *Acanthamoeba castellanii*. J. Med. Microbiol. 2009; 58(1):125–31.

18. Abuaitha B.H., Whitey J.H. Bicarbonate induces *Vibrio cholerae* virulence gene expression by enhancing ToxT activity. Infect. Immun. 2009; 77(9):4111–20.

19. Ali Afsar, Morris J.G., Johnson J.A. Sugars inhibit expression of the rugose phenotype of *Vibrio cholerae*. J. Clin. Microbiol. 2005; 43:1426–9.

20. Almagro-Moreno S., Boyd E.F. Sialic acid catabolism confers a competitive advantage to pathogenic *Vibrio cholerae* in the mouse intestine. Infect. Immun. 2009; 77(9):3807–16.

21. Bina J., Zhu J., Dziejman M. et al. Tox R regulon of *Vibrio cholerae* and its expression in vibrios shed by cholera patients. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003; 100:2801–6.

22. Connell T.D., Metzger D.J., Lynch J., Folster J.P. Endochitinase is transported to extracellular milieu by the eps-encoded general secretory pathway of *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol. 1998; 180(21):5591–600.

23. Faruque S., Choudhury N., Kamruzzaman M. et al. Genetic diversity and virulence potential of environmental *Vibrio cholerae* population in a cholera endemic area. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004; 101(7):2123–8.

24. Herz K., Vimont S., Padan E. et al. Role of NhaA, NhaB, and nhaD Na⁺/H⁺ antiporters in survival of *Vibrio cholerae* in saline environment. J. Bacteriol. 2003; 185(4):1236–44.

25. Houot L., Watnick P. A novel role for enzyme 1 of the *Vibrio cholerae* phosphoenolpyruvate phosphotransferase system in regulation of growth in a biofilm. J. Bacteriol. 2008; 190(1):311–20.

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

27. Jermyn W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (nan H) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. Microbiology. 2002; 148:3681–93.

28. Joellson A., Liu Z., Zhu J. Genetic and phenotypic diversity of quorum-sensing systems in clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae*. Infect. Immun. 2006; 74:1141–47.

29. Kalidas P., Ghosh A., Sengupta N., Chowdhury R. Competitive growth advantage of nontoxigenic mutants in the stationary phase in archival cultures of pathogenic *Vibrio cholerae*. Infect. Immun. 2004; 72:5478–82.

30. Keymer D.P., Lam L.H., Boehm A.B. Biogeographic patterns in genomic diversity among a large collection of *Vibrio cholerae* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 2009; 75 (6):1658–66.

31. Kjerrek K., Watnick P.J. Environmental determinants of *Vibrio cholerae* biofilms development. Appl. Envir. Microbiol. 2003; 69:5078–88.

32. Liu Zhi, Stirling F.R., Zhu Jun. Temporal quorum-sensing induction regulates *Vibrio cholerae* biofilm architecture. Infect. Immun. 2007; 75:122–6.

33. Marrero K., Sanchez A., Rodriguez-Ulloa A. et al. Anaerobic growth promotes synthesis of colonization factors encoded of the *Vibrio* pathogenicity island in *Vibrio cholerae* ElTor. Res. Microbiol. 2009; 160(1):48–56.

34. Pukatzki S., Ma A.T., Sturtevant D. et al. Identification of conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using Dictyostelium host model system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006; 103(5):1528–33.

35. Saint-Dic D., Kehrl J., Frushour B. et al. Excess Seq A leads to replication arrest and a cell division defect in *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol. 2008; 190(17):5870–78.

36. Shi J., Romero P.R., Schoolnik G.K. et al. Evidence supporting predicted metabolic pathways for *Vibrio cholerae*: gene expression data and clinical tests. Nucleic Acids Res. 2006; 34(8):2438–44.

37. Shikuma N.J., Yildiz F.H. Identification and characterization of OseR, a transcriptional regulator involved in osmolarity adaptation in *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol. 2009; 191(13):4082–96.

38. Sikora A.E., Beyhan S., Yildiz F.H. et al. Cell envelope perturbation induces oxidative stress and changes in iron homeostasis in *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol. 2009; 191(17):5398–5408.

39. Silva A.J., Leitch G.J., Camilli A., Benitez J.A. Contribution of hemagglutinin/protease and motility of the pathogenesis of El Tor biotype cholera. Infect. Immun. 2006; 74:2074–79.

40. Sportmann A.M. Physiology of microbes in biofilms. Curr. Trop. Microbiol. Immunol. 2008; 322:17–36.

41. Vezzulli L., Pezzatti E., Moreno V. et al. Benthic ecology of *Vibrio* spp. and pathogenic *Vibrio* species in a coastal Mediterranean environment (La Spezia Gulf, Italy). Microb. Ecol. 2009; 58 (4):808–18.

42. Wordend Z., Seidel M., Smruga S. et al. Trophic regulation of *Vibrio cholerae* in coastal marine water. Environ. Microbiol. 2006; 8(1):21–9.

43. Xu Q., Dziejman M., Mekalanos J.J. Determination of the transcriptome of *Vibrio cholerae* during intraintestinal growth and midexponential phase *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003; 100(3):1285–91.

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

1. Adamov A.K., Naumshina M.S. [Cholera Vibrios]. Saratov; 1984. 328 p.

2. Duvanov O.V., Shimanyuk N.Ya., Mishan'kin B.N. [The ability of tweek 20 cleavage as a differential feature of O139 serogroup vibrios of different origin]. Klin. Lab. Diagnost. 2000; 5:48–9.

3. Eroshenko G.A. [Main trends of the up-to-date research of cholera vibrios biology]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2008; 95:37–41.

4. Zаднова С.П., Исаев Н.Д., Кутекин-Тепляков К.Б., Тихонова О.В., Торопыгин И.Ю., Арчаков А.И. et al. [Proteomic analysis of two isogenic *Vibrio cholerae* of the classical biovar with the alternative expression of virulence genes]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2006; 3:11–6.

5. Zаднова С.П., Ливанова Л.Ф., Лозовский Ю.В., Смирнова Н.И. [Detection of clones with different expression of virulence and persistence factors in natural populations of cholera vibrio and their phenotypic analysis]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2009; 3(101):39–41.

6. Исаев Н.Д., Лозовский Ю.В., Заднова С.П., Смирнова Н.И. [Population heterogeneity of natural *Vibrio cholerae* strains of classical biovariant: coordinated changes in colony morphology, motility, toxigenicity, and enzymatic characteristics]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2005; 89:43–6.

7. [Laboratory Diagnostics of Cholera]. MR 4.2.2218-07. М.; 2007. 87 p.

8. Лобанов В.В. [Problems of enteric colonization with *Vibrio cholerae*]. Epidemiol. Infek. Bol. 2009; 3:37–9.

9. Милютин В.Н., редактор. [Mechanisms and Rate of *Vibrio cholerae* Variability]. Ростов-он-Дону; 1981. 175 p.

10. Мишанькин Б.Н., Шиманюк Н.Я., Водопьянов С.О. [Study on *Vibrio cholerae* O139 chitinolytic complex]. In: [Modern Prospects of Investigation of Chitin and Chitosan]. М.; 2006. P. 303–5.

11. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases: Practical Guidelines]. М.; 2009. 472 p.

12. Прозоров А.А., Даниленко В.Н. [Toxin-antitoxin systems in bacteria: Apoptotic tools or metabolic regulators?]. Mikrobiologia. 2010; 79(2):147–59.

13. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Кутырев В.В. [The evolution of the *Vibrio cholerae* genome during the modern period]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 2010; 4:11–9.

14. Соколенко А.В., Ломов Ю.М., Асеева Л.Е. [Metabolic profiles of noncultivated forms of *Vibrio cholerae*]. Usp. Sovr. Estestvoznaniya. 2002; 2:22–30.

15. Телесманич Н.Р. [Triacylglycerollipase activity of hemolytic *Vibrio cholerae*]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2004; 2:11–4.

16. Титова С.В., Соколенко А.В., Ломов Ю.М. et al. [Morphological changes in a cholera vibrio population during its transition into non-culturing state due to the effects of individual abiotic and biotic factors under experimental conditions]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2004; 88:45–9.

Authors:

Mazrukko A.B., Lobanov V.V. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russia. E-mail: plague@aaanet.ru

Об авторах:

Мазруко А.Б., Лобанов В.В. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru

Поступила 18.05.11.

Е.В.Монахова, Р.В.Писанов, Л.М.Веркина, А.В.Миронова

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА *ace* *VIBRIO CHOLERAE* В *ESCHERICHIA COLI*

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону

Ген accessory cholera enterotoxin (*ace*) *Vibrio cholerae*, амплифицированный с помощью ПЦР, клонирован в составе векторной плазмиды pQE30 по сайтам BamHI-HindIII. Экспрессия гена происходит под контролем T5-промотора. Штамм *Escherichia coli* M15[pREP4]pAce90 (КМ 194), содержащий рекомбинантную плазмиду, является активным продуцентом белка 6His-Ace, который обладает биологической активностью на модели мышей-сосунков, вызывая накопление жидкости в кишечнике. Продукт присутствует в клетках кишечной палочки в виде телец включения. Сконструированный штамм-продуцент может быть использован для получения препаратов Ace в целях изучения его значимости как фактора патогенности холерных вибрионов.

Ключевые слова: accessory cholera enterotoxin, холерный вибрион, клонирование генов, рекомбинантная плазмида.

E.V.Monakhova, R.V.Pisanov, L.M.Verkina, A.V.Mironova

Cloning and Expression of *ace* Gene of *Vibrio cholerae* in *Escherichia coli*

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

Accessory cholera enterotoxin (*ace*) gene of *Vibrio cholerae*, amplified by PCR, is cloned into the BamHI-HindIII sites using plasmid pQE30. Expression of *ace* gene is under the control of T5 promotor. The *Escherichia coli* strain M15[pREP4]pAce90 (KM 194), containing recombinant plasmid, is an active producer of 6His-Ace protein, which possesses biological activity in the models of suckling mice and causes accumulation of fluid in the intestine. The product is contained in inclusion bodies found in the cells of coliform bacterium. The engineered producer strain can be used to obtain Ace preparations with a view to study its significance as pathogenicity factor in cholera vibrio.

Key words: accessory cholera enterotoxin, cholera vibrio, gene cloning, recombinant plasmid.

Accessory cholera enterotoxin (Ace) относят к числу дополнительных факторов вирулентности холерных вибрионов [9–12]. Кодированный его ген *ace* вместе с генами *cep*, *orfU*, *zot* и *ctxAB* входит в состав коровой области генома умеренного филаментозного фага СТХф, интегрированного в хромосому *Vibrio cholerae* и способного к горизонтальной передаче перечисленных генов от штамма к штамму [6, 12]. Ace представляет собой гидрофобный белок с молекулярной массой (ММ) 11,4 килодальтон (кДа), который способен агрегироваться в димер с образованием структуры, сходной с ион-проницаемой порой [10, 11]. Известно, что он является одновременно необходимой составляющей фагового морфогенеза [6, 12] и диареогенным фактором, поскольку способен вызывать накопление жидкости в изолированных петлях кишечника кролика и повышение тока короткого замыкания (I_{sc}) в ткани кишечника при исследовании в камерах Юссинга [9]. Предполагаемый механизм действия Ace заключается во встраивании гидрофобной α -спирали этого белка в мембрану энтероцита (формирование поры), вследствие чего жидкость с ионами поступает обратно в просвет кишечника, вызывая диарею [10, 11]. Однако его роль в патогенезе холеры до сих пор не доказана и оспаривалась некоторыми авторами [6].

Дальнейшее изучение биологической активности Ace требует наличия его препаратов, наиболее перспективным способом получения которых явля-

ется использование продуцентов – рекомбинантных штаммов микроорганизмов, содержащих клонированный ген *ace*, поскольку холерные вибрионы синтезируют крайне низкие количества этого белка [10] на фоне продукции целого ряда других токсинов. Ранее M.Trucksis *et al.* [10] ген *ace* был клонирован в составе хромосомной ДНК дрожжей *Pichia pastoris*. Полученный рекомбинантный клон оказался активным продуцентом искомого белка. Вместе с тем, возможность его технологического применения ограничена длительным периодом культивирования (36–48 ч) и крайней токсичностью используемого в качестве индуктора метилового спирта. В последующем о клонировании гена *ace* в *Escherichia coli* в составе вектора pBAD/Thio-TOPO сообщила группа исследователей из Малайзии [7, 8]. После продолжительной индукции (60–72 ч) арабинозой рекомбинантный штамм продуцировал Ace в форме «сплава» с белком НР-тиоредоксином общей ММ 34 кДа, биологическая активность которого авторами не изучалась. Поэтому вопрос о полном соответствии его свойств таковому нативного Ace, продуцируемого холерными вибрионами, остался открытым.

Целью работы явилось клонирование гена *ace* в составе плазмидного вектора pQE30, обеспечивающего экспрессию чужеродных генов под контролем T5-промотора, и создание штамма *E. coli* – продуцента нативного и функционально активного белка Ace *V. cholerae*.

Материалы и методы

Донором ДНК для амплификации гена *ace* служил штамм *V. cholerae* O1 15500 биовара эльтор, содержащий неполный CTX-профаг (pre-CTX) [5].

В качестве хозяина для трансформации рекомбинантных плазмид использовали штаммы *E. coli* Jm103 (*thi*, *strA*, *endA*, *sbcB15*, *hsdR4*, $\Delta(lac-proAB)$, [F', *traD36*, *proAB*, *lacI^qZ* Δ M15]) (Pharmacia) и M15[pREP4] (NaIS, StrS, RifS, Thi-, Lac-, Ara+, Gal+, Mtl-, F-, RecA+, Uvr+, Lon+) (QIAGEN), в качестве вектора для клонирования – плазмиду pQE30 (QIAGEN).

Для культивирования штамма *E. coli* Jm103 использовали жидкую и агаризованную среду LB; для M15[pREP4] к средам добавляли 25 мг/мл канамицина, а для соответствующих рекомбинантов – дополнительно 50 мкг/мл ампициллина и 0,5 % глюкозы. В качестве индуктора использовали изопропил- β -D-тиогалактозид (ИПТГ) в конечной концентрации 1 мМ.

Хромосомную и плазмидную ДНК выделяли из клеток холерного вибриона и кишечной палочки в соответствии с общепринятыми методами [1].

Конструирование праймеров для амплификации клонируемого фрагмента ДНК и детекции гена *ace* осуществляли с помощью пакета программ Vector NTI Suit 9; синтез праймеров выполнен ООО «СибЭнзим» (Новосибирск). Амплификацию проводили на амплификаторе «Терцик МЦ-2» («ДНК-технология»). По окончании реакции смесь подвергали электрофорезу в 0,7 % агарозном геле в трис-ацетатном буфере в присутствии 0,5 мкг/мл бромистого этидия, затем просматривали в ультрафиолетовом свете, вырезали участок геля с амплифицированным фрагментом размером 311 п.н., выделяли последний элюцией, очищали смесью фенол:хлороформ:изоамиловый спирт в соотношении 25:24:1 и осаждали этиловым спиртом.

ДНК плазмиды и амплификата гена *ace* расщепляли эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI и *Hind*III (Fermentas UAB) в течение 3–4 ч в соответствующем каждому ферменту буфере. Линейную форму плазмиды и амплификат после рестрикции очищали в 0,7 % агарозном геле и лигировали с использованием ДНК-лигазы T4 (Fermentas UAB) согласно рекомендациям изготовителя. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* Jm103, приготовленные с помощью обработки хлористым кальцием [1]. Трансформанты высевали на агар LB, содержащий 50 мкг/мл ампициллина и 0,5 % глюкозы. Посевы культивировали при 37 °С в течение ночи. Отбирали ампициллинрезистентные колонии и определяли присутствие *ace* с помощью праймеров для детекции гена. Из позитивных клонов выделяли плазмидную ДНК [1], подтверждали наличие в ней вставки гена *ace* рестрикцией *Bam*HI и *Hind*III с последующим электрофорезом в агарозном геле.

Рекомбинантной плазмидой трансформировали компетентные клетки *E. coli* M15[pREP4]; полу-

ченные клоны проверяли на присутствие гена *ace* и плазмиды, как описано выше.

Для выявления способности к синтезу Ace рекомбинантный штамм *E. coli* M15[pREP4]pAce90, а также контрольный, содержащий векторную плазмиду pQE30 без вставки, выращивали в жидкой среде LB, содержащей 50 мкг/мл ампициллина, в течение 3–4 ч при 37 °С с шуттелированием при 150 об./мин и затем индуцировали 1 мМ ИПТГ в течение 1, 2, 3 и 4 ч при 37 °С с шуттелированием при 150 об./мин, клетки осаждали центрифугированием, лизировали в буфере, содержащем 65 мМ трис-HCl (pH 6,8), 1 % SDS и 10 мМ 2-меркаптоэтанола, при температуре 96 °С в течение 15 мин. Лизат подвергали электрофорезу в 16,5 % ПААГ с SDS и окрашивали гель Coomassie Blue R250 и нитратом серебра. Процентное содержание 6His-белка по отношению к суммарным клеточным белкам определяли с помощью программы Quantity One.

Для определения локализации искомого продукта осадки клеток ресуспендировали в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 8,0), содержащем 1 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF) и 2 мг/мл лизоцима, инкубировали на льду в течение 30 мин, добавляли тритон X-100 до 1 % и ДНКазу до 5 мкг/мл, продолжали инкубацию на льду в течение 10 мин, затем замораживали в жидком азоте. После размораживания разделяли растворимую и нерастворимую фракции центрифугированием, добавляли к обеим лизис-буфер, прогревали при 100 °С в течение 10 мин и исследовали в электрофорезе.

Для исследований *in vivo* использовали осветленные ультразвуковые дезинтеграторы (ОД) клеток рекомбинантного и контрольного штаммов, приготовленные как описано ранее [3], и нерастворимую фракцию, которую растворяли в 8 М мочеvine, добавляли равным объемом 10 мМ трис-HCl (pH 8,0), осветляли центрифугированием и подвергали многоступенчатому диализу с постепенным снижением концентрации мочеvine в диализном буфере. Содержание белка в препаратах определяли методом Лоури и доводили до 500 мкг/мл.

Для изучения биологической активности мышам-сосункам массой 3–4 г через задний проход вводили по 100 мкл препаратов (по 50 мкг общего белка на одно животное). Через 5 ч после введения животных умерщвляли и определяли FA (отношение массы желудка и кишечника к массе тела) [3]. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «Primer of Biostatistics» v.4.03.

Результаты и обсуждение

Схема конструирования рекомбинантной плазмиды pAce90 показана на рис. 1, из которого видно, что ПЦР-амплификат *ace* (311 п.н.) был встроен в плазмиду pQE30 по сайтам *Bam*HI-*Hind*III. Использованный нами плазмидный вектор несет ген устойчивости к ампициллину (*bla*) и содержит промоторно-операторную

область, включающую T5-промотор и два расположенных tandemом *lac*-оператора, обеспечивающих максимальную репрессию синтеза Ace в присутствии глюкозы, а также синтетический сайт связывания рибосомальной РНК, старт-кодон, последовательность триплетов, кодирующих синтез гексагистидина (6His), полилинкер (MCS) и два терминатора транскрипции (t0 фага лямбда и T1 из *rrnB*-оперона *E. coli*). Экспрессия клонированных генов происходит при индукции ИПТГ и начинается с плазмидного старт-кодона, при этом образуется гибридный белок, перед первой аминокислотой которого располагается гексагистидиновый блок (6His-tag). В ожидаемом продукте на N-конце должно было содержаться 12 дополнительных аминокислотных остатков, первые шесть из которых представляли 6His-tag.

В результате трансформации компетентных клеток *E. coli* Jm103 лигазными смесями были получены клоны, несущие рекомбинантную плазмиду, обозначенную pAce90. Гидролиз этой плазмиды *Bam*HI и *Hind*III с последующим электрофорезом в агарозном геле подтвердил наличие вставки размером 0,3 т.п.н. Рекомбинантные клоны штамма *E. coli* Jm103, однако, не выдерживали длительного хранения на питательных средах даже в присутствии глюкозы и требовали частых пересевов, вероятно, в связи с недостаточно эффективной репрессией T5-промотора и токсичностью продукта клонированного гена для *E. coli*. С целью создания более жизнеспособного продуцента мы трансформировали рекомбинантную плазмиду в штамм M15[pREP4], содержащий низ-

копийную плазмиду pREP4, обеспечивающую дополнительную репрессию T5-промотора за счет конститутивной экспрессии входящего в ее состав гена *lacI*. Действительно, трансформанты M15[pREP4] оказались более жизнеспособными по сравнению с таковыми штамма Jm103.

Для выявления способности рекомбинантов к продукции токсина мы использовали лизаты клеток штаммов *E. coli* M15[pREP4]pAce90 и M15[pREP4]pQE30 (контроль), выращенные с индукцией ИПТГ. После SDS-электрофореза в 16,5 % ПААГ и окрашивания геля нитратом серебра только в лизате штамма M15[pREP4]pAce90 была выявлена мажорная белковая полоса в области 13 кДа (отсутствующая в лизате контрольного штамма), что соответствует размеру искомого рекомбинантного белка, содержащего на N-конце гексагистидиновый блок (рис. 2, Б). На рис. 2 (А) показан тот же гель, предварительно окрашенный Coomassie Blue, в котором упомянутая полоса отсутствует. Она проявилась только после докрасивания геля нитратом серебра, что свидетельствует в пользу того, что она действительно представляет собой Ace, который, как известно, не окрашивается Coomassie Blue [11]. Его количество, по данным программы Quantity One, составило 7–10 % суммарных клеточных белков. Большая часть Ace находилась в клетках в виде телец включения, однако некоторое количество присутствовало и в растворимой фракции (рис. 2, В).

ОД рекомбинантного клона и нерастворимая фракция вызывали статистически достоверное на-

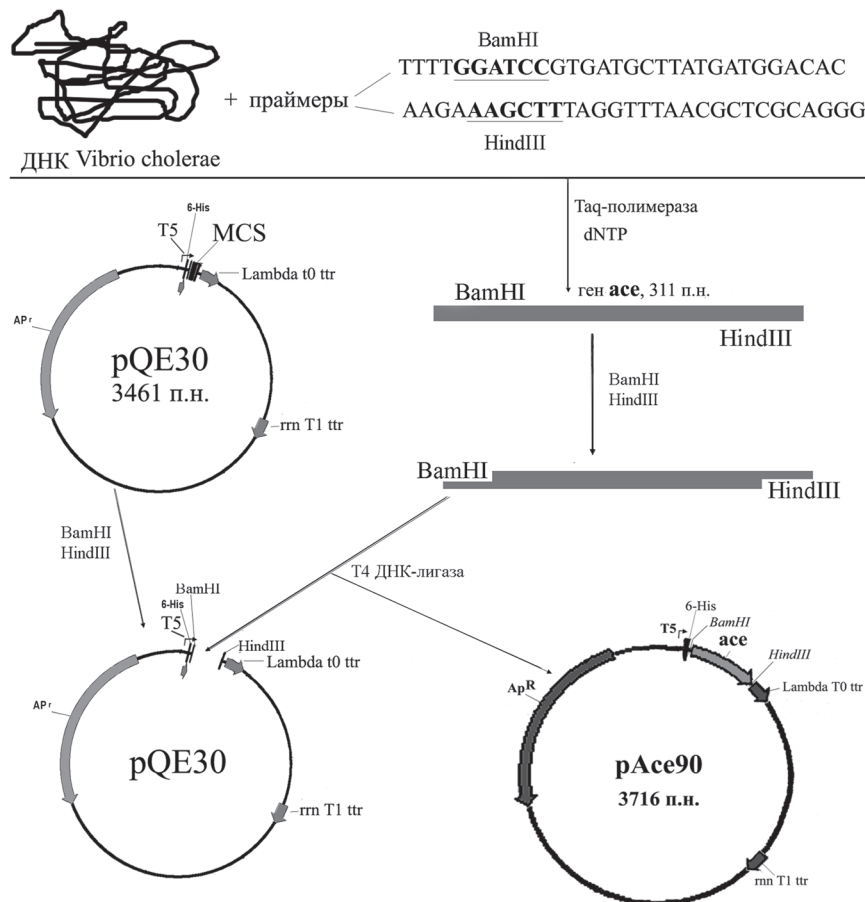


Рис. 1. Схема конструирования плазмиды pAce90

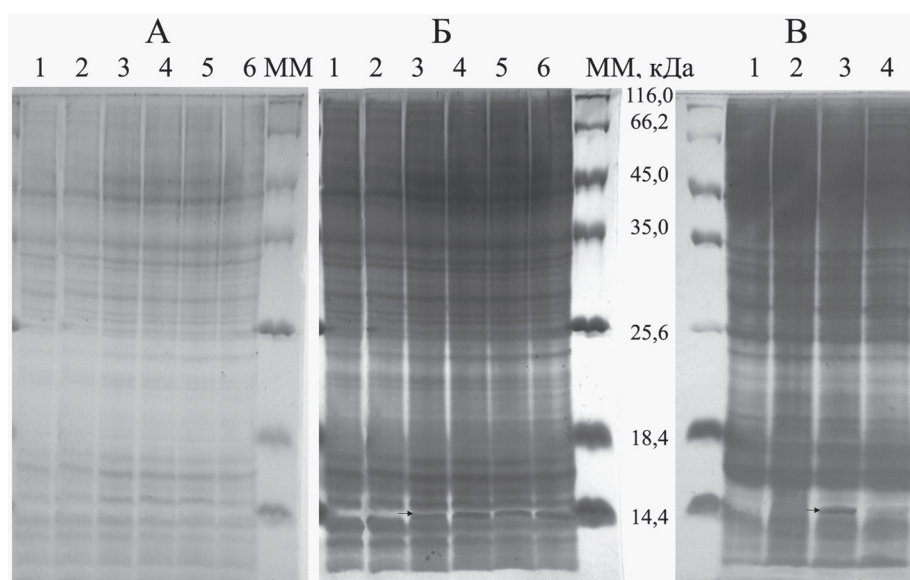


Рис. 2. SDS-электрофорез в 16,5 % ПААГ лизатов клеток (**A**, **Б**) *E. coli* M15[pREP4]pQE30, M15[pREP4]pAce90 и их растворимой и нерастворимой фракций. **A** – окраска Coomassie Blue; **Б** – тот же гель, докрашенный нитратом серебра; **В** – фракции клеток, выращенных с индукцией. Положение рекомбинантного белка Ace отмечено стрелками:

A, Б: 1 – M15[pREP4]pQE30 (контроль), 2 – M15[pREP4]pAce90 без индукции, 3, 4, 5, 6 – M15[pREP4]pAce90 с индукцией ИПТГ в течение 1, 2, 3 и 4 ч соответственно.
В: 1 – нерастворимая; 2 – растворимая фракции клеток M15[pREP4]pQE30; 3 – нерастворимая; 4 – растворимая фракции клеток M15[pREP4]pAce90

копление жидкости в кишечнике мышей-сосунков в дозе 50 мкг общего белка на одно животное (таблица). Поскольку ОД контрольного штамма не обладал такой активностью, мы сочли наиболее вероятным, что наблюдаемый эффект обусловлен именно действием Ace.

Таким образом, гибридный рекомбинантный белок Ace, несмотря на присутствие в его молекуле дополнительных аминокислотных остатков, обладает биологической активностью – способностью вызывать накопление жидкости в кишечнике мышей-сосунков.

Рекомбинантный штамм *E. coli* M15[pREP4]pAce90 депонирован в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» под номером КМ 194 и защищен патентом на изобретение [4]. Использование его в качестве продуцента Ace в перспективе позволит выделять очищенный препарат с помощью специфически связывающих 6His-белков сорбентов в целях изучения его значимости в патогенезе холеры, особенно вызываемой нехолерогенными штаммами холерных вибрионов, содержащими неполный СТХ-профаг (pre-CTX) [5]. Преимуществами предлагаемого продуцента, по сравнению с холерными вибрионами, является высокий выход искомого белка и отсутствие способности к синтезу каких-либо дополнительных токсических субстанций, которые могли бы затруднить его выделение и очистку, а по сравнению с известными рекомбинантными штаммами-продуцентами [7, 8, 10] – непродолжительный период наращивания биомассы (4–6 ч, включая индукцию), что обеспечивает возможность ускоренного получения токсина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Манниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии: Молекулярное клонирование. М.: Мир; 1984. 480 с.
2. Монахова Е.В., Ломов Ю.М., Михась Н.К., Писанов Р.В. Структура и изменчивость неполного СТХ-элемента холерных вибрионов. Пробл. особо опасных инф. 2007; 1(93):58–61.
3. Монахова Е.В., Ломов Ю.М., Писанов Р.В., Алексеева Л.П., Маркина О.В., Миронова А.В. и др. Клонирование гена цитотонического фактора Cef (CHO-cell elongating factor) *Vibrio cholerae* в *Escherichia coli* и его экспрессия под контролем P_{BAD} -

промотора. Биотехнология. 2005; 5:12–8.

4. Монахова Е.В., Ломов Ю.М., Писанов Р.В., Веркина Л.М., Миронова А.В. Рекомбинантная плазмида, экспрессирующая клонированный ген ace *Vibrio cholerae*, и штамм *Escherichia coli* – продуцент accessory cholera enterotoxin *Vibrio cholerae*. Патент РФ № 2313576, опубл. 27.12.2007.
5. Монахова Е.В., Миронова А.В., Алексеева Л.П., Мазрухо А.Б. Изучение вирулентности холерных вибрионов, содержащих pre-CTXφ: генотипическая и фенотипическая характеристика. Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол. 2008; 4:27–32.
6. Faruque S.M., Albert M.J., Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998; 62:1301–14.
7. Somarany W.M., Mariana N.S., Neela V., Rozita R., Raha A.R. Optimization of parameters for accessory cholera enterotoxin (Ace) protein expression. J. Med. Sci. 2002; 2:74–6.
8. Somarany W.M., Mariana N.S., Rozita R., Raha A.R. Cloning and expression of *Vibrio cholerae* virulence gene, accessory cholera enterotoxin (ace). Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 2004; 35:856–62.
9. Trucksis M., Conn T.L., Wasserman S.S., Sears C.L. *Vibrio cholerae* ACE stimulates Ca^{2+} -dependent Cl^{-}/HCO_3^{-} secretion in T84 cells in vitro. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2000; 279:567–77.
10. Trucksis M., Conn T.L., Fasano A., Kaper J.B. Production of *Vibrio cholerae* accessory cholera enterotoxin (Ace) in the yeast *Pichia pastoris*. Infect. Immun. 1997; 65:4984–8.
11. Trucksis M., Galen G.E., Michalski J., Fasano A., Kaper J.B. Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *V. cholerae* virulence cassette. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993; 90:5267–71.
12. Waldor M.K., Mekalanos J.J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. Science. 1996; 272:1910–4.

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

1. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook G. [Methods of Genetic Engineering. Molecular Cloning]. M.: Mir; 1964. 479 p.
2. Monakhova E.V., Lomov Yu.M., Mikhas' N.K., Pisanov R.V. [Structure and variability of the deficient CTX-element of the cholera vibrios]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2007; 93:58–61.
3. Monakhova E.V., Lomov Yu.M., Pisanov R.V., Alekseeva L.P., Markina O.V., Mironova A.V. et al. [Cloning of the *Vibrio cholerae* CHO-cell elongating factor under control of PBAD promoter]. Biotechnologia. 2006; 5:12–18.
4. Monakhova E.V., Lomov Yu.M., Pisanov R.V., Verkina L.M., Markina O.V., Mironova A.V. [Recombinant plasmid expressing the cloned ace gene of *Vibrio cholerae*, and *Escherichia coli* strain – the producer of accessory cholera enterotoxin of *Vibrio cholerae*]. RF Patent № 2313576.
5. Monakhova E.V., Mironova A.V., Alekseeva L.P., Mazrukho A.B. [The study of pre-CTXφ carrying *Vibrio cholerae* virulence: genotypic and phenotypic characteristics]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2008; 4:27–32.

Authors:

Monakhova E.V., Pisanov R.V., Verkina L.M., Mironova A.V. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russia. E-mail: plague@aanet.ru

Об авторах:

Монахова Е.В., Писанов Р.В., Веркина Л.М., Миронова А.В. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aanet.ru

Поступила 17.02.11.

М.В.Овчинникова, Г.И.Коровкина, И.В.Грачева, Т.В.Аленкина

ЛИЗОГЕННАЯ СИСТЕМА НЕЭПИДЕМИЧЕСКИХ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ БИОВАРА ЭЛЬТОР, РЕЗИСТЕНТНЫХ К ДИАГНОСТИЧЕСКОМУ БАКТЕРИОФАГУ СТХ⁻

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

Изучены эпидемически неопасные штаммы *V. cholerae* O1 биовара эльтор из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб», которые на момент выделения были не чувствительны к бактериофагу диагностическому холерному эльтор ctx^- . Приведены результаты изучения одной из причин фагорезистентности данных культур с помощью специализированной тест-системы, состоящей из индикаторных штаммов. Выявлено носительство умеренных фагов в 88,0 % исследуемых культур.

Ключевые слова: неэпидемические холерные вибрионы эльтор, лизогения, умеренные фаги, индикаторные штаммы.

M.V.Ovchinnikova, G.I.Korovkina, I.V.Gracheva, T.V.Alenkina

Lysogenic System of Non-Epidemic Cholera Vibrio El Tor, Resistant to Diagnostic Bacteriophage CTX⁻

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Studied are non-epidemic strains of *V. cholerae* O1 biovar El Tor taken from the National collection of pathogenic bacteria lodged at the Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", which were not sensible to diagnostic cholera bacteriophage El Tor ctx^- at the time of isolation. Represented are the results of investigation regarding a cause of a phage-resistance of these cultures using specialized test-system consisting of indicator strains. Identified is the carriage of temperate phages among 88,0 % of the cultures examined.

Key words: non-epidemic cholera vibrios El Tor, lysogenicity, temperate phage, indicator strains.

За последние годы на территории Российской Федерации и в некоторых государствах СНГ из различных объектов внешней среды периодически выделяются эпидемически неопасные штаммы холерных вибрионов, у которых, по данным генетических исследований, отсутствует ген холерного токсина ctx АВ. В то же время неэпидемичность этих штаммов не подтверждается чувствительностью к диагностическому бактериофагу ctx^- .

Значение показателя специфической активности фага ctx^- зависит от места выделения культур, что, по мнению многих исследователей, может быть связано с индивидуальными особенностями штаммов, циркулирующих на различных территориях, наличием у них группо- и штаммоспецифических систем рестрикции-модификации, гомоиммунных умеренных фагов и другими факторами [1].

Умеренные фаги, тесно связаны с диссоциацией бактерий. Накопление умеренного фага в культуре приводит к изменению клеточного состава микробной популяции в сторону увеличения в ней доли шероховатых и других измененных форм, обладающих фагорезистентностью в силу различных причин [4, 5, 6, 7].

Цель работы – выявление у холерных вибрионов биовара эльтор носительства гомоиммунных умеренных фагов с помощью специализированной индикаторной системы.

Материалы и методы

Изучено 70 штаммов *V. cholerae* eltor из Государственной коллекции патогенных бактерий

РосНИПЧИ «Микроб», выделенных в различных регионах Российской Федерации из объектов внешней среды за период с 1992 по 2009 год. По паспортным данным, указанные штаммы не содержали ген CTX АВ и имели разный статус чувствительности к диагностическому бактериофагу ctx^- . В опыт по определению умеренных фагов в культуре были отобраны 25 фагоустойчивых штаммов *V. cholerae* eltor с типичными свойствами (таблица).

Изучение культуральных, морфологических, биохимических, серологических свойств тестируемых штаммов проводили по общепринятым методикам, изложенным в [2]. Посевы культур осуществляли на жидких и плотных питательных средах: 1 % пептонная вода и бульон Мартена, с содержанием пептона 2,2 %; 2 % агар Мартена, с содержанием аминного азота 80–90 г/л, рН всех сред составлял $7,6 \pm 0,1$.

Для проведения исследований использовали фаг ctx^- из комплекта коммерческого препарата «Бактериофаги диагностические холерные эльтор ctx^+ и ctx^- , раствор для диагностических целей» сер. 16.

Пробу с фагом ctx^- ставили методом агаровых слоев по Грациа. После застывания агара с культурой на его поверхность бактериологической петлей наносили каплю фага ctx^- , чашки инкубировали 18–20 ч при температуре 37 °С. За положительный результат принимали любую степень лизиса. Определение лизогенности штаммов холерных вибрионов проводили в агаровой культуре. Для этого 24-часовую агаровую культуру исследуемого штамма петлей наносили на газон индикаторного штамма в слое мягкого агара. На одной чашке Петри испытывали 10 штаммов. Через 18–20 ч инкубирования при температуре 37 °С

Краткая биохимическая характеристика фагорезистентных штаммов *V. cholerae* eltor, выделенных из объектов внешней среды

Штамм	Место выделения	Гемолиз по Грейгу	Чувствительность к фагу ctx*	Наличие гомоиммунного умеренного фага
M-1280	Астрахань	+	-	+
M-1337	Астрахань	+	-	+
M-1427	Астрахань	+	-	+
M-1414	Республика Калмыкия	Неполный гемолиз	-	-
M-1433	Республика Калмыкия	Неполный гемолиз	-	+
M-1443	Республика Калмыкия	+	±	+
122	Республика Калмыкия	+	-	+
M-1417	Пенза	+	-	+
M-1419	Пермь	+	-	+
M-1315	Пермь	Неполный гемолиз	-	+
M-1418	Пермь	+	-	+
M-1425	Пермь	+	+	+
M-1388	Саратов	+	±	+
M-1438	Самара	+	-	+
M-1383	Республика Татарстан	+	±	+
M-1332	Челябинск	Неполный гемолиз	-	+
M-1385	Астраханская обл.	+	±	+
M-1379	Республика Татарстан	+	-	+
M-1314	Республика Калмыкия	+	-	-
M-1432	Республика Калмыкия	+	±	+
M-1434	Республика Калмыкия	+	-	-
M-1444	Республика Калмыкия	+	-	+
95	Республика Калмыкия	+	-	+
M-1334	Курган	+	-	+
M-1426	Пермская обл.	+	-	+

Примечание: * – проба с фагом ctx⁻; «-» – отрицательная, «±» – единичные негативные колонии или мутное литическое пятно, «+» – положительная.

на месте нанесения исследуемых штаммов формировались крупные колонии холерных вибрионов. При наличии в них умеренного фага вокруг колонии появлялась полупрозрачная зона лизиса за счет подавления фагом роста соответствующего индикаторного штамма. При отсутствии фага в тестируемых культурах, вокруг колоний наблюдался равномерный рост индикаторного штамма.

Результаты и обсуждение

Согласно методическим указаниям «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней» 4.2.2870-11 схема идентификации типичных культур *V. cholerae* O1 биовара эльтор включает оценку эпидзначимости холерных вибрионов по чувствительности к бактериофагам диагностическим холерным эльтор ctx⁺ и ctx⁻ и гемолитической активности по Грейгу.

Исследуемые культуры по различному статусу чувствительности к диагностическому бактериофагу ctx⁻, были разделены на три группы: чувствительные; слабочувствительные; фагорезистентные.

Следует отметить, что культуры, отнесенные к группам 2 и 3, по схеме оценки эпидзначимости штаммов *V. cholerae* eltor, указанной в инструкции по применению, бактериофагов, определялись как эпидемически неопасные и не требовали дополнительных исследований по обнаружению гена холерного токсина.

В ходе работы было обнаружено, что основное

количество изучаемых культур характеризовались типичными для холерных вибрионов культуральными, морфологическими, биохимическими и серологическими свойствами. Штаммы, отнесенные к группе фагочувствительных культур (группа 1), были стабильны по изученным свойствам и проявили высокую чувствительность к фагу ctx⁻.

Из всего числа изученных культур, входивших в группу фагорезистентных (группа 3) и слабочувствительных (группа 2), 5 штаммов (7 %) проявили нехарактерные для *V. cholerae* O1 биовара эльтор биохимические свойства – не ферментировали маннозу, декарбоскилировали аргинин, отмечался слабый рост в среде с полимиксином; 3 штамма (4,2 %) проявили нетипичную реакцию Фогэс-Проскауэра при типичных характерных биохимических свойствах. Известно, что атипичные формы холерных вибрионов значительно чаще встречаются среди культур, несущих умеренные фаги. На основании этого данные штаммы были исключены из дальнейших исследований. Интерес представляли культуры с характерными для холерных вибрионов свойствами.

Различные условия хранения и культивирования могут приводить к изменению соотношения фагорезистентных и фагочувствительных клеток в составе популяции и оказывать влияние на результат взаимодействия системы фаг-бактерия. В целях повышения или восстановления фаголизательности исследуемых культур, после проведения многократных пассажей на обогащенных по солевому составу питательных средах, удалось восстановить фагочувствительность

у 1 штамма из группы 3 и повысить фаголизабельность у 8 штаммов из группы 2, что составило 0,7 и 11,5 % соответственно.

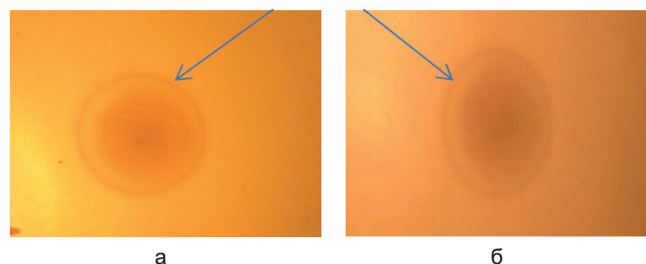
Специфический исход системы взаимодействия фаг-бактерия, на котором базируется фагодиагностика, контролируется наличием гомологии зон рецепции фага и клетки, наличием и соответствующей функциональной активностью у бактерии ферментативных систем, синтезирующих элементы паразита под контролем фаговой ДНК, существованием у клетки систем рестрикции-модификации различной специфичности.

Известно, что неэпидемические холерные вибрионы эльтор являются носителями умеренных фагов не менее трех серотипов – II, XI, XII (по отечественной классификации), которые по типу иммунитета представляют 11 иммунотипов. Тип фага является основной таксономической единицей внутри вида холерных фагов, который определяется строгой серологической специфичностью и характером литической активности в отношении биоваров и диссоциативных форм возбудителя холеры [2, 3]. Из этого следует, что различные внутривидовые группы холерных вибрионов являются носителями фагов определенных и строго специфичных для них иммунных типов, являющихся их генетической меткой. На этом основано применение метода профаготипирования, для дифференциации холерных вибрионов на биовары, классических вибрионов – на фаготипы, вибрионов эльтор – на эпидемические и неэпидемические. Для этих целей разработаны специализированные тест-системы, состоящие из индикаторных штаммов, обладающих специфической чувствительностью к умеренным фагам исследуемых культур [3].

Для определения умеренного фага в популяции фагорезистентных клеток использовали специализированную тест-систему [2, 3], предназначенную для выявления умеренных фагов неэпидемических холерных вибрионов биовара эльтор, состоящую из двух индикаторных штаммов *V. cholerae* eltor 379 и *V. cholerae* eltor 485, депонированных в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» под номерами КМ-12 и КМ-21 соответственно. Обнаружение умеренного фага достигается за счет высокой чувствительности каждой входящей в состав индикаторной системы тест-культуры к строго определенным группам умеренных фагов (III, V, VI иммунотипов) и резистентностью к фагам всех остальных групп.

При исследовании 25 культур фагорезистентных вибрионов с типичными морфологическими и биохимическими свойствами с помощью индикаторной тест-системы для определения лизогенности штаммов холерных вибрионов было обнаружено носительство умеренного фага у 22 штаммов, что составило 88 % из числа изученных культур. Реакция характеризовалась появлением полупрозрачной зоны лизиса вокруг выросших колоний испытуемых микроорганизмов (рисунок).

Таким образом, в результате проведенных исследований у изученных культур неэпидемических хо-



Полупрозрачная зона лизиса на газоне индикаторного штамма *V. cholerae* eltor 479 вокруг колоний изучаемых культур:

а – *V. cholerae* eltor M-1434; б – *V. cholerae* eltor M-1444

лерных вибрионов биовара эльтор выявлено лизогенное состояние, характеризующееся носительством гомоиммунного умеренного фага, что явилось причиной возникновения фагоустойчивых вариантов холерных вибрионов к бактериофагу *ctx*⁺. Дальнейшее более глубокое изучение явления лизогенности фагорезистентных культур может позволить адаптировать бактериофаг *ctx*⁺ к фагоустойчивым вариантам холерных вибрионов с целью повышения специфической активности данного препарата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д. и др. Фаги галофильных вибрионов и их применение. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1992; 9–10:5–7.
2. Мороз В.П., Остроумова Н.М., Коровкина Г.И. Штамм *V. cholerae* eltor 379, используемый для идентификации и диагностики холерных умеренных фагов тип 180. А.с. SU 1257087, опубл. 15.09.86.
3. Остроумова Н.М., Грачева И.В., Мороз В.П., Коровкина Г.И. Способ дифференциации эпидемических и неэпидемических холерных вибрионов эльтор, несущих гомоиммунные умеренные фаги III гетероиммунной категории. А.с. SU 1558987, опубл. 23.04.90.
4. Подосинникова Л.С., Либинзон А.Е., Шмеркевич Д.Л., Марамович А.С. О возможности реверсии вирулентности у холерных вибрионов. Микробиол. журн. 1983; 45(1):50–3.
5. Смирнова Н.И. Генетический контроль патогенности *V. cholerae*: умеренный нитевидный фаг CTX, кодирующий токсин и «остров патогенности». Мол. генет. 1999; 4:3–11.
6. Basu S., Ghosh R.K. Identification and characterization of phage PS166 lysogens from non-O1, O139 strains of *Vibrio cholerae*. Med. Sci. Monit. 2009; 15(10):BR281–288.
7. Beilstein F., Dreiseikelmann B. Temperate bacteriophage PhiO18P from an *Aeromonas media* isolate: characterization and complete genome sequence. Virology. 2008; 373(1):25–9.

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

1. Kudryakova T.A., Makedonova L.D. et al. [Phages of halophilic vibrios and their application]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1992; 9–10:5–7.
2. Moroz V.P., Ostroumova N.M., Korovkina G.I. [The strain *V. cholerae* eltor 379 used for identification and diagnostics of cholera moderate phages, type 180]. A.s. SU 1257087.
3. Ostroumova N.M., Gracheva I.V., Moroz V.P., Korovkina G.I. [Method of differentiation between epidemic and non-epidemic cholera vibrios El Tor, which carry homoimmune moderate phages belonging to III heteroimmune category]. A.s. SU 1558987.
4. Podosinnikova L.S., Libinon A.E., Shmerkevich D.L., Maramovich A.S. [Regarding the possibility of virulence reversion in cholera vibrios]. Mikrobiol. Zh. 1983; 45(1):50–3.
5. Smirnova N.I. [Genetic control of *V. cholerae* pathogenicity: moderate filamentous phage CTX, encoding toxin and “pathogenicity island”]. Mol. Gen. 1999; 4:3–11.

Authors:

Ovchinnikova M.V., Korovkina G.I., Gracheva I.V., Alenina T.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

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

Поступила 25.04.11.

УДК 616.982.27+616.982.27-039:616-07

**В.А.Антонов, В.И.Илюхин, Н.П.Храпова, Е.В.Прохватилова, Д.В.Викторов, Т.В.Сенина,
А.А.Будченко, Г.А.Ткаченко, В.В.Алексеева, И.Б.Захарова, С.С.Савченко, О.В.Зинченко,
Ю.И.Сорокина, В.В.Алексеев**

**СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ДИАГНОСТИКЕ САПА И МЕЛИОИДОЗА.
ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ТИПИРОВАНИЕ *BURKHOLDERIA MALLEI*
И *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI***

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград

Проанализированы методические подходы, используемые для идентификации и типирования *B. mallei* и *B. pseudomallei*, предложены рекомендации по совершенствованию алгоритмов лабораторной диагностики сапа и мелиоидоза с учетом широкого спектра биохимических, иммунодиагностических и молекулярно-генетических тестов.

Ключевые слова: сап, мелиоидоз, генетическое типирование, диагностика, полимеразная цепная реакция.

**V.A.Antonov, V.I.Ilyukhin, N.P.Khrapova, E.V.Prokhvatilova, D.V.Viktorov, T.V.Senina, A.A.Budchenko,
G.A.Tkachenko, V.V.Alekseeva, I.B.Zakharova, S.S.Savchenko, O.V.Zinchenko, Yu.I.Sorokina, V.V.Alekseev**

**Modern Approaches for Detection of Glanders and Melioidosis. Identification and Typing
of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei***

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd

Analysed are the methodological approaches used for identification and typing of *B. mallei* and *B. pseudomallei*. Suggested are recommendations for improvements of algorithms of laboratory diagnosis of glanders and melioidosis including wide range of biochemical, immunodiagnostic and molecular genetic methods.

Key words: glanders, melioidosis, genetic typing, diagnostic, polymerase chain reaction.

Возбудители сапа и мелиоидоза относятся к β -подклассу протеобактерий, семейству *Burkholderiaceae*, роду *Burkholderia*. В настоящее время род *Burkholderia* включает более 50 видов микроорганизмов и представляет собой довольно гетерогенную таксономическую группу, объединяющую сапрофиты, фитопатогены и патогены теплокровных животных. К возбудителям особо опасных инфекций относятся два вида – *B. pseudomallei* и *B. mallei*, мелиоидозный и сапной микроб соответственно.

Мелиоидоз эндемичен для влажных тропических и субтропических регионов Юго-Восточной Азии, Северной Австралии, Западной Африки и Латинской Америки. Довольно большое число sporadических случаев заболевания, связанных с заносом из эндемичных регионов, в последнее время отмечено для ряда стран умеренного климатического пояса [11]. Летальность при септической и легочной форме мелиоидоза превышает 90 %. Несмотря на использование для лечения самых современных препаратов, смертность составляет более 40 %.

Сапной микроб *B. mallei* вызывает тяжелое инфекционное заболевание у человека и довольно широкого круга животных. Описанные случаи внутрилабораторного заражения человека свидетельствуют о его довольно высокой видовой чувствительности к этому возбудителю. Возбудитель сапа патогенен для непарнокопытных животных (лошадей, мулов,

ослов), кошек, собак, морских свинок и мышей. В экспериментальных условиях наиболее чувствительными к сапу животными являются кошки, золотистые хомячки и морские свинки. Кролики мало восприимчивы к сапу. Белые мыши и крысы – высокорезистентны [4]. В связи с уменьшением численности лошадей, являющихся основным резервуаром этой инфекции, сегодня в мире проблема сапа не стоит так остро, как ранее, однако сап по-прежнему наносит значительный экономический урон в животноводческих хозяйствах, практикующих разведение и использование непарнокопытных животных [17].

В России последние вспышки сапа были зарегистрированы в период второй мировой войны. На территории СССР сап считался полностью ликвидированным. В настоящее время это заболевание в России официально не регистрируется, однако вероятность заноса этой инфекции не может быть полностью исключена ввиду того, что возбудитель ее постоянно циркулирует в ряде сопредельных стран (Монголия, Турция, Иран и др.) [4].

Вид *B. mallei* отличается высокой генетической и фенотипической мономорфностью, внутри вида не существует общепризнанного подразделения на биовары и подтипы. Высокая близость геномов сапа и мелиоидоза, объединение штаммов возбудителя сапа в единый сиквенс-тип, входящий в клональный комплекс со штаммами возбудителя мелиоидоза, позво-

лили сделать предположение, что *B. mallei* является клоном *B. pseudomallei*, хотя на уровне экологии и эпидемиологии возбудители сапа и мелиоидоза – различные виды микроорганизмов, отличающиеся по микробиологическим свойствам [16].

На сегодняшний день можно констатировать, что существующие методы обнаружения патогенных буркхольдерий оказываются недостаточно эффективными для экспресс-диагностики, а идентификация возбудителей сапа и мелиоидоза по-прежнему является трудоемкой задачей.

До внедрения в лабораторную практику полуавтоматических и автоматических систем типа API, Vitek, а также генетических методов с применением ПЦР лабораторная диагностика и идентификация культур *B. pseudomallei* и *B. mallei* основывалась, главным образом, на изучении культурально-морфологических и биохимических свойств микроорганизмов [6, 15]. Установление принадлежности к большой группе так называемых неферментирующих глюкозу грамотрицательных бактерий (ГНФ) позволяло проводить дальнейшую идентификацию, используя простые, вполне доступные по набору тестов идентификационные ключи [46, 49].

Для дифференциации от фенотипически сходных микроорганизмов осуществляется дополнительная постановка 20–30 тестов [15, 32]. Принципиальное значение придается исследованию окисления моно- и дисахаридов, оксидазной, декарбоксилазной, желатиназной активности, гидролизу эскулина, определению бета-галактозидазы (ONPG), наличия гемолизина, ДНК-азы и способности к росту при 42 °С.

Современная идентификация бактерий рода *Burkholderia* является многоэтапной и относится к тем случаям, где необходима комбинация методов определения фенотипических и генотипических признаков, то есть использования полифазного таксономического подхода [46, 47, 49]. Так, при работе с микроорганизмами комплекса *B. ceracia* полуавтоматические системы не позволяют идентифицировать изоляты до вида (геномвара). При определении видовой принадлежности этих микроорганизмов достаточно часто возникают ошибки их дифференциации от *B. pseudomallei* [19, 23].

Тактика обнаружения, идентификации и внутривидового типирования патогенных микроорганизмов предусматривает применение ряда иммунодиагностических тестов с использованием моноклональных антител (МКА). В практической работе для экспресс-ускоренного выявления и последующей идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза чаще всего используют метод флуоресцирующих антител (МФА), реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА), твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА), реакцию двойной иммунодиффузии (РДД), иммуноблоттинг [8, 35]. В качестве дополнительного метода дифференциации патогенных и непатогенных буркхольдерий целесообразно использовать реакцию двойной иммунодиффузии с применением преципитирующих МКА заданной специфичности. Перспективной тенденцией совершенствования лабораторной диагностики сапа и

мелиоидоза считают сочетанное применение двух методов: ПЦР и ТИФА на основе МКА.

Из фенотипических методов известное значение имеет анализ белков в полиакриламидном геле-электрофорезе с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE). С применением компьютерных программ для анализа электрофореграмм этот метод позволяет не только разграничивать штаммы *B. pseudomallei* и *B. mallei* от буркхольдерий других видов, но и отражать внутривидовые особенности штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза [2].

Опыт зарубежных исследователей свидетельствует, что молекулярно-биологические методы обнаружения патогенных буркхольдерий целесообразно включать в качестве подтверждающих тестов в схему лабораторной диагностики при положительных находках в полуавтоматических системах идентификации [19].

Молекулярно-генетические подходы в настоящее время стали занимать главенствующее место и при типировании возбудителей сапа и мелиоидоза [10, 39, 40]. Такие методы, как гель-электрофорез в пульсирующем электрическом поле, различные варианты полимеразной цепной реакции и мультилокусного секвенирования, были использованы для внутривидовой дифференциации штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, выделенных из внешней среды, от животных и человека [17, 44], расшифровке вспышек инфекций [12] и оценке эффективности проводимой антибиотикотерапии [24, 45]. Применение автоматических секвенаторов и методологии биочипов позволило вплотную подойти к экспрессному секвенированию полного генома микроорганизмов [18, 21, 26]. Информация, полученная при секвенировании геномов патогенных буркхольдерий, может быть использована для разработки быстрых и точных методов диагностики и дифференциации возбудителей сапа и мелиоидоза от близкородственных микроорганизмов, а также для внутривидового типирования этих патогенов [20]. Поскольку секвенирование полного генома в лабораторных условиях является трудоемким и дорогостоящим методом, а методы ускоренной расшифровки полноразмерных геномов в настоящее время недоступны, гораздо больший интерес представляет выявление отдельных генетических локусов (размером 500–950 н.п.), анализ которых позволит решить поставленные перед исследователем задачи. Так, изучение наиболее консервативных последовательностей дает возможность устанавливать степень родства на уровне семейств, родов и видов, и как следствие – проводить идентификацию возбудителя инфекционного заболевания. Проведение дифференциации близкородственных микроорганизмов и внутривидовое разграничение может осуществляться при сопоставлении переменных последовательностей генома.

В последние годы наиболее предпочтительным методом идентификации буркхольдерий в хорошо оснащенных клинических лабораториях является полимеразная цепная реакция (ПЦР), в том числе с флуоресцентной детекцией [38, 47]. Специфическая флуоресцентная гибридизация в процессе амплифи-

кации может регистрироваться детектором флуоресценции как по окончании реакции, так и в режиме реального времени [40, 41].

Применение ПЦР в условиях ускоренной идентификации предусматривает обнаружение патогенных биологических агентов в любом биологическом материале и объектах окружающей среды как при работе с нативными пробами, так и после биологического накопления на питательных средах и в органах биопробных животных. В качестве ДНК мишеней были рекомендованы гены *16S pPHK* [13], *23S pPHK* [27], спейсерные области *16-23S pPHK* [25], кластер генов *LPS*, кодирующий капсульный липополисахарид [34], гены системы III типа секреции (*TTS1*) [29, 33, 50], флагеллярный ген [36]. В большинстве работ использовался ПЦР-анализ с электрофоретической детекцией.

ПЦР в режиме реального времени показала более высокую чувствительность, специфичность и быстроту в использовании по сравнению со стандартной ПЦР. R. Novak *et al.* [31], продолжая исследования предыдущих авторов, используя в качестве мишени *orf2* из кластера генов III типа секреции (*TTS1*), описали метод ПЦР в режиме реального времени, который со 100 % специфичностью детектировал чистые культуры штаммов *B. pseudomallei*. Позже эти праймеры и флуоресцентные зонды были апробированы на клинических образцах мокроты, мочи, крови, а также в мазках гноя и ран [29]. На основе гена *TTS1* M. Kaestli *et al.* [22] была сконструирована тест-система в режиме реального времени, позволявшая детектировать *B. pseudomallei* в образцах почвы. Разработкой праймеров для TaqMan зондов на основе генов, детерминирующих *16S pPHK* и флагеллин, занимались H. Tomaso *et al.* [41] и гена *IpxO* – A. Merritt *et al.* [28]. В работе F. M. Thibault *et al.* [40] исследователи использовали праймеры и гидролизующие зонды (TaqMan), сконструированные на основе кластеров генов *TTS1* и *TTS2*. H. Tomaso *et al.* [41] впервые удалось дифференцировать *B. mallei* от *B. pseudomallei* и других гетерологичных микроорганизмов, создав ПЦР-тест-систему в режиме реального времени, сконструированную на основе последовательности *fliP*. Для специфической детекции *B. mallei* были сконструированы тест-системы на основе гена *bimA* (*Burkholderia intracellular motility A*), который кодирует белок, участвующий в полимеризации актина [42, 43]. Авторы другого исследования с помощью технологии TaqMan разработали тест-системы, которые детектировали два новых гена, кодирующих гипотетические белки, уникальные для *B. pseudomallei* (GenBank A0179 и A1189) [37]. С помощью этих тест-систем детектировали *B. pseudomallei* в образцах крови от больных септицемией. Используя технологию «молекулярных маячков», была разработана тест-система на основе консервативных последовательностей генов «домашнего хозяйства» *narK* и *gltB*. ПЦР-продукт *narK* детектировался при исследовании *B. mallei*, *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*, но отсутствовал у других видов *Burkholderia*. Амплификация *gltB* происходила при обнаружении всех штаммов *Burkholderia* за исключением

Burkholderia phenazinium и *Ralstonia metallidurans*. Для дифференциации между *B. mallei* и *B. pseudomallei* в данных последовательностях генов были выбраны единичные нуклеотидные замены [48].

Для идентификации патогенных буркхольдерий нами разработаны амплификационные тест-системы на основе нуклеотидных последовательностей генов *23S pPHK*, III типа секреции (*TTS I*) и флагеллярного гена *fliC* как в формате электрофорезной, так и флуоресцентной детекции, в том числе в формате реального времени [1, 7, 9]. Высокая специфичность и чувствительность данных тест-систем позволили нам рекомендовать их использование в алгоритме лабораторной диагностики сапа и мелиоидоза, а также при идентификации патогенных буркхольдерий по таксономическим признакам и эпидемической значимости. Причем использование двух ДНК мишеней – участков *16S pPHK* и *23S pPHK*, *orf13* или *fliC*, при сочетании ПЦР и секвенирования позволяет повысить достоверность ПЦР-диагностики и ускорить идентификацию *B. mallei* и *B. pseudomallei* и их дифференциацию от близкородственных видов микроорганизмов.

Проведенные исследования геномной организации различных штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза на основе секвенирования их полных геномов позволяют определять ДНК-маркеры, с которыми можно проводить сравнение остальных штаммов и изолятов, определять консервативные и варьируемые последовательности для идентификации и внутривидовой дифференциации штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei* [18, 30]. Аннотированные сиквенсы геномов патогенных буркхольдерий представлены на веб-серверах (<http://www.tigr.org>) и (<http://www.sanger.ac.uk>). На основе анализа литературных данных [10, 11, 14, 16, 44] и результатов собственных исследований нами показано, что для дифференциации штаммов возбудителя мелиоидоза эффективны методы пульс-электрофореза и мультилокусного сиквенс-типирования (MLST), амплификации полиморфной ДНК с произвольными праймерами (RAPD), анализ количества варьируемых tandemных повторов (VNTR-анализ), Rep-ПЦР и схема типирования на основе варьируемых ампликонов (VAT). Из методов генотипирования для штаммов *B. mallei* применим макрорестрикционный анализ ДНК в формате пульс-электрофореза, VNTR-анализ, амплификация с произвольными праймерами и анализ варьируемых ампликонов.

Разработка методов идентификации и типирования штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза, основанных на изучении их генетического полиморфизма, должна обеспечить возможность быстрого выявления генетических особенностей штаммов с целью определения их происхождения и связи с определенными эколого-эпидемическими районами. Более перспективным представляется использование в качестве маркерных систем полиморфных нуклеотидных последовательностей ДНК, включая различные tandemные повторы и варьируемые ампликоны.

В принципе, все данные фено- и генотипических методов, а также результаты филогенетических ис-

следований могут быть включены в расширенную схему идентификации и типирования, опирающуюся на принципы полифазной таксономии. Таких методов множество, но выбор оптимального сочетания наиболее эффективных подходов и формирование универсального алгоритма является актуальным для любых микроорганизмов, в том числе возбудителей сапа и мелиоидоза. Это обстоятельство определяет актуальность дальнейших исследований, направленных на совершенствование схем идентификации и внутривидовой дифференциации штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза. Важная роль в обеспечении этих исследований отводится созданному на базе ФКУЗ ВолгоградНИПЧИ Роспотребнадзора Референс-центру по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза, в задачи которого входит изучение биологических, молекулярно-генетических и биохимических свойств *B. mallei* и *B. pseudomallei*, в том числе штаммов с атипичными свойствами, анализ эффективности создаваемых диагностических препаратов и разработка идентификационных тестов и методов внутривидовой дифференциации штаммов патогенных буркхольдерий.

В Волгоградском научно-исследовательском противочумном институте имеется коллекция штаммов *B. mallei*, *B. pseudomallei* и близкородственных буркхольдерий – *B. thailandensis* и *B. ceracia*, выделенных в различных географических регионах. Сконструированные амплификационные тест-системы для идентификации патогенных буркхольдерий прошли внутриинститутские и приемотехнические испытания.

Проведен сравнительный анализ хромосом патогенных буркхольдерий с учетом их блочной реорганизации, получена и охарактеризована полная библиотека вариабельных фрагментов *B. mallei* и *B. pseudomallei*, которая может быть использована в качестве ДНК-маркеров при создании высокоэффективных систем внутривидового типирования возбудителей сапа и мелиоидоза.

Апробированы методы типирования штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei* с использованием производных праймеров (RAPD), рестрикционный анализ хромосомной ДНК (RFLP), в том числе пульс-электрофорез, VNTR-анализ и ПЦР-типирование на основе вариабельных ампликонов, ДНК-ДНК гибридизация, сравнительный анализ плазмидных профилей и белковых спектров. Создан банк перевиваемых линий гибридом-продуцентов МКА к антигенам *B. pseudomallei* и *B. mallei*, экспонированным на поверхности бактериальных клеток, что позволяет использовать индивидуальные образцы или их смеси для идентификации данных патогенов и их дифференциации от непатогенных представителей рода *Burkholderia*. В институте на постоянной основе осуществляется производство лиофилизированных препаратов для МФА в объемах, удовлетворяющих запросы медицинской службы ГО и учреждений Роспотребнадзора: иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих сапных моноклональных и иммуноглобулинов диагностических флуоресцирую-

щих мелиоидозных моноклональных, предназначенных для обнаружения и идентификации *B. mallei* и *B. pseudomallei* соответственно [3, 4, 5, 8].

Недостаточная защищенность человека от целого ряда природных инфекционных болезней усиливается угрозой возможного преднамеренного использования биологических агентов в целях терроризма. В этом случае, определяющее значение имеет скорость не только установления диагноза, но и расшифровки вспышки инфекции.

Объем и порядок проведения диагностических исследований по обнаружению патогенных биологических агентов опасных инфекционных болезней в микробиологических лабораториях регламентированы соответствующими для каждого вида возбудителя нормативно-методическими документами, вместе с тем, многие из них требуют корректировки. Проведенные исследования позволяют обозначить необходимый перечень биохимических, иммунодиагностических и молекулярно-генетических тестов для оптимизации существующих схем лабораторной диагностики возбудителей сапа и мелиоидоза и разработки стандартов лабораторной диагностики особо опасных инфекций для диагностических лабораторий территориального, регионального и федерального уровней.

Работа выполнена по государственному контракту № 54-Д/3 от 20.08.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009 – 2013 гг.)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алтухова В.В., Антонов В.А., Ткаченко Г.А. и др. Использование полимеразной цепной реакции для обнаружения возбудителей сапа и мелиоидоза при экспериментальной инфекции. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2007; 3:22–7.
2. Будченко А.А., Илюхин В.И., Викторов Д.В. Сравнительный анализ электрофоретических суммарных клеточных белков патогенных буркхольдерий. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2005; 2:24–8.
3. Кулаков М.Я., Прохвятилова Е.В., Храпова Н.П. Моноклональный эритроцитарный диагностикум для обнаружения возбудителей сапа и мелиоидоза. В кн.: Эколого-эпидемиологический надзор за природно-очаговыми инфекциями в Северном Прикаспии. Астрахань; 1996. С. 146–7.
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: «Медицина», «Шико»; 2009. 472 с.
5. Прохвятилова Е.В., Храпова Н.П. О получении моноклональных люминесцирующих иммуноглобулинов для обнаружения возбудителя мелиоидоза. В кн.: Эколого-эпидемиологический надзор за природно-очаговыми инфекциями в Северном Прикаспии. Астрахань; 1996. С. 147–8.
6. Ряпис Л.А., Илюхин В.И., Вострова Е.И. и др. Лабораторная диагностика клинически значимых видов псевдомонад. Лаб. дело. 1988; 12:66–71.
7. Ткаченко Г.А., Антонов В.А., Замараев В.С., Илюхин В.И. Идентификация возбудителей сапа и мелиоидоза с помощью полимеразной цепной реакции. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2003; 3:7–11.
8. Храпова Н.П., Тихонов Н.Г., Рыбкин В.С. и др. Иммунологическая диагностика мелиоидоза. В кн.: Мелиоидоз. Волгоград; 1995. С. 57–68.
9. Antonov V.A., Tkachenko G.A., Altukhova V.V. et al. Molecular identification and typing of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*: when is enough enough? Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2008; 102(Suppl 1):134–9.
10. Chantratita N., Vesaratchavee M., Wuthiekanun V. et al. Pulsed-field gel electrophoresis as a discriminatory typing technique for the biothreat agent *Burkholderia mallei*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2006; 74:345–7.
11. Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology,

- pathophysiology, and management. Clin. Microbiol. Rev. 2005; 2:383–416.
12. Currie B.J., Mayo M., Anstey N.M. et al. A cluster of melioidosis cases from an endemic region is clonal and is linked to the water supply using molecular typing of *Burkholderia pseudomallei* isolates. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2001; 65:177–9.
 13. Dharakul T., Songsivilai S., Viriyachitra S. et al. Detection of *Burkholderia pseudomallei* DNA in patients with septicemic melioidosis. J. Clin. Microbiol. 1996; 34(3):609–14.
 14. Duangsonk K., Gal D., Mayo M. et al. Use of a variable amplicon typing scheme reveals considerable variation in the accessory genomes of isolates of *Burkholderia pseudomallei*. J. Clin. Microbiol. 2006; 44:1323–34.
 15. Gilardi G.L. Identification of *Pseudomonas* and related bacteria in: Glucose nonfermenting Gram-negative bacteria in clinical microbiology. 1978. P. 16–44.
 16. Godoy D., Randle G., Simpson A.J. et al. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. J. Clin. Microbiol. 2003; 41:2068–79.
 17. Harvey S.P., Minter J.M. Ribotyping of *Burkholderia mallei* isolates. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2005; 1:91–7.
 18. Holden M.T.G., Titball R.W., Peacock S. et al. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004; 39:14240–245.
 19. Inglis T.J.J., Merritt A., Chidlow G. et al. Comparison of diagnostic laboratory methods for identification of *Burkholderia pseudomallei*. J. Clin. Microbiol. 2005; 5:2201–06.
 20. Janda J.M., Abbot S.L. Bacterial identification for publication: When is enough enough? J. Clin. Microbiol. 2002; 6:1887–91.
 21. Jones S.W., Dobson M.E., Francesconi S.C. et al. DNA assays for detection, identification, and individualization of select agent microorganisms. Croat. Med. J. 2005; 46:522–9.
 22. Kaestli M., Mayo M., Harrington G. et al. Sensitive and specific molecular detection of *Burkholderia pseudomallei*, the causative agent of melioidosis, in the soil of tropical northern Australia. Appl. Environ. Microbiol. 2007; 2:6891–7.
 23. Koh T.H., Ng L.S.Y., Ho J.L.F. et al. Automated identification systems and *Burkholderia pseudomallei*. J. Clin. Microbiol. 2003; 41:1809.
 24. Koonpaew S., Ubol M.N., Sirisinha S. et al. Genome fingerprinting by pulsed-field gel electrophoresis of isolates of *Burkholderia pseudomallei* from patients with melioidosis in Thailand. Acta Trop. 2000; 74:87–191.
 25. Kunakorn M., Markham R.B. Clinically practical seminested PCR for *Burkholderia pseudomallei* quantitated by enzyme immunoassay with and without solution hybridization. J. Clin. Microbiol. 1995; 33:2131–5.
 26. Layne S.P., Beugelsdijk T.J. High-throughput laboratories for Homeland and National Security. Biosecurity and bioterrorism: biodefence, strategy, practice and science. 2003; 2:123–30.
 27. Lew A.E., Desmarchelier P.M. Detection of *Pseudomonas pseudomallei* by PCR and hybridization. J. Clin. Microbiol. 1994; 32:1326–32.
 28. Merritt A., Inglis T.J.J., Chidlow G. et al. PCR-based identification of *Burkholderia pseudomallei*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 2006; 5:239–244.
 29. Meumann E.M., Gal D., Novak R.T. et al. Clinical evaluation of a type III secretion system real-time PCR assay for diagnosing melioidosis. J. Clin. Microbiol. 2006; 44:3028–30.
 30. Niernan W.C., DeShazer D., Kim H.S. et al. Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004; 39:14246–251.
 31. Novak R.T., Glass M.B., Gee J.E. et al. Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting the type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei*. J. Clin. Microbiol. 2006; 44:85–90.
 32. Palleroni N.J. Family of *Pseudomonadaceae*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore; 1984. P. 141–99.
 33. Rainbow L., Hart C.A., Winstanley G. Distribution of type III secretion gene clusters in *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis* and *B. mallei*. J. Med. Microbiol. 2002; 51:374–84.
 34. Rattanathongkom A., Sermwan R.W., Wongratanaheewin S. Detection of *Burkholderia pseudomallei* in blood samples using polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes. 1997; 11:25–31.
 35. Sirishihha S., Anuntagool N., Dharakul T. et al. Recent developments in laboratory diagnosis of melioidosis. Acta Tropica. 2000; 74:235–45.
 36. Sonthayanon P., Krasao P., Wuthiekanun V. et al. A simple method to detect and differentiate *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis* using specific flagellin gene primers. Mol. Cell. Probes. 2002; 3:217–22.
 37. Supaprom C., Wang D., Leelayuwat C. et al. Development of Real-Time PCR assays and evaluation of their potential use for rapid detection of *Burkholderia pseudomallei* in clinical blood specimens. J. Clin. Microbiol. 2007; 9:2894–901.
 38. Suppiah G., Bagali P.G., Vadivelu G. Development of polymerase chain reaction assay to detect *Burkholderia* genus and to differentiate the species in clinical specimens. In: The 5-th world melioidosis congress. Thailand, Khon Kaen; 2007. P. 245.
 39. Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 1997; 18:426–39.
 40. Thibault F.M., Valade E., Vidal D. R. Identification and discrimination of *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, and *B. thailandensis* by real-time PCR targeting type III secretion system genes. J. Clin. Microbiol. 2004; 42:5871–4.
 41. Tomaso H., Scholz H.C., Al Dahouk S. et al. Development of 5-nuclease real-time PCR assays for the rapid identification of the *Burkholderia mallei*/*Burkholderia pseudomallei* complex. Diagn. Mol. Pathol. 2004; 13(4):247–53.
 42. Ulrich M.P., Norwood D.A., Christensen D.R. et al. Using real-time PCR to specifically detect *Burkholderia mallei*. J. Med. Microbiol. 2006; 55:551–9.
 43. Ulrich R., Ulrich M., Schell M. et al. Development of a polymerase chain reaction assay for the specific identification of *Burkholderia mallei* and differentiation from *Burkholderia pseudomallei* and other closely related *Burkholderiaceae*. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2006; 1:37–45.
 44. U'Ren J.M., Schupp J.M., Pearson T. et al. Tandem repeat regions within the *Burkholderia pseudomallei* genome and their application for high resolution genotyping. BMC. Microbiol. 2007; 7:23.
 45. Vadivelu J., Puthucherry S.D., Mifsud A. et al. Ribotyping and DNA macrorestriction analysis of isolates of *Burkholderia pseudomallei* from cases of melioidosis in Malaysia. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1997; 91:358–60.
 46. Vandamme P., Pot B., Gillis M. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Rev. 1996; 60:407–38.
 47. Van Pelt C., Verduin C.M., Goessens W.H.F. et al. Identification of *Burkholderia* spp. in the clinical microbiology laboratory: comparison of conventional and molecular methods. J. Clin. Microbiol. 1999; 7:2158–64.
 48. Wattiau P., Van Hesse M., Neubauer H. et al. Identification of *Burkholderia pseudomallei* and related bacteria by Multiple-Locus Sequence Typing-derived PCR and Real-Time PCR. J. Clin. Microbiol. 2007; 45:1045–8.
 49. Wilcox W.R., Lapage S.P., Holmes B. A review of numerical methods in bacterial identification. Antonie Van Leeuwenhoek. 1980; 46:233–99.
 50. Winstanley C., Hart C.A. Presence of type III secretion genes in *Burkholderia pseudomallei* correlates with Ara- phenotypes. J. Clin. Microbiol. 2000; 38:883–5.

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

1. Altukhova V.V., Antonov V.A., Tkachenko G.A. et al. [The use of polymerase chain reaction for detection of glanders and melioidosis using experimental infection]. Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. 2007; 3:22–7.
2. Budchenko A.A., Ilyukhin V.I., Viktorov D.V. [Comparative analysis of total cell protein electrophoregrams of pathogenic *Burkholderia*]. Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. 2005; 2:24–8.
3. Kulakov M.Ya., Prokhvatilova E.V., Khrapova N.P. [Monoclonal erythrocytic diagnosticum for detection of causative agents of glanders and melioidosis]. In: [Ecological and Epidemiological Surveillance of Natural Foci Infections in the North Caspian Region]. Astrakhan; 1996. P. 146–7.
4. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnosis of Dangerous Infectious Diseases]. Practical guidance. M.: Izd. Meditsina, Izd. Shiko; 2009. P. 472.
5. Prokhvatilova E.V., Khrapova N.P. [On the producing of monoclonal luminescent immunoglobulins for detection of causative agent of melioidosis]. In: [Ecological and Epidemiological Surveillance of Natural Foci Infections in the North Caspian Region]. Astrakhan; 1996. P. 147–8.
6. Riapis L.A., Ilyukhin V.I., Vostrova E.I. et al. [Laboratory diagnosis of clinically important types of pseudomonads]. Lab. Delo. 1988; 12:66–71.
7. Tkachenko G.A., Antonov V.A., Zamaraev V.S., Ilyukhin V.I. [Detection and identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* by PCR]. Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. 2003; 3:7–11.
8. Khrapova N.P., Tikhonov N.G., Rybkin V.S. et al. [Immunologic diagnosis of melioidosis]. In: [Melioidosis]. Volgograd; 1995. P. 57–68.

Authors:

Antonov V.A., Ilyukhin V.I., Khrapova N.P., Prokhvatilova E.V., Viktorov D.V., Senina T.V., Budchenko A.A., Tkachenko G.A., Alekseeva V.V., Zakharova I.B., Savchenko S.S., Zinchenko O.V., Sorokina Yu.I., Alekseev V.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute. Golubinskaya St., 7, Volgograd, 400131, Russia. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Об авторах:

Антонов В.А., Илюхин В.И., Храпова Н.П., Прохвятилова Е.В., Викторов Д.В., Сенина Т.В., Будченко А.А., Ткаченко Г.А., Алексеева В.В., Захарова И.Б., Савченко С.С., Зинченко О.В., Сорокина Ю.И., Алексеев В.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 21.06.11.

В.Г.Германчук, Д.В.Уткин, С.А.Щербакова

АНАЛИЗ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ И СРЕДСТВ ЭКСПРЕССНОЙ ИНДИКАЦИИ ТОКСИНОВ

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

Угроза возникновения чрезвычайных ситуаций различного характера является по-прежнему актуальной проблемой для всех государств мирового сообщества, не исключая и Российскую Федерацию. Разработка современных методов и средств экспрессной индикации и идентификации токсинов на сегодняшний день занимает одно из приоритетных мест в системе биологической защиты. Регламентированные средства обнаружения биологических токсинов не удовлетворяют требованиям экспрессности. Одними из перспективных средств экспрессной индикации токсинов являются иммунохроматографические, иммуночиповые и иммуносенсорные тест-системы, обладающие высокой чувствительностью, избирательностью и экспрессностью. В обзоре представлены зарубежные и отечественные разработки средств экспрессной индикации токсинов.

Ключевые слова: токсины, ботулинический токсин, стафилококковый энтеротоксин, холерный токсин, рицин, иммунохроматография, иммуночипы, иммуносенсоры, наноматериалы

V.G.Germanchuk, D.V.Utkin, S.A.Shcherbakova

Analysis of the Modern Methods and Means for Rapid Toxin Indication

Russian Research Anti-Plague institute "Microbe", Saratov

The risk of occurrence of emergency situations different in their character is still a pressing issue for all the states of the world's community, including the Russian Federation. Nowadays, development of the modern methods and tools for rapid toxin detection and identification holds a high position in biological safety system. Specified means for biological toxin detection do not comply with the requirements of rapidness. One of the prospective means for rapid toxin indication is immune-chromatographic, immunochip, and immunosensor test-systems with high sensitivity, differentiation capacity and expression. In this review described are some up-to-date foreign and home-grown technologies for rapid toxin indication.

Key words: toxins, botulinum toxin, staphylococcal enterotoxin, cholera toxin, ricin, immune-chromatography, immunochips, immunosensors, nanomaterials.

В настоящее время угроза возникновения чрезвычайных ситуаций различного характера является актуальной проблемой для всех государств мирового сообщества [3, 17]. Сохраняется потенциальная опасность применения патогенных биологических агентов (ПБА) в качестве агентов биотерроризма [3, 4, 12, 15]. Перечень ПБА, включаемых специалистами в группу возможных биологических средств, которые с большой степенью вероятности могут быть использованы с террористической целью, в настоящее время расширен за счет возбудителей вирусного происхождения и биологических токсинов. В 1988 г. Министерством здравоохранения СССР был утвержден перечень агентов, в отношении которых необходимо создавать средства защиты и проводить защитные мероприятия. К их числу относят токсины растительного и животного происхождения: ботулинические, столбнячный, сибиреязвенный, шигеллезный токсины, стафилококковые энтеротоксины, рицин, нейротоксины и др. [2]. Интерес к токсинам вызван целым рядом преимуществ перед возбудителями инфекционных болезней. Они более стабильны при хранении и применении, их можно легко и в больших количествах получить в научно-исследовательских лабораториях, возможно скрытое применение в диверсионно-террористических целях, и, что особенно важно, практически отсутствует инкубационный период заболевания, что приближает токсины по тактическим характеристикам к химическим агентам. В связи с этим разработка

современных методов и средств экспрессной индикации и идентификации биологических токсинов занимает одно из приоритетных мест в системе биологической защиты. Ее успешное решение необходимо для обеспечения своевременности и эффективности всего комплекса противоэпидемических и лечебно-профилактических мероприятий. Ботулинический, холерный, столбнячный, стафилококковый токсины, рицин, согласно регламенту, входят в перечень агентов, выявляемых в лабораториях специализированных противоэпидемических бригад (СПЭБ). В связи с этим лаборатории СПЭБ должны быть обеспечены методами и средствами их индикации.

В соответствии с действующими нормативно-методическими документами для выявления и идентификации ботулинических токсинов используют постановку биологической пробы на белых мышах, для определения стафилококковых энтеротоксинов применяют иммуноферментные тест-системы отечественного и зарубежного производства [2, 16]. Рицин обнаруживают в реакции агглютинации эритроцитов. В настоящее время зарегистрированные тест-системы для выявления холерного токсина отсутствуют. Продукцию холерного токсина культурами холерного вибриона определяют на модели кроликов-сосунков. Постановка биопробы на ботулотоксин занимает от 1 до 72 ч, твердофазный иммуноферментный анализ на стафилококковые энтеротоксины – 6 ч, определение рицина занимает порядка 2 ч, кроликов-сосунков наблюдают 48 ч. Модернизация СПЭБ на современном

Коммерческие системы индикации биологических токсинов

Методический подход		Коммерческие системы	Производитель	Вид определяемого токсина	Чувствительность, нг/мл	Время ответа, мин	Специфичность, %	Вид материала	Источник
Иммунохроматографический анализ	Визуальный учет	BADD	Osborn Scientific	БТ, СЭТ, рицин	5–33	1	99	Жидкие, твердые пробы, смывы, пробы воздуха	[8,10]
		SMART-II	New Horizons Diagnostic, Inc.	БТ, СЭТ, рицин	50	15–30	95	Жидкие, твердые пробы, смывы, культура, кровь, фекалии	[8, 10]
		Prime Alert	GenPrime, Inc.	БТ, СЭТ, рицин	400	15	100	Порошки	[8]
	Инструментальный учет	BioThreat Alert	Tetracore	БТ, СЭТ, рицин	2,5–50	1–15	95	Жидкие, твердые пробы, пробы воздуха, порошки, продукты питания	[8, 10]
		RAMP	Response Biomedical Corp.	БТ, рицин	5–10	15	100	Жидкие, твердые пробы, смывы, пробы воздуха	[8]
		Guardian Reader System	Alexeter Technologies	БТ, СЭТ, рицин	5–20	15	95	Жидкие, твердые пробы, смывы, пробы воздуха	[8]
Иммуночипы	Hand Held Microarray Assay (HHMA)	ANP Technologies, Inc.	БТ, СЭТ, рицин	1–25	15	НД	Жидкие, твердые пробы, смывы	[8]	
Иммуносенсоры	Analyte 2000	Research International Inc.	ХТ, СЭТ, рицин	0,1–1	15	НД	Жидкие пробы, суспензии	[8, 10]	
	RAPTOR	Research International Inc.	БТ, ХТ, СЭТ, рицин	0,1–1	15	100	Твердые пробы, смывы, пробы воздуха	[8, 10]	
	M-SERIES	BioVeris Corp.	БТ, СЭТ, рицин	0,0005–10	15	100	Жидкие, твердые пробы, смывы, пробы воздуха, кровь, сыворотка, плазма, фекалии, продукты питания	[8, 10]	

Примечание: БТ – ботулинический токсин, СЭТ – стафилококковый энтеротоксин В, ХТ – холерный токсин, НД – нет данных.

этапе предполагает разработку и внедрение в практику новых экспрессных методов и средств индикации биологических токсинов, основанных на достижениях науки и техники, характеризующихся быстротой постановки анализа, удобством в обращении, портативностью, низкой себестоимостью.

Среди методических и инструментальных подходов экспрессной индикации биологических токсинов на сегодняшний день можно выделить иммунохроматографические тест-системы, иммуночипы и иммуносенсоры (таблица). Указанные системы представляют собой портативные высокочувствительные экспресс-анализаторы, не требующие, как правило, каких-либо вспомогательных операций.

В настоящее время для выявления биологических токсинов (ботулинического, стафилококкового энтеротоксина, рицина) рядом зарубежных фирм выпускаются наборы для иммунохроматографического анализа (BADD, SMART-II, Prime Alert и др.). Преимущества иммунохроматографических тест-систем заключаются в экспрессности – возможности получения ответа в течение 10–15 мин, простоте постановки анализа, возможности визуального учета результатов и использования в полевых условиях. Выполнение исследований не требует специализированного оборудования, тест-системы малогабаритны и легко комплектуются в виде укладки (рис. 1). Представленные данные указывают на перспективность использования иммунохроматографических тест-систем в оснащении специализированных про-

тивовзрывных бригад. Повысить чувствительность и объективность визуального иммунохроматографического анализа можно за счет использования флуоресцентных и фосфоресцентных меток и приборного обеспечения регистрации флуоресценции. Этот подход реализован при создании систем RAMP (Response Biomedical Corp., Канада), BioThreat Alert (Tetracore, США), Guardian Reader System (Alexeter Technologies, США).

Они предназначены для использования в мобильных лабораториях. Все существующие известные укладки функционально идентичны: они анализируют пробу, отобранную из внешней среды путем взятия мазков, сбора неизвестных подозрительных порошков и каплей жидкости, в последующем растворяют их в так называемом «буфере анализа» (определенный состав водного раствора солей, детергентов и белка) и переносят часть полученного раствора (или взвеси частиц) на индикаторный элемент (тест-полоску). Затем, после прохождения реакции, на поверхности индикаторного элемента появляются окрашенные полосы, которые свидетельствуют о наличии искомого микроорганизма или токсина в пробе. Недостатком существующих иммунохроматографических тест-систем является наличие ложноположительных результатов, связанных с присутствием в пробах из окружающей среды различных природных кислот, щелочей, детергентов, пылевых частиц, которые могут вызывать появление на тест-полоске окрашенных полос, даже в от-



Рис. 1. Устройство для детекции агентов биологического оружия (Osborne Scientific, США) [8]

сутствие искомого биологического агента. Указанная проблема была решена отечественными специалистами при создании укладки иммунохроматографических индикаторных элементов для выявления возбудителей особо опасных инфекционных болезней и токсинов УИХЭ (ФГУП ГосНИИБП ФМБА, Россия). В дополнение к основным индикаторным элементам для выявления микроорганизмов и токсинов укладка содержит один иммунохроматографический элемент для выявления примесей и исключения ложноположительных результатов [6].

Одна иммунохроматографическая тест-полоска рассчитана для выявления только одного вида микроорганизма или токсина. Множественный параллельный анализ на наличие нескольких видов токсинов может быть осуществлен при использовании технологии иммуночипов. Иммуночип представляет собой пластинку из стекла, кремния, нитроцеллюлозной мембраны, на которой в определенном порядке нанесены от нескольких до десятков видов специфических антител. Преимущества микрочиповых систем связаны с их портативностью, низким уровнем ложноположительных результатов, сокращением времени анализа, возможностью определения множества аналитов в одном анализе. Иммуночиповые тест-системы для индикации биологических токсинов не так широко представлены на зарубежном и отечественном рынке, как иммунохроматографические. Коммерческим является иммуночип NHMA (ANP Technologies, Inc., США), представляющий собой иммунохроматографическую тест-полоску с нанесенными в виде отдельных точек антителами, он прост в обращении и позволяет обнаружить интересующие токсины в течение 15 мин (таблица) [8]. Однако для большинства иммуночипов требуется наличие у персонала определенных навыков постановки иммунологического анализа и приборного обеспечения регистрации и учета результатов – ридера или сканера. L.C.Shriver-Lake *et al.* [19] разработали мультианалитический микрочип Multi-Analyte Array Biosensor (MAAB), детектирующий менее чем за 15 мин столбчатый, ботулинический, стафилококковый токсины и рицин в одном анализе. В Институте молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН были разработаны белковые иммуночипы для одновременного выявления стафилококкового, дифтерийного, столб-

чатного, сибиреязвенного токсинов, рицина и вискумина в концентрации 0,1–2 нг/мл (рис. 2) [5, 18]. Однако они пока не внедрены в практику.

Французские ученые разработали удобный способ обнаружения ботулинического токсина типа В, основанный на определении протеазной активности ботулотоксина, субстратом которого служит ассоциированный с везикулами мембранный белок VAMP2 (синамбревин). Анализ выполняется на белковом чипе, где иммобилизованы везикулы посредством моноклональных антител к белку [7].

Среди систем многопараметрического анализа следует отметить автономную систему детекции патогенов APDS – Autonomous Pathogen Detection System (Lawrence Livermore National Laboratory, США), сочетающую в себе молекулярно-генетический и иммунологический анализ на основе xMAP-технологии (Luminex, США) [9]. Система APDS осуществляет непрерывный мониторинг воздуха на наличие 11 видов патогенных биологических агентов, в том числе ботулинического токсина.

Наряду с иммунохроматографическими и иммуночиповыми системами для детекции биологических токсинов используются различные иммуносенсорные устройства: Analyte 2000, RAPTOR, M-SERIES и др. (таблица). Потенциальное использование иммуносенсоров, особенно при мониторинге состояния окружающей среды, в большей степени ориентировано на системы предупреждения и получения сигнального ответа, не требующие точного определения концентрации ПБА. Принцип действия иммуносенсоров основан на взаимодействии биологических молекул иммуносенсора (антител, антигенов) с исследуемым материалом, в результате чего изменяются оптические, электрохимические и другие характеристики среды, которые регистрируются с помощью физического преобразователя этих изменений в электрический сигнал [1]. Достоинства иммуносенсоров заключаются в способности преобразовывать различные виды энергии, в высокой избирательности и чувствительности, возможности обнаружения ионных примесей, простых и сложных неорганических и органических молекул. Применение иммуносенсоров в экспресс-индикации биологических токсинов позволит на 2–3 порядка повысить чувствительность анализа по сравнению с другими иммунологическими методами, специфичность, сократить время анализа до нескольких минут. Так, система RAPTOR (Research International Inc., США) и ее предшественник Analyte 2000 (Research International Inc., США), созданные на основе оптоволоконного иммуносенсора, детектиру-

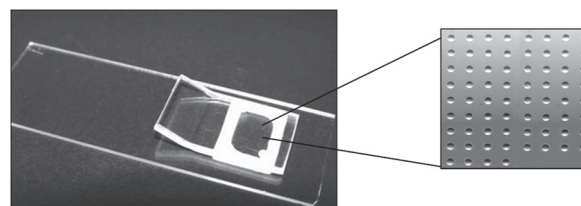


Рис. 2. Биологический микрочип для определения биологических токсинов (ИМБ им. В.А.Энгельгардта РАН, Россия) [18]

ют ботулинический токсин, стафилококковый энтеротоксин, холерный токсин и рицин в концентрации 0,1–1 нг/мл за 1 мин. Электрохемилюминесцентный анализ с применением системы M-SERIES (BioVeris Corp., США) повышает порог определения токсинов (ботулинического, стафилококкового) до 0,5–10 пг/мл [8]. Американские специалисты также сконструировали оптический биосенсор для мультиплексного определения белковых маркеров патогенов с использованием квантовых точек, где на волноводе иммобилизованы связывающие антитела [13]. Представленные иммуносенсорные устройства являются довольно дорогостоящими и сложными в обращении. Они требуют предварительной подготовки прибора к работе, его калибровки в течение 30 мин и высококвалифицированного обслуживающего персонала. Устройства должны быть обеспечены компьютером, источником бесперебойного питания.

В последнее время ведутся работы по конструированию средств индикации биологических токсинов с применением нанотехнологий и наноматериалов, которые позволяют создавать высокочувствительные и, в то же время, малогабаритные устройства. Так, N.M.Nirankar *et al.* [14] для детекции токсина *Staphylococcus aureus* предложили использовать наноразмерные транзисторы из кремниевых нанопроводников. Покрыв поверхность транзистора соответствующим антителом, исследователи смогли детектировать стафилококковый токсин, образующий комплекс с антителом и меняющий параметры тока, протекающего через транзистор. Шведские ученые со специалистами из Таиланда разработали электрический иммуносенсор для детекции холерного токсина на субатомном уровне. Ультразвуковая чувствительность сенсора обусловлена наличием комплексного интерфейса на поверхности золотого электрода с использованием наночастиц [11]. M.Yang *et al.* [20] предложили для детекции стафилококкового энтеротоксина В электрохимический сенсор, действие которого основано на перколяции через сеть углеродных нанотрубок, модифицированных антителами и расположенными между серебряными электродами сенсора. М.Б.Раевым (2008 г.) на основе наночастиц коллоидного углерода были разработаны оригинальные тест-системы для определения ботулинического и столбнячного токсина.

Таким образом, в настоящее время, наряду с регламентированными методами определения биологических токсинов, существуют перспективные средства экспрессной индикации – иммунохроматографические, иммуночиповые и иммуносенсорные тест-системы. Представляет интерес разработка методов и средств индикации токсинов с использованием нанотехнологий и наноматериалов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карякин А.А., Уласова Е.А., Вагин М.Ю., Карякина Е.Е. Биосенсоры: устройство, классификация и функциональные характеристики. Сенсор. 2002; 1:16–24.
2. Онищенко Г.Г. Специфическая индикация патогенных биологических агентов. Практическое руководство. М.: МП Гигиена; 2006. 288 с.

3. Онищенко Г.Г., Пальцев М.А., Зверев В.В., Иванов А.А., Киселев В.И., Нетесов С.В. и др. Биологическая безопасность. М: Медицина; 2006. 304 с.
4. Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Мартынюк Р.А. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза. Вестник Рос. акад. наук. 2003; 73(3):195–204.
5. Четчин В.Р., Прокопенко Д.В., Макаров А.А., Заседателев А.С. Биочипы для медицинской диагностики. Российские нанотехнологии. 2006; 1–2:13–28.
6. Ярков С.П., Третьяков С.И., Злобин В.Н. Укладка иммунохроматографических индикаторных элементов. Патент РФ 77687, опубл. 27.10.2008.
7. Ferracci G., Marconi S., Mazuet C., Jover E., Blanchard M.P., Seagar M., Popoff M., Lèvéque C. A label-free biosensor assay for botulinum neurotoxin B in food and human serum. J. Anal. Biochem. 2011; 410(2):281–8.
8. Guide for the Selection of Biological Agent Detection Equipment for Emergency First Responders. 2nd ed. Guide 101–06 [Internet]. U.S. Department of Homeland Security, 2007. 421 p.. Available from: http://www.nist.gov/customcf/get_pdf.cfm?pub_id=32499
9. Hindson B.J., Makarewicz A.J., Setlur U.S., Henderer B.D., McBride M.T., Dzenitis J.M. Biosensors & Bioelectronics 2005; 20:1925–31.
10. Lim D.V., Simpson J.M., Kearns E.A., Kramer M.F. Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and bio warfare. Clin. Microbiol. Rev. 2005; 18(4):583–607.
11. Loyprasert S., Hedström M., Thavarungkul P., Kanatharana P., Mattiasson B. Sub-attomolar detection of cholera toxin using a label-free capacitive immunosensor. J. Biosens., Bioelectr. 2010; 25(8):1977–83.
12. Madsen J.M. Toxins as weapons of mass destruction. Clin. Lab. Med. 2001; 21(3):593–605.
13. Mukundan H., Xie H., Grace W.K., Anderson A.S., Price D., Martinez J.S., Hartman N., Swanson B.I. Quantitative Multiplex Detection of Pathogen Biomarkers on Multichannel Waveguides. J. Anal. Chem. 2010; 82(1):136–44.
14. Nirankar N.M., Maki W.C., Cameron E., Nelson R., Winterrowd P., Rastogi S.K. *et al.* Ultra-sensitive detection of bacterial toxin with silicon nanowire transistor. Lab Chip. 2008; 8:868–71.
15. Reid D. Kirby. Potential military chemical/biological agents and compounds. US Army Chemical School. 2005. 324 p.
16. Reiss J., Reiss K. Recent advances in detection and identification of botulinum neurotoxins (BoNTs). J. Med. CBR Def [Internet]. 15 Jul 2007; Vol. 5. Available from: http://www.jmedcbr.org/issue_0501/Reiss/Reiss_01_07.pdf
17. Roberts B., Moodie M. Biological weapons: towards a threat reduction strategy. National Defense University. Washington; 2002. 15 p.
18. Rubina A., Duykova V., Dementieva E., Stomakhin A., Nesmeyanov E., Grishin E. *et al.* Quantitative immunoassay of biotoxins on hydrogel-based protein microchips. Anal. Biochem. 2005; 340(2):317.
19. Shriver-Lake L.C., Ligler F.S. IEEE Sensors Journal 2005; 5:751–56.
20. Yang M., Sun S., Bruck H. A., Kostov Y., Rasooly A. Electrical percolation-based biosensor for real-time direct detection of staphylococcal enterotoxin B (SEB). J. Biosens. Bioelectr. 2010; 25(12):2573–8.

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

1. Karyakin A.A., Ulasova E.A., Vagin M.Yu., Karyakina E.E. [Biosensors: design, classification and functional characteristics]. Sensor. 2002; 1:16–24.
2. Onishchenko G.G. [Specific Indication of Pathogenic Biological Agents. Guidelines]. M.: MP Gigena; 2006. 288 p.
3. Onishchenko G.G., Pal'tsev M.A., Zverev V.V., Ivanov A.A., Kiselev V.I., Netesov S.V. *et al.* [Biological Safety]. M.: Meditsina; 2006. 304 p.
4. Onishchenko G.G., Sandakhchiev L.S., Netesov S.V., Martynuk R.A. [Bioterrorism: national and global threat]. Vestnik RAMS. 2003; 73(3):195–204.
5. Chechetkin V.R., Prokopenko D.V., Makarov A.A., Zasedatlev A.S. [Biochips for medical diagnostics]. Ros. Nanotekhnol. 2006; 1–2:13–28.
6. Yarkov S.P., Tret'yakov S.I., Zlobin V.N. [Packing of the immunochromatographic detecting elements]. RF Patent 77687.

Authors:

Germanchuk V.G., Utkin D.V., Shcherbakova S.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Германчук В.Г., Уткин Д.В., Щербакова С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 17.06.11.

О.В.Малецкая¹, С.А.Щербакова², А.П.Бейер¹, Т.В.Таран¹, Б.А.Хапаев¹, Д.М.Бамматов³,
Г.А.-Х.Муртазалиева³, Н.Ф.Василенко¹, И.Н.Шарова², И.Г.Карнаухов², А.Н.Куличенко¹

ПРИНЦИПЫ СТАНДАРТИЗАЦИИ ДИАГНОСТИКИ И СОВРЕМЕННЫЕ ОСОБЕННОСТИ КРЫМСКОЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

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

³ФКУЗ «Дагестанская противочумная станция», Махачкала

Отмечено, что в последние годы по эпидемическим проявлениям Крымская геморрагическая лихорадка стала одной из наиболее актуальных инфекций на юге европейской части Российской Федерации, где расположен ее единый природный очаг. Проанализированы данные мониторинга КГЛ за 12-летний период (с 1999 г.). Определены основные эпидемиологические особенности этой инфекции в современный период. Представлены принципы разработки единого стандарта эпидемиологической и лабораторной диагностики. Отмечено, что дифференциация объемов и номенклатуры диагностических исследований в лабораториях разного уровня позволяет повысить их надежность и качество, проводить верификацию получаемых результатов.

Ключевые слова: Крымская геморрагическая лихорадка, эпидемическая ситуация, эпидемиологическая и лабораторная диагностика, эпидемиологический сезон, эпидемиологический анализ, вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки, РНК, ПЦР, ИФА.

O.V.Maletskaia¹, S.A.Shcherbakova², A.P.Beyer¹, T.V.Taran¹, B.A.Khapaev¹, D.M.Bammatov³,
G.A.-Kh.Murtazalieva³, N.F.Vasilenko¹, I.N.Sharova², I.G.Karnaukhov², A.N.Kulichenko¹

Principles of Standardization of Crimean Hemorrhagic Fever Diagnostics and Its Present-Day Peculiarities in the Territory of the Russian Federation

¹Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol; ²Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov;

³Dagestanian Plague Control Station, Makhachkala

It is stated that due to epidemic manifestations Crimean hemorrhagic fever (CHF) has recently become one of the most pressing issues in the South of the European part of the Russian Federation, the area where its integrated natural focus is situated. In this respect, analyzed are the data on CHF monitoring over the past decade (since 1999); determined are the main epidemiological peculiarities of the infection in the modern period. Furthermore, outlined are the basic principles of development of the unified standard concerning epidemiological and laboratory diagnostics of the disease. Emphasized is the importance of differentiation in scope and nomenclature of diagnostic investigations in laboratory facilities of different echelons, which makes it possible to increase plausibility and quality of the surveys conducted, and carry out verification of the results obtained.

Key words: Crimean hemorrhagic fever, epidemiological situation, epidemiological and laboratory diagnostics, epidemiological season, epidemiological analysis, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, RNA, PCR, enzyme linked immunoassay (ELISA).

Вирусные геморрагические лихорадки в настоящее время представляют особую актуальность для национальных и международных систем здравоохранения. Регистрация новых очагов этих опасных инфекционных болезней, активные миграционные процессы с высоким риском заноса возбудителей инфекций на эндемичные территории, а также возможность использования вирусов в качестве биологического оружия усиливают остроту проблемы.

Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ) – вирусная трансмиссивная природно-очаговая инфекция человека, вызываемая вирусом Крымской-Конго геморрагической лихорадки (вирусом ККГЛ), принадлежащим к роду *Nairovirus* семейства *Bunyaviridae*. Основным переносчиком вируса являются иксодовые клещи рода *Hyalomma*. КГЛ характеризуется широким географическим распространением, возникновением новых и активизацией ранее известных природных очагов, тяжестью течения и высоким уровнем летальности (до 80 %). Природные очаги КГЛ известны на обширной территории Европы, Азии и Африки. В Европе случаи заболевания КГЛ регистрируются в Албании, Болгарии, Греции, Венгрии, Косово, Югославии, Македонии, Португалии и на Украине.

В последние годы по эпидемическим проявлениям КГЛ стала одной из наиболее актуальных инфекций на юге европейской части Российской Федерации. Стремительное развитие эпидемической ситуации по КГЛ на Юге России, нарастающая угроза здоровью и жизни населения региона потребовали разработки мер по совершенствованию эпиднадзора за данной инфекцией, что, наряду с профилактическими мерами, предусматривает своевременное выявление случаев заболевания КГЛ, дифференциацию местных и заносных случаев инфекции. Лабораторная и эпидемиологическая диагностика инфекционной болезни с учетом рекомендаций ВОЗ должна осуществляться в соответствии с единым алгоритмом диагностики [4], что потребовало разработки принципов стандартного подхода к ее проведению.

Эпидемиологическая диагностика осуществляется путем анализа эпидемиологических данных, обобщения, определения их значения и взаимосвязи при сравнительном логическом исследовании. Принципы эпидемиологической диагностики инфекционной болезни основываются на знании ее основной эпидемиологической характеристики – количественных и качественных показателей эпидемиче-

ского процесса (уровень и динамика заболеваемости, распределение по территории и среди различных групп населения, механизмы, пути и факторы передачи инфекции) и факторов, их определяющих (компоненты паразитарной системы, экологические, социальные) [5]. Мониторинг КГЛ за 12 лет активного периода позволил суммировать полученные сведения и определить эпидемиологические особенности КГЛ на территории России в современных условиях.

Единый природный очаг КГЛ расположен на юге европейской части Российской Федерации на территории пяти субъектов Южного федерального округа (ЮФО) – Астраханская, Волгоградская, Ростовская области, Краснодарский край, Республика Калмыкия – и пяти субъектов Северо-Кавказского федерального округа (СКФО) – Ставропольский край, Карачаево-Черкесская, Кабардино-Балкарская республики, Республики Ингушетия и Дагестан.

Состав иксодовых клещей, зараженных вирусом ККГЛ, на данной территории представлен 18 видами (таблица). Иксодиды распространены мозаично с доминированием некоторых видов в зависимости от погодных-климатических условий и ландшафтно-географических особенностей территорий.

Наибольшее количество видов вирусифорных клещей выявлено на территории Ставропольского края и Республики Дагестан (по десять видов). Обращает на себя внимание распространенность вирусифорных клещей *H. marginatum* на территории всех субъектов Российской Федерации, входящих в зону природной очаговости КГЛ.

Анализ территориального распределения больных КГЛ в Российской Федерации с 1999 г. свидетельствует о постепенном и значительном к настоящему времени расширении нозоареала КГЛ. Практически ежегодно до 2011 г. на территории ЮФО и СКФО выявлялись новые районы с эпидемическими проявлениями этой инфекции. Эпидемически активная

территория природного очага КГЛ, расположенного на Юге России, к настоящему времени равна около 290,8 тыс. км², что составляет 49,4 % территории ЮФО и СКФО, и охватывает всю территорию Астраханской области, 25 районов Ставропольского края, 10 – Волгоградской области, 25 – Ростовской области, 11 – Республики Калмыкия, 11 – Республики Дагестан, 2 – Республики Ингушетия, 1 – Карачаево-Черкесской республики.

Анализ сезонных показателей динамики заболеваемости КГЛ в Российской Федерации, рассчитанный на основании суммации данных о количестве больных для каждого месяца за все годы рассматриваемого периода, показал, что первые больные КГЛ зарегистрированы в первой декаде апреля. Рост числа больных начинается со второй декады апреля, достигая своего максимума в третьей декаде мая. По декадам июня отмечается лишь незначительное снижение заболеваемости, но, в целом, за месяц суммарное количество больных является наибольшим. Индекс сезонности в этот период составляет 283 %, т.е. количество больных в июне примерно в 2,8 раза превышает средний годовой уровень заболеваемости. В июле наблюдается отчетливая тенденция к снижению заболеваемости (индекс сезонности составил 96 %). В августе, сентябре и октябре выявляются единичные случаи заболевания. Продолжительность эпидсезона на эндемичной территории Российской Федерации в среднем составляет (137,8±1,3) дня. Длительность сезонного подъема в среднем равна (65,1±1,4) дня. Продолжительность сезонного спада заболеваемости находится в пределах (65,8±1,2) дня.

Анализ распределения больных КГЛ (n=966) по путям и факторам передачи инфекции показал, что в подавляющем большинстве случаев заражение происходило при укусе клещом (59,6 % от общего числа больных), 10,5 % больных заразились при снятии и раздавливании клещей незащищенными руками.

Видовой состав иксодовых клещей, зараженных вирусом ККГЛ, на юге европейской части Российской Федерации

Виды клещей	Вирусифорные клещи в субъектах ЮФО и СКФО									
	Ставропольский край	Республика Калмыкия	Карачаево-Черкесская республика	Краснодарский край	Ростовская область	Республика Ингушетия	Республика Дагестан	Волгоградская область	Кабардино-Балкарская республика	Астраханская область
<i>Hyalomma marginatum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rhipicephalus rossicus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+		
<i>Dermacentor marginatus</i>	+	+	+	+	+	+			+	
<i>Hyalomma scupense</i>	+	+	+				+			+
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	+	+					+			+
<i>Boophilus annulatus</i>	+			+		+	+		+	
<i>Ixodes ricinus</i>	+			+	+		+		+	
<i>Haemaphysalis punctata</i>	+		+	+	+					
<i>Dermacentor reticulatus</i>	+			+			+			
<i>Haemaphysalis parva</i>						+			+	
<i>Rhipicephalus turanicus</i>				+			+			
<i>Dermacentor niveus</i>		+							+	+
<i>Rhipicephalus bursa</i>	+						+			
<i>Hyalomma anatolicum</i>		+								
<i>Hyalomma detritum</i>							+			
<i>Rhipicephalus schulzei</i>										+
<i>Rhipicephalus pumilio</i>		+								
<i>Ixodes laguri</i>					+					

«Наползание» клеща отмечали 5,3 % больных КГЛ. Заболевание в результате контакта с больным КГЛ было установлено в 0,5 % случаев. В 24,1 % случаев путь передачи инфекции установить не удалось. Анализ таблиц сопряженности показал наличие статистически значимой связи между количеством больных КГЛ и путем передачи инфекции ($p < 0,001$).

Анализ распределения больных КГЛ в Российской Федерации ($n=577$) в зависимости от условий заражения показал, что большинство из них подвергались нападению клещей при уходе за сельскохозяйственными животными на частных подворьях (42,8 %). В меньшей степени, но практически с одинаковой частотой, люди заражались вирусом ККГЛ при уходе за сельскохозяйственными животными в общественном секторе, во время полевых работ и отдыха на природе (18,2, 18 и 16,1 % соответственно). Случаи заболевания среди лиц, подвергавшихся нападению клещей на пастбище при выпасе сельскохозяйственных животных, составили 4,7 %. Имело место заражение в ЛПУ при контакте с больным КГЛ (0,2 %).

Ведущим механизмом передачи возбудителя КГЛ является трансмиссивный с реализацией инокуляционного или контаминационного путей передачи инфекции при укусе зараженными клещами, при попадании слюны, гемолимфы на кожу рук и слизистые вследствие раздавливания инфицированных клещей, втирания экскрементов в кожу при их «наползании», а также при разрезании клещей (чаще сытых самок) во время стрижки животных, при удалении присосавшихся членистоногих с домашних животных (извлечение хоботка клеща с остатками слюны и участка кожи, являющихся наиболее опасным вирусосодержащим материалом). В отдельных случаях заражение человека может происходить при контактном и аспирационном механизмах передачи возбудителя КГЛ. При контакте с кровью и кровянистыми выделениями больного заражаются члены семьи, медицинские работники, больные, находящиеся в палате, и т.д. [3].

Несмотря на тот факт, что количество случаев заболевания КГЛ среди мужчин значительно превышает таковое у женщин, анализ таблиц сопряженности показал отсутствие существенной статистической связи между количеством больных КГЛ и полом ($p > 0,05$). Установленная возрастная структура больных КГЛ подтверждает наиболее частые контакты с природными очагами людей трудоспособного возраста (от 20 до 60 лет), что определяет группу риска, средний возраст которой составил $(41 \pm 0,7)$ лет. Анализ таблиц сопряженности показал наличие зависимости количества больных КГЛ от их возраста ($p < 0,001$).

Распределение больных КГЛ по социально-профессиональным группам ($n=964$) показало, что наибольший удельный вес больных отмечается среди неработающего населения, включая пенсионеров (46,7 %), в основном занимающегося содержанием и уходом за поголовьем сельскохозяйственных животных на частных подворьях или выращиванием сельскохозяйственных культур как на собственных приусадебных участках, так и на полях у частных

предпринимателей. Причем наибольшему риску заражения КГЛ подвержены безработные (34,6 %), так как они привлекаются к сезонным сельскохозяйственным работам, а также к периодическому уходу за животными по найму.

Заболеваемость сельского населения превышает заболеваемость городского в девять раз ($p < 0,001$). Городские жители болеют в единичных случаях.

Таким образом, алгоритм эпидемиологической диагностики КГЛ включает определение причинно-следственных связей основных показателей эпидемического процесса КГЛ: пребывание в зоне природной очаговости КГЛ, сезон года, условия заражения, механизмы, пути и факторы передачи инфекции, принадлежность к группе риска, возраст больного, социально-профессиональная принадлежность, место проживания (город, сельская местность). Проведение двухфакторного дисперсионного анализа без повторений с целью определения наиболее влияющих факторов на количество больных КГЛ и оценку этого влияния на изменение уровня заболеваемости КГЛ на территории природного очага позволило установить, что наиболее значимыми факторами риска являются «профессиональная принадлежность», «возраст больного», «место проживания» и «условия заражения». Имеет значение также фактор риска «пребывание на эндемичной территории».

Проблема КГЛ на Юге России не теряет своей остроты на ближайшую перспективу, поэтому чрезвычайно важными остаются вопросы своевременной, качественной и надежной лабораторной диагностики болезни, для чего крайне необходимыми являются обязательная регламентация порядка проведения анализа в лабораториях разного уровня и разработка единого стандарта диагностики. Стандартизация лабораторной диагностики предусматривает рациональное оснащение лабораторий оборудованием, расходными материалами и диагностическими препаратами, позволит сократить время диагностики за счет уменьшения объемов исследований в лабораториях разных уровней, а главное обеспечит четкую дифференциацию всех этапов исследования в соответствии с правилами биологической безопасности. Исходя из этого и в соответствии с трехуровневой системой организации лабораторной диагностики инфекционных болезней в Российской Федерации, исследования проб биологического материала, собранного в ходе эпизоотологического обследования природного очага КГЛ, а также лабораторную диагностику КГЛ у людей согласно действующим нормативно-методическим документам [2] проводят ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъекте Российской Федерации и противочумные учреждения, имеющие разрешение на работу с возбудителями II группы патогенности (опасности). При этом осуществляются детекция РНК вируса ККГЛ методом ПЦР, выявление антигена вируса ККГЛ и антител к нему с помощью ИФА с использованием диагностических препаратов, зарегистрированных в установленном порядке.

Материалом для исследования при обследовании

природных биотопов и животноводческих хозяйств служат иксодовые клещи, органы птиц и мелких млекопитающих (головной мозг, печень), пробы крови крупного и мелкого скота. Для выявления маркеров вируса ККГЛ в материале от людей используют: от больных – цельную кровь, плазму, сгусток крови, от трупа – секционный материал (печень, легкие, селезенка, почки, головной мозг). Следует учитывать, что РНК вируса ККГЛ обнаруживается в крови больных с 1-х по 7-е сутки, иногда – до 14 сут от начала заболевания. Специфические антитела класса М (IgM) появляются на 5–7-й день, максимальные титры (1:20000 и более) выявляются на 2–3-й неделе, а к 90-м суткам IgM, как правило, обнаруживаются в невысоких титрах или не определяются совсем. Антитела класса G (IgG) появляются на 7–10-й день от начала заболевания, достигают пика к концу второго месяца, держатся в высоких титрах 6–8 мес. К концу первого года титр IgG снижается, и невысокие титры у некоторых больных сохраняются годами. У части больных к концу первого года IgG полностью исчезают из периферической крови.

Возможность экспресс-диагностики КГЛ методом ПЦР в первые дни заболевания является основой ранней диагностики болезни и, соответственно, своевременно начатого специфического лечения больных. Использование количественной ПЦР-диагностики позволяет не только выявить РНК вируса ККГЛ, но и установить уровень и продолжительность виремии при КГЛ. Целью серологического исследования являются ранняя диагностика КГЛ с выявлением вирусного антигена и IgM и подтверждение диагноза при четырехкратном и большем нарастании титра IgG в парных сыворотках крови.

Выявление РНК и/или антигена вируса ККГЛ в исследуемых образцах, взятых на ранних сроках заболевания (до 5–7-го дня), свидетельствует об инфицированности больных и в совокупности с данными эпидемиологического анамнеза, клинической картины и результатами клинической лабораторной диагностики может считаться основанием для постановки диагноза «КГЛ». При обнаружении IgM в титре 1:800 и более и IgG в любом титре диагноз «КГЛ» считается подтвержденным [2].

Выделение вируса ККГЛ осуществляется в специализированных вирусологических лабораториях, имеющих разрешение на работу с вирусами II группы патогенности. Для выделения вируса используют биопробных животных – 1–2-дневных сосунков белых мышей или клеточные линии Vero-E6, SW-13 и др.

Лаборатории референс-центра мониторинга КГЛ проводят генотипирование изолятов вируса ККГЛ методом прямого секвенирования, что становится ключевым элементом мониторинга циркуляции известных и заноса новых штаммов вируса ККГЛ на территории Российской Федерации, а также решения вопроса о возможных эпидемиологических и клинических отличиях КГЛ в России и Европе от КГЛ, регистрируемой в республиках Средней Азии, в Китае, на Ближнем Востоке и в Африке, где распростране-

ны штаммы вируса ККГЛ других генетических линий [1]. В референс-центре, наряду с зарегистрированными тест-системами, возможно использование экспериментальных серий препаратов.

Изолированные штаммы вирусов передаются в Национальный центр верификации диагностической деятельности, выполняющий функции Государственной коллекции микроорганизмов, где осуществляют всестороннее изучение выделенных штаммов с помощью иммуносерологических и молекулярно-генетических методов.

Дифференциация объемов и номенклатуры диагностических исследований в лабораториях разного уровня позволит проводить верификацию получаемых результатов и повысить надежность и качество проводимых диагностических исследований.

Часть материалов, представленных в статье, получены в ходе выполнения государственного контракта № 67-Д от 25.07.2011 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы) в 2011 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карань Л.С., Платонов А.Е., Смирнова С.Е. и др. Генетические исследования при КГЛ: от диагностики до молекулярной эпидемиологии. В кн.: Арбовирусы и арбовирусные инфекции. М.: ЗАО «Гриф и К»; 2007. С. 57–61.
2. Методические указания «Организация и проведение профилактических и противоэпидемических мероприятий против Крымской геморрагической лихорадки». МУ 3.1.1.2488-09.
3. Онищенко Г.Г., Ефременко В.И., Бейер А.П. Крымская геморрагическая лихорадка. М.; 2005. 320 с.
4. Топорков А.В., Колодиров А.И., Топорков В.П., Щербак С.А., Карнаухов И.Г., Казакова Е.С. и др. Принципы стандартизации эпидемиологической и лабораторной диагностики особо опасных, новых и возвращающихся инфекционных болезней. Пробл. особо опасных инф. 2011; 1(107): 62–5.
5. Черкасский Б.Л. Руководство по общей эпидемиологии. М.: «Медицина»; 2001. 560 с.

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

1. Karan' L.S., Platonov A.E., Smirnova S.E. et al. [Genetic investigations in case of Crimean hemorrhagic fever (CHF): from diagnostics to molecular epidemiology]. In: [Arboviruses and Arboviral Infections]. M.: ZAO Grif&Co; 2007. P. 57–61.
2. Methodic Regulations [Organization and implementation of the preventive and anti-epidemic measures against Crimean hemorrhagic fever]. MR 3.1.1.2488-09.
3. Onishchenko G.G., Efremenko V.I., Beyer A.P. [Crimean Hemorrhagic Fever]. M.; 2005. 320 p.
4. Toporkov A.V., Kologorov A.I., Toporkov V.P., Shcherbakova S.A., Karnaukhov I.G., Kazakova E.S. et al. [Principles of standardization of epidemiological and laboratory diagnostics of particularly dangerous, emerging and re-emerging infectious diseases]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2011; 107:62–5.
5. Cherkassky B.L. [Guidelines on General Epidemiology]. M.: Meditsina; 2001. 560 p.

Authors:

Maletskaya O.V., Beyer A.P., Taran T.V., Khapaev B.A., Vasilenko N.F., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru
Shcherbakova S.A., Sharova I.N., Karnaukhov I.G. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru
Bammatov D.M., Murtazaliev G.A.-Kh. Dagestanian Plague Control Station. 13, 5th Zhilgorodok, Makhachkala, Republic of Dagestan, 367015, Russia. E-mail: dag_chum@bk.ru

Об авторах:

Малецкая О.В., Бейер А.П., Таран Т.В., Хапаев Б.А., Василенко Н.Ф., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru
Щербак С.А., Шарова И.Н., Карнаухов И.Г. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru
Бамматов Д.М., Муртазалиева Г.А.-Х. Дагестанская противочумная станция. 367015, Махачкала, 5-й жилгородок, 13. E-mail: dag_chum@bk.ru

Поступила 11.03.12.

А.В.Романова, И.Б.Захарова, В.С.Замараев, Д.В.Викторов

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ И ТИПИРОВАНИЯ ГЕНОВ β -ЛАКТАМАЗ ПАТОГЕННЫХ ВИДОВ РОДА *BURKHOLDERIA*

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград

Сконструирован набор олигонуклеотидных праймеров для проведения экспресс-оценки наличия детерминант устойчивости к β -лактамам у изолятов патогенных буркхольдерий методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с одновременным определением принадлежности выявленных β -лактамаз к определенному молекулярному классу. ПЦР с праймерами, специфичными последовательностям генов металло- β -лактамаз (класс В β -лактамазы), и оксациллиназы семейства D-ala карбоксипептидаз (класс D β -лактамазы) позволяет дифференцировать между собой виды *Burkholderia* группы «pseudomallei».

Ключевые слова: *Burkholderia*, β -лактамазы, молекулярное типирование, полимеразная цепная реакция.

A.V.Romanova, I.B.Zakharova, V.S.Zamaraev, D.V.Viktorov

Design of Primers for Detection and Typing of β -Lactamase Genes from Pathogenic Species of *Burkholderia*

Volgograd Anti-Plague Research Institute, Volgograd

The set of oligonucleotide primers was designed to identify β -lactam-resistance determinants in isolates of pathogenic *Burkholderia* using PCR. Simultaneously identified was certain molecular class of detected β -lactamases. PCR with primers specific to metallo- β -lactamase (class B) and oxacillinase of D-ala carboxypeptidase family (class D of β -lactamase) gene sequences allowed to differentiate among «pseudomallei» group of *Burkholderia* species.

Key words: *Burkholderia*, β -lactamases, molecular typing, polymerase chain reaction.

Возбудители особо опасных инфекций – сапа (*Burkholderia mallei*) и мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) – аэробные грамотрицательные неферментирующие бактерии, принадлежащие к роду *Burkholderia* β -подкласса протеобактерий семейства *Burkholderiaceae*. В настоящее время род *Burkholderia* включает более 50 видов микроорганизмов и представляет собой довольно гетерогенную таксономическую группу, объединяющую сапрофиты, фитопатогены и патогены теплокровных животных. Характерным биологическим свойством патогенных буркхольдерий и близких им микроорганизмов является высокая природная резистентность к широкому спектру антимикробных соединений, что создает значительные трудности для эффективного лечения соответствующих заболеваний.

В геномах патогенных буркхольдерий первично аннотированы многочисленные последовательности β -лактамаз классов А, В и D [7, 8]. Очевидно, что исследование данных детерминант важно как в плане более полного понимания механизмов антибиотикоустойчивости буркхольдерий, так и в аспекте совершенствования схем лечения вызываемых ими инфекций, генодиагностики и молекулярно-эпидемиологического мониторинга штаммов возбудителей.

Материалы и методы

Дизайн праймеров осуществлен на основе кодирующих последовательностей геномов *Burkholderia*, гомологичных известным генам β -лактамаз, представленных в общедоступных генетических базах данных.

Принадлежность генов β -лактамаз буркхольде-

рий к различным молекулярным классам оценена с помощью базы данных InterProScan (www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan). Определение консервативных и переменных фрагментов сиквенса проведено с использованием процедуры множественного выравнивания по алгоритму W.Clustal [10]. Консервативные аминокислотные мотивы β -лактамаз анализировали средствами сервера ТМНММ v. 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM).

Подбор праймеров, комплементарных консервативным фрагментам нуклеотидных последовательностей генов β -лактамаз, проведен с использованием программы FastPCR v. 6.1.72 (PrimerDigital Ltd.). Предварительная верификация полученных вариантов праймеров проведена на геномных сиквенсах бактерий с использованием сервиса PrimerBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

Для выделения ДНК использовались штаммы *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia* и ряда гетерологичных видов микроорганизмов из коллекции ФКУЗ Волгоградский НИПЧИ. Культуры микроорганизмов выращивали на Nutrient agar (Difco) в течение 24–48 ч при 37 °С. Для выделения геномной ДНК 200 мкл бактериальной суспензии в 0,15 М NaCl (рН 7,2) плотностью $2 \cdot 10^9$ м.к./мл смешивали с равным объемом лизирующего буфера (20 мМ трис-НCl, 100 мМ KCl, 5 мМ 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, прогревали при 96 °С 30 мин для инактивации фермента, центрифугировали (10000 об./мин, 1 мин) и хранили до использования при –20 °С.

Амплификацию проводили на приборе С1000

Характеристика сконструированных олигонуклеотидных праймеров для детекции и типирования генов β-лактамаз патогенных буркхольдрий

Праймер	Последовательность, 5' – 3'	Генетическая мишень	Локализация	Размер ампликона, п.н.
<i>bm1F1</i> <i>bm4R1</i>	ttcccgcatcgccgtgatga cttggtccgagcatccatgc	Ген β-лактамазы класса А <i>Burkholderia mallei</i> 10247 (Genbank access. CP000547 локус BMA10247_A1040)	41–61 нуклеотид 700–720 нуклеотид	680
<i>bm1F2</i> <i>bm14R2</i>	acgttcctcgccgcgacggaac ccggatgatgtttcgtagtagccgtg	Ген β-лактамазы класса В <i>Burkholderia mallei</i> ATCC 23344 (Genbank access. CP000011 локус BMA_A0168)	10–32 нуклеотид 337–361 нуклеотид	352
<i>bps1F3</i> <i>bps1R3</i>	acggcaattctcctatgcga ctcgtcagggttgcgtccggagt	Ген β-лактамазы класса В <i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106b (Genbank access. PRJNA16181 локус BURPS1106B_2313)	9–29 нуклеотид 713–735 нуклеотид	727
<i>bps1F4</i> <i>bps8R4</i>	cgcattcgttttctgggtgcat tctgcagcgacgacgcgatcca	Ген β-лактамазы класса D <i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106b (Genbank access. PRJNA16181 локус BURPS1106B_2455)	27–50 нуклеотид 445–466 нуклеотид	440
<i>bps3F5</i> <i>bps8R5</i>	tctgtgctgctgcgcgacgagat gcacagccagttcgcgagtcgga	Ген β-лактамазы класса В <i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106b (Genbank access. PRJNA16181 локус BURPS1106B_A3704)	132–155 нуклеотид 299–321 нуклеотид	190

(«BioRad», США). Программа амплификации для всех пар праймеров состояла из этапов начального прогрева проб при 94 °C 5 мин, 35 реакционных циклов (денатурация 94 °C 30 с, отжиг праймеров 59,9 °C 30 с, удлинение цепи 72 °C 45 с) и финальной элонгации 72 °C в течение 1 мин.

Объем реакционной смеси на 1 пробу составлял 25 мкл. В состав реакционной смеси входили праймеры в конечной концентрации 15 нМ, 1 ед. *DiaTaq* ДНК-полимеразы и 1·ПЦР-буфер с дНТФ и $MgCl_2$ (ИнтерЛабСервис, Россия). Анализируемые препараты геномной ДНК вносили в реакционную смесь в объеме 1 мкл. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1,5 % агарозном геле и визуализировали окрашиванием бромистым этидием.

Результаты и обсуждение

Выбор кодирующих последовательностей генов *Burkholderia*, гомологичных генам β-лактамаз был проведен на основе анализа девяти первично аннотированных геномов *B. pseudomallei*, *B. mallei* и близкородственного непатогенного вида *B. thailandensis* (Genbank access. CP000011, CP000545, CP000547, CP000525, CP000572, CP000124, CP000570, BX571965, CP000085), а также 12 частично аннотированных геномов штаммов данных видов микроорганизмов, представленных в GenBank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) и базе данных геномных проектов J. Craig Venter Institute (<http://gsc.jcvi.org/projects>).

В результате было выбрано 118 кодирующих последовательностей β-лактамаз, формирующих 5 групп гомологии и относящихся к молекулярным классам А

(1 группа), В (3 группы) и D (1 группа). Далее было сгенерировано 42 пары олигонуклеотидных праймеров, комплементарных консервативным фрагментам генов β-лактамаз, входящих в данные группы гомологии. Анализ специфичности всех предварительных вариантов олигонуклеотидов *in silico* в PrimerBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) позволил сформировать набор из 5 пар олигонуклеотидов, комплементарных фрагментам генов классов А, В и D буркхольдрий и имеющих практически идентичную температуру отжига (таблица).

Результаты ПЦР-детекции последовательностей β-лактамаз различных молекулярных классов в препаратах геномной ДНК штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа, родственных видов буркхольдрий и гетерологичных микроорганизмов приведены на рис. 1. Фрагмент гена *penA* размером 680 п.н. (праймеры *bm1F1-bm4R1*) обнаружен в геномах всех исследованных штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* и *B. cepacia*. Специфический участок гена металло-β-лактамазы класса В (праймеры *bm1F2-bm14R2*) размером 352 п.н. обнаружен также только у видов буркхольдрий. Фрагмент гена металло-β-лактамазы класса В (праймеры *bps1F3-bps1R3*) размером 727 п.н. отмечен только в штаммах *B. pseudomallei* и *B. mallei*. Вариант металло-β-лактамазы (праймеры *bps3F5-bps8R5*, размер ампликона 190 п.н.) обнаруживается как у видов буркхольдрий, так и видов отдаленной гетерологии (*V. cholerae*, *P. aeruginosa*). Ген β-лактамазы класса D (праймеры *bps1F4-bps8R4*, размер ампликона 440 п.н.) был детектирован в исследуемых штаммах *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*.

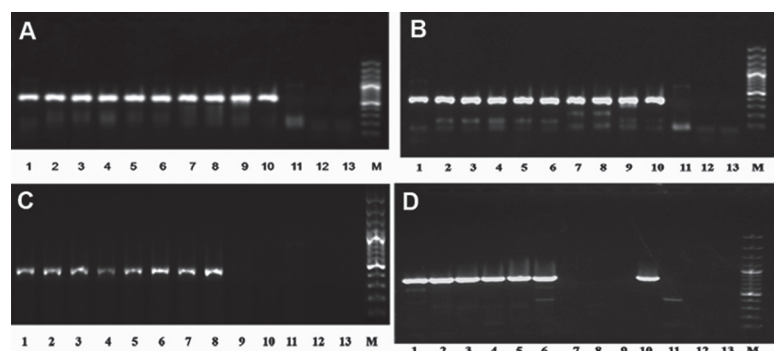


Рис. 1. Детекция генов β-лактамаз классов А, В и D буркхольдрий в ПЦР с праймерами *bm1F1-bm4R1* (А), *bm1F2-bm14R2* (В), *bps1F3-bps1R3* (С) и *bps1F4-bps8R4* (D):

Штаммы: 1 – *B. pseudomallei* 56830; 2 – *B. pseudomallei* 100; 3 – *B. pseudomallei* 114; 4 – *B. pseudomallei* 135; 5 – *B. pseudomallei* 139; 6 – *B. pseudomallei* C141; 7 – *B. thailandensis* E264; 8 – *B. thailandensis* E299; 9 – *B. mallei* 11-54; 10 – *B. cepacia* 25416; 11 – *P. aeruginosa* 215; 12 – *V. cholerae* O139 Bengal; 13 – *V. cholerae* O1 El Tor B-139; М – ДНК ледер с шагом 100 п.н. (100–1000 п.н.).

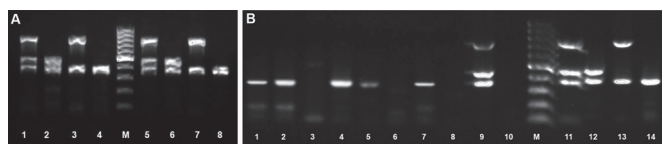


Рис. 2. Детекция генов β -лактамаз классов В и D в мультилокусной ПЦР с праймерами *bps1F3-bps1R3*, *bps1F4-bps8R4* и *bm1F2-bm14R2*:

A: 1 – *B. pseudomallei* 56830; 2 – *B. thailandensis* E264; 3 – *B. mallei* Ц-5; 4 – *B. cepacia* 25416; 5 – *B. pseudomallei* 139; 6 – *B. thailandensis* E299; 7 – *B. mallei* 10230; 8 – *B. cepacia* 3189.
B: 1 – *B. cepacia* 323; 2 – *B. cepacia* 506; 3 – *B. cepacia* 1934; 4 – *B. cepacia* 25416; 5 – *B. cepacia* 3189; 6 – *B. cepacia* 8235; 7 – *B. cepacia* 8237; 8 – *B. cepacia* 8240; 9 – *B. pseudomallei* C141; 10 – *V. cholerae* O139 Bengal; 11 – *B. pseudomallei* 56830; 12 – *B. thailandensis* E264; 13 – *B. mallei* Ц-5; 14 – *B. cepacia* 25416; М – ДНК ледер с шагом 100 п.н. (100–1000 п.н.)

Учитывая то обстоятельство, что праймеры, специфичные генам металло- β -лактамаз (*bps1F3-bps1R3*, *bps1F4-bps8R4*) и оксациллиназ (*bm1F2-bm14R2*), продемонстрировали возможность дифференциации между видами буркхольдерий, относящихся к группе «*pseudomallei*» (*B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*), представлялось перспективным использовать их в формате мультилокусной ПЦР. Для постановки ПЦР в мультилокусном варианте данные три пары праймеров были использованы в эквимольном количестве (по 5 пМ).

Результаты ПЦР (рис. 2, А) продемонстрировали одновременную детекцию трех генетических локусов с праймерами *bps1F3-bps1R3*, *bps1F4-bps8R4* и *bm1F2-bm14R2* в штаммах *B. pseudomallei*, двух локусов с праймерами *bps1F4-bps8R4* и *bm1F2-bm14R2* в штаммах *B. thailandensis*, двух локусов с праймерами *bps1F3-bps1R3* и *bm1F2-bm14R2* в штаммах *B. mallei* и 1 генетического локуса с праймерами *bm1F2-bm14R2* в штаммах *B. cepacia*. Постановка мультилокусной ПЦР на широком наборе штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* и штаммов различных геномоваров *cepacia*-комплекса подтвердила возможность дифференциации между различными видами рода *Burkholderia* по набору генов β -лактамаз классов В и D (рис. 2, В).

Антибиотики β -лактаманной группы, в частности, цефалоспориновые и карбапенемовые соединения, стандартно используются в существующих схемах экстренной и пролонгированной терапии мелиоидоза и сапа. Опыт их применения в лечении больных мелиоидозом демонстрирует заметное число случаев развития резистентности возбудителя в ходе лечения и фатального исхода заболевания [2, 4, 5, 12]. Участие и роль собственных β -лактамаз мелиоидозного и сапного микробов в развитии устойчивости к антибиотикам β -лактаманной группы чрезвычайно мало освещены в современной научной периодике. Сообщалось, что возрастание резистентности *B. pseudomallei* к β -лактамам может быть обусловлена как расширением спектра ферментной инактивации, так и снижением чувствительности лактамаз микроба к ингибиторам, например клавулановой кислоте [3, 11].

Ранее были сконструированы праймеры, использованные для амплификации, последующего клонирования и функциональной характеристики

генов пенициллиназы (*penA*) и оксациллиназы (*oxa*) возбудителя мелиоидоза [3, 6, 9]. Предложенные авторами олигонуклеотиды фланкировали полную кодирующую последовательность соответствующих генов и использовались для их клонирования и оценки характера мутационных изменений при формировании резистентности к ампициллину, оксациллину и цефтазидиму. Единого набора олигонуклеотидных праймеров для детекции последовательностей β -лактамаз классов А (пенициллиназы), В (металло- β -лактамазы) и D (оксациллиназы, цефалоспориноазы) у патогенных видов рода *Burkholderia* до настоящего времени не разработано.

Результаты, полученные в настоящей работе, демонстрируют перспективность использования сконструированного набора праймеров для исследования распространенности β -лактамаз молекулярных классов А, В и D в геномах штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei* и родственных буркхольдерий, а также разработки систем генетической паспортизации штаммов возбудителей с целью решения практических задач генной диагностики и молекулярного типирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ambler R. The structure of β -lactamases. Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.) 1980; 289:321–31.
2. Chaowagul W. Recent advances in the treatment of severe melioidosis. Acta Trop. 2000; 74:133–7.
3. Cheung T., Ho P., Yuen K., Chau P. Cloning and expression of class A β -lactamase gene *blaA_{BPS}* in *Burkholderia pseudomallei*. Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46:1132–5.
4. Dance D.A., Wuthiekanun V., Chaowagul W., Suputtamongkol Y., White N.J. Development of resistance to ceftazidime and co-amoxiclav in *Pseudomonas pseudomallei*. J. Antimicrob. Chemother. 1991; 28:321–4.
5. Dance D.A., Wuthiekanun V., Chaowagul W., White N.J. The antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas pseudomallei*. Emergence of resistance in vitro and during treatment. Antimicrob. Chemother. 1989; 24:295–309.
6. Ho P., Cheung T., Yam W., Yuen K. Characterization of a laboratory-generated variant of BPS β -lactamase from *Burkholderia pseudomallei* that hydrolyses ceftazidime. Antimicrob. Chemother. 2002; 250:723–6.
7. Holden M.T., Titball R.W., Peacock S.J., Cerdano-Tarraga A.M., Atkins T. et al. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. Proc. Natl Acad. Sci USA. 2004; 101:14240–5.
8. Nierman W.C., DeShazer D., Kim H.S., Tettelin H., Nelson K.E. Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. Proc. Natl Acad. Sci USA. 2004; 101:14246–51.
9. Niamsup P., Wuthiekanun V. Cloning of the class D β -lactamase gene from *Burkholderia pseudomallei* and studies on its expression in ceftazidime-susceptible and resistant strains. J. Antimicrob. Chemother. 2002; 50:445–55.
10. Thompson J., Higgins D., Gibson T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 1994; 22:4673–80.
11. Tribuddharat C., Moore R.A., Baker P., Woods D.E. *Burkholderia pseudomallei* class A beta-lactamase mutations that confer selective resistance against ceftazidime or clavulanic acid inhibition. Antimicrob. Agents Chemother. 2003; 47:2082–7.
12. White N.J., Dance D.A., Chaowagul W., Wattanagoon Y., Wuthiekanun V., Pitakwatchara N. Halving of mortality of severe melioidosis by ceftazidime. Lancet. 1989; 2(8665):697–701.

Authors:

Romanova A.V., Zakharova I.B., Zamaraev V.S., Viktorov D.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russia. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Об авторах:

Романова А.В., Захарова И.Б., Замараев В.С., Виктор Д.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 22.11.11.

Д.В.Уткин, О.С.Кузнецов, П.С.Ерохин, А.Н.Спицын, О.А.Волох, Н.А.Осина

РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ИЗУЧЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ МЕТОДОМ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

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

Одним из методов изучения поверхностной структуры клеток возбудителей особо опасных инфекционных болезней и проведения морфометрического анализа является атомно-силовая микроскопия. Атомно-силовая микроскопия по получаемым результатам приближена к сканирующей электронной микроскопии, однако позволяет избежать трудоемкие и длительные процедуры подготовки образцов к исследованию, связанные с фиксацией, обезвоживанием и напылением проводящего слоя. Нами был разработан методический подход подготовки и анализа образцов возбудителей особо опасных инфекционных болезней с использованием методов атомно-силовой микроскопии, включающий выбор оптимальной подложки, режима обеззараживания и сканирования образцов.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, особо опасные инфекционные болезни, морфометрический анализ.

D.V.Utkin, O.S.Kuznetsov, P.S.Erokhin, A.N.Spitsyn, O.A.Volokh, N.A.Osina

Development of Methodological Approaches for Examination of Particularly Dangerous Infectious Diseases Agents by Means of Atomic Power Microscopy

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

The atomic power microscopy (APM) is used to study the cell surface structure of particularly dangerous infectious diseases agents and to carry out the morphometric analysis. APM shows similar results with scanning electron microscopy. However, its application makes it possible to avoid time-consuming and labour-intensive procedures of samples preparing for testing by fixation, dehydration and sputtering of conducting layer. Methodological approach has been elaborated for preparing and analysis of samples of agents of particularly dangerous infectious diseases by means of APM. This approach includes a selection of optimal substrate, mode of disinfection and scanning of samples.

Key words: atomic power microscopy (APM), particularly dangerous infectious diseases, morphometric analysis.

Атомно-силовая микроскопия является одним из современных методов изучения морфологии и локальных свойств поверхности твердых тел с высоким пространственным разрешением [2]. В последние 10 лет атомно-силовая микроскопия стала применяться для исследования поверхностной структуры клеток про- и эукариот, клеточных фрагментов, вирусов и биологических макромолекул (белков, нуклеиновых кислот) [1, 6, 9, 10]. Преимущества атомно-силовой микроскопии перед электронной микроскопией связаны с возможностью проведения исследований нативных и фиксированных биологических препаратов как на воздухе, так и в жидкости, без применения дополнительных меток и красителей, без создания условий вакуума и напыления металлами. Кроме того, атомно-силовая микроскопия позволяет изучать локальные свойства поверхности биологических объектов, такие как жесткость, пластичность и адгезивность. Данные свойства атомно-силовой микроскопии открывают новые возможности изучения биологических молекул, клеток микроорганизмов, решения фундаментальных и прикладных задач в микробиологии возбудителей особо опасных инфекционных болезней.

В ряде случаев при исследовании клеток бактерий методом атомно-силовой микроскопии не требуются специальные методы подготовки образцов, т.к. атомно-силовая микроскопия позволяет изучать как живые клетки, так и высушенные на воздухе. Однако исследование возбудителей особо опасных инфекционных болезней требует соблюдения биологической

безопасности при работе с биологическими объектами и обеззараживания микроорганизмов в соответствии с СП 1.3.1285-03 [4]. Нами установлено, что табельные средства обеззараживания возбудителей особо опасных инфекционных болезней, такие как кипячение, обработка формалином, фиксация спиртом приводят к нарушению морфологии клеток и поверхности клеточной стенки. Поэтому они не пригодны для подготовки микроорганизмов для атомно-силовой микроскопии. Регламентированные средства фиксации возбудителей инфекционных болезней для атомно-силовой микроскопии отсутствуют.

Целью данной работы стала разработка методических подходов подготовки микроорганизмов I–II групп патогенности для исследования методом атомно-силовой микроскопии.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы возбудителей особо опасных инфекционных болезней: *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis*, *B. neotomae* полученные из «Государственной коллекции патогенных бактерий» ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» и лаборатории препаратов против чумы и других особо опасных инфекций ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича. Штаммы микроорганизмов выращивали на твердых питательных средах (агаре Хоттингера (pH 7,2) – штаммы *Y. pestis*,

B. anthracis, агаре Хоттингера (pH 7,6) – *V. cholerae*, FT-агаре (pH 7,2) – *F. tularensis*, эугоник агаре (pH 7,2) – *Brucella spp.*) в течение 48 ч при температуре 28 °С (*Y. pestis*), 37 °С (остальные виды бактерий). Агаровые культуры бактерий в концентрации, соответствующей 5 (для *V. cholerae*) и 10 ед. (остальные виды микроорганизмов) отраслевого стандартного образца мутности (ОСО 42-28-85П), обеззараживали 2,5 % раствором глутарового альдегида в 0,1 молярном какодилатном буфере pH (7,2–7,4) в течение 2 ч при температуре 4 °С – для неспорообразующих и 5 % раствором глутарового альдегида в 0,1 молярном какодилатном буфере (pH 7,2–7,4) в течение 3 ч при температуре 50 °С – для спорообразующих (*B. anthracis*). Контроль специфической стерильности препаратов осуществляли в соответствии с Инструкцией по контролю специфической стерильности экспериментальных препаратов, приготовленных из культур чумного и холерного микробов (Саратов, 1982). Клетки бактерий после обеззараживания осаждали центрифугированием при 6000 об./мин в течение 15–20 мин, осадок отмывали дважды стерильной дистиллированной водой и хранили при температуре 4 °С. Для проведения атомно-силовой микроскопии полученную взвесь клеток в объеме 4 мкл помещали на поверхность подложки и высушивали на воздухе.

Исследования клеток проводили с помощью сканирующего зондового микроскопа Solver P47-PRO (NT-MDT, Россия) методом полуконтактной атомно-силовой микроскопии в воздушной среде. При этом использовали полуконтактные кремниевые зонды серии NSG01 (NT-MDT, Россия) жесткостью 5,1 Н/м, с радиусом кривизны 10 нм и резонансной частотой 150 кГц. Обработку и анализ изображений проводили с использованием программы Image Analysis (NT-MDT, Россия).

Результаты и обсуждение

При выборе подложки для проведения атомно-силовой микроскопии оценивали размах высот поверхности и среднеквадратичную шероховатость в нанометрах (нм). Традиционно в качестве подложки

для атомно-силовой микроскопии используют слюду, пирографит и другие слоистые материалы. В работе была изучена возможность применения альтернативных подложек (покровное стекло, полистирол, нитроцеллюлозная мембрана) в качестве субстрата для микроскопии клеток микроорганизмов. Установлено, что покровное стекло по своим физическим характеристикам (среднеквадратичная шероховатость поверхности стекла составляет 3–9 нм) приближено к слюде (среднеквадратичная шероховатость слюды – 4–15 нм) и может быть использовано при проведении исследований клеток микроорганизмов.

В связи с тем, что данные по обеззараживанию проб возбудителей особо опасных инфекционных болезней для атомно-силовой микроскопии в литературе отсутствуют, для подготовки неспорообразующих микроорганизмов I–II групп патогенности нами был использован режим фиксации, описанный для других видов грамотригативных бактерий (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), включающий обработку 2,5 % раствором глутарового альдегида в течение 2–2,5 ч при температуре 4 °С [8, 10]. Для обеззараживания культур возбудителя сибирской язвы применили режим дезинфекции спор 5 % раствором глутарового альдегида, нагретого до температуры 50 °С [5]. Фиксацию проводили в течение 3 ч. Установлено, что данные режимы обработки клеток бактерий I–II групп патогенности приводят к полному обеззараживанию материала. Полученные результаты подтверждены комиссионными испытаниями. Отмечено, что фиксация возбудителей особо опасных инфекционных болезней глутаровым альдегидом сохраняет морфологию бактериальных клеток, целостность поверхностных структур, эпителии и рецепторы для прикрепления специфических иммуноглобулинов и бактериофагов.

При проведении исследований были подобраны оптимальные режимы сканирования образцов. Программное обеспечение сканирующего зондового микроскопа Solver P47-PRO позволяет проводить морфометрический анализ клеток микроорганизмов и определять такие параметры, как длина, ширина, периметр клетки, площадь сечения клетки. Морфометрические показатели клеток, установлен-

Морфометрические показатели клеток микроорганизмов

Вид микроорганизма	Длина клетки, по данным АСМ, мкм M±m	Ширина клетки, по данным АСМ, мкм M±m	Среднеквадратичная шероховатость клетки, нм M±m	Размеры клеток согласно литературным данным [3], мкм длина × ширина
<i>Y. pestis</i>	2,27±0,12	0,83±0,03	30±2	1–3 × 0,5–0,8
<i>B. anthracis</i>	2,47±0,09	1,22±0,06	109±11	1,2–10 × 0,5–2,5
<i>F. tularensis</i>	0,70±0,04	0,60±0,02	12±1	0,2–0,7 × 0,2
<i>B. abortus</i>	0,70±0,04	0,60±0,02	28±5	0,6–1,5 × 0,5–0,7
<i>B. melitensis</i>	1,20±0,04	0,45±0,04	23±5	
<i>B. suis</i>	1,00±0,04	0,50±0,04	27±5	
<i>B. canis</i>	0,60±0,04	0,60±0,04	30±5	
<i>B. ovis</i>	0,70±0,04	0,60±0,04	18±5	
<i>B. neotomae</i>	1,00±0,04	0,60±0,04	30±5	
<i>V. cholerae cholerae</i>	2,74±0,10	0,54±0,01	12±1	1,4–2,6 × 0,5–0,8
<i>V. cholerae eltor</i>	1,78±0,06	0,66±0,02	14±1	
<i>V. cholerae O139</i>	2,26±0,16	0,63±0,02	15±1	
<i>V. cholerae nonO1</i>	1,92±0,05	0,56±0,02	18±2	

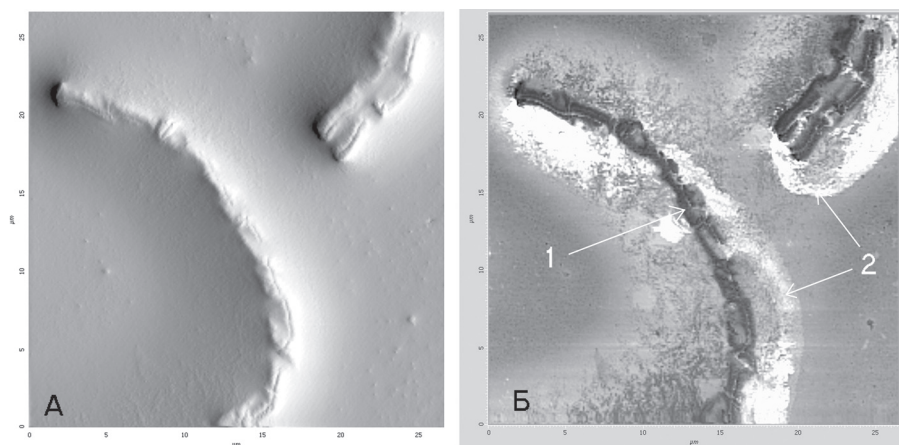


Рис. 1. АСМ-изображение клеток *B. anthracis* 759/79:

А – метод рассогласования; Б – метод отображения фазы. Увеличение $\times 3000$. Стрелками указаны: 1 – вегетативные клетки *B. anthracis*; 2 – капсулоподобное вещество

ные с помощью АСМ соответствовали литературным данным (таблица). АСМ позволяет определять также трехмерные характеристики бактериальных клеток (высоту, объем, среднеквадратичную шероховатость поверхности клеток). Показатель шероховатости поверхности клеток (таблица) указывает на степень укладки пептидогликана и может служить дополнительной характеристикой клеток.

Для увеличения разрешения АСМ-изображений и выявления структур в нанометровом диапазоне был использован полуконтактный метод рассогласования АСМ и метод отображения фазы (рис. 1). При этом было обнаружено капсулоподобное вещество, окружающее цепочки клеток возбудителя сибирской язвы *B. anthracis*, не выявляемое обычными методами АСМ, и жгутики у холерного вибриона (рис. 2). Преимущества АСМ связаны с отсутствием специальных методов окрашивания для выявления спор, капсул, жгутиков бактерий, используемых в световой микроскопии.

Таким образом, в результате проведенных исследований подобраны оптимальные условия подготовки и анализа образцов возбудителей особо опасных инфекционных болезней с использованием методов атомно-силовой микроскопии, включающие выбор подложки, режима обеззараживания и фиксации об-

разцов, сканирования и использования различных методов атомно-силовой микроскопии для повышения информативности, разрешающей способности метода и выявления субклеточных структур в нанометровом диапазоне.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арчаков А.И., Згода В.Г., Иванов Ю.Д., Кайшева А.Л., Крохин Н.В., Плешакова Т.О. и др. Визуализация и идентификация вирусных частиц гепатита при помощи атомно-силовой микроскопии, сопряженной с МС/МС анализом. Биомедицинская химия. 2010; 1:26–39.
2. Миронов В.Л. Основы сканирующей зондовой микроскопии. Нижний Новгород; 2004. 114 с.
3. Холт Дж., редактор. Определитель бактерий Берджи. М.; 1997. 432 с.
4. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)». СП 1.3.1285-03». М.; 2003.
5. Федорова Л.И., Арефьева Л.С., Путинцева Н.А., Веремкович Н.А. Современные средства дезинфекции и дезинсекции. Характеристика, назначение, перспективы. М.; 1991. 51 с.
6. Chada V.G.R., Sanstad E.A., Wang R., Driks A. Morphogenesis of *Bacillus* Spore Surfaces. J. Bacteriol. 2003; 185(21):6255–61.
7. Dufrene Y.F. Application of atomic force microscopy to microbial surfaces: from reconstituted cell surface layers to living cells. Micron. 2001; 32:153.
8. Razatos A., Ong Y.-L., Sharma M.M., Georgiou G. Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998; 95(19):11059–64.
9. Stukalov O., Korenevsky A., Beveridge T.J., Dutcher J.R. Use of atomic microscopy and transmission electron microscopy for correlative studies of bacterial capsules. Appl. Environ. Microbiol. 2008; 74(17):5457–65.
10. Vadillo-Rodriguez V., Beveridge T.J., Dutcher J.R. Surface viscoelasticity of individual gram-negative bacterial cells measured using atomic force microscopy. J. Bacteriol. 2008; 190(12):4225–32.

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

1. Archakov A.I., Zgoda V.G., Ivanova Yu.D., Kaisheva A.L., Krokhin N.V., Pleshakova T.O. et al. [Visualization and identification of hepatitis C viral particles by atomic force microscopy combined with MS/MS analysis]. Biomeditsin. Khim. 2010; 1:26–39.
2. Mironov V.L. [Fundamentals of Scanning Probe Microscopy]. Nizhny Novgorod; 2004. 114 p.
3. Holt J., editor. [Bergey's Manual of Determinative Bacteriology]. M.; 1997. 432 p.
4. Sanitary and Epidemiological Rules. [Safety Work with Microorganisms of I–II Groups of Pathogenicity (Danger). SP 1.3.1285-03]. M.; 2003.
5. Fedorova L.I., Aref'eva L.S., Putintseva N.A., Veremkovich N.A. [Modern Techniques of Disinfection and Desinsection. Characteristic, Application and Prospects]. M.; 1991. 51 p.

Authors:

Utkin D.V., Kuznetsov O.S., Erokhin P.S., Spitsyn A.N., Volokh O.A., Osina N.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rus-rapi@microbe.ru

Об авторах:

Уткин Д.В., Кузнецов О.С., Ерохин П.С., Спицын А.Н., Волох О.А., Осина Н.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rus-rapi@microbe.ru

Поступила 11.11.11.

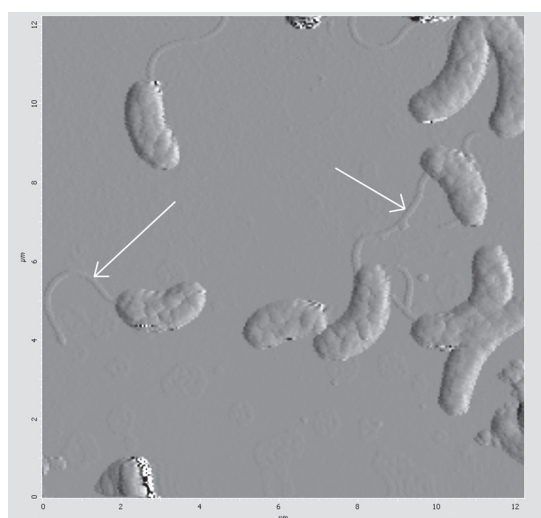


Рис. 2. АСМ-изображение клеток *V. cholerae* eltor M1289. Метод рассогласования. Увеличение $\times 8000$. Стрелками указаны жгутики холерного вибриона

О.К.Демина, Ар.А.Сергеев, О.В.Пьянков, А.Н.Шиков, Ал.А.Сергеев, С.А.Берилло, Е.И.Сергеева, А.П.Агафонов, А.Н.Сергеев

ДИССЕМИНАЦИЯ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ А/Н5N1 ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОМ ИНФИЦИРОВАНИИ КУР

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово

Изучена диссеминация вируса гриппа птиц (ВГП) в организме кур, инфицированных интраназально. Первичный орган накопления А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005) у кур находится в респираторном тракте животных (слизистая носовой полости), в котором вирус регистрируется уже через 18 ч после заражения, накопление патогена также наблюдается во многих органах и сыворотке крови кур и начинается через 30–42 ч после заражения. К моменту гибели животных (54 ч после заражения) концентрация вируса во всех исследованных пробах достигает максимальных значений. Наивысшие показатели накопления ВГП, превышающие 7 lg 50 % эмбриональных инфицирующих доз в г/(мл), отмечены в легких, сыворотке крови и почках животных. Показана высокая степень корреляции (коэффициент корреляции $r=0,89$) между результатами оценки концентрации ВГП путем титрования проб от животных с использованием куриных эмбрионов и ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Ключевые слова: вирус гриппа птиц А/Н5N1, курица, интраназальное заражение, динамика накопления вируса, ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

O.K.Demina, Ar.A.Sergeev, O.V.P'yankov, A.N.Shikov, Al.A.Sergeev, S.A.Berillo, E.I.Sergeeva, A.P.Agaonov, A.N.Sergeev

Dissemination of Influenza A/H5N1 Virus after Intranasal Inoculation of Chickens

State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

Studied was dissemination of avian influenza virus (AIV) in the organism of chickens after intranasal challenge with 10–100 LD₅₀. The primary organ of accumulation of AIV A/H5N1 (A/Chicken/Kurgan/05/2005 strain) is the respiratory tract (nasal mucosa), where the virus is registered in 18 hours after challenge. The accumulation of pathogen is observed in many organs and serum of chicken in 30–32 hours after challenge. The animals die in 54 hours, the concentration of virus reaches critical value in all studied samples. The highest AIV loads (7 lg of chicken embryo infective dose – EID₅₀/g or ml) are registered in lungs, blood serum and kidneys of chicken. The results of AIV loads measuring using titration and real time RT-PCR show high degree of correlation ($r=0.89$).

Key words: avian influenza A/H5N1 virus, chicken, intranasal infection, dynamics of virus accumulation, RT-PCR in real time.

В настоящее время существует множество работ, посвященных изучению патогенеза гриппа птиц у различных видов дикой и домашней птицы. Приводятся данные о поражении органов этих животных (сердце, мозг, почки, лимфоидная ткань, в том числе селезенка и тимус, трахея, легкие, надпочечники, поджелудочная железа и миндалины) [9, 11]. Во всех работах, связанных с изучением патогенеза этой инфекции у кур, представлена информация о накоплении патогена, как правило, на одну или несколько временных точек [5, 6, 8, 11]. До сих пор вопрос о последовательности распространения вируса гриппа птиц (ВГП) по органам и тканям инфицированных кур не до конца решен исследователями.

В связи с этим целью работы являлось изучение диссеминации ВГП в организме кур, инфицированных интраназально.

Материалы и методы

Вирус. В работе использовали высокопатогенный штамм ВГП подтипа H5N1, выделенный во

время эпизоотии среди кур в Курганской области – А/Chicken/Kurgan/05/2005, который был получен из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Данный штамм на 2-м пассаже (от источника выделения) при культивировании на развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) был наработан до концентрации 8,5 lg 50 % эмбриональных инфицирующих доз в 1 мл (ЭИД₅₀/мл) и хранился до использования в экспериментах в низкотемпературном холодильнике при –70 °С.

Животные. В исследованиях использовали кур кросса Хайсекс Браун генетической линии Род-Айленд массой 300 г, полученных из Новосибирской птицефабрики. Животных содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях [4]. Время наблюдения за инфицированной птицей составило 54 ч. Определение наличия вируса в пробах проводили на 9-суточных РКЭ кросса Хайсекс Браун генетической линии Род-Айленд.

Методы инфицирования кур. Заражение кур проводили интраназально с применением седативных средств, вводя каждому животному по 0,1 мл вирусосодержащего материала в дозе 10–100 ЛД₅₀.

Изучение динамики накопления вируса в организме кур

Подготовка проб материала. Умерщвление животных проводили методом цервикальной дислокации. В экспериментах использовали по 3 животных на временную точку. Фрагменты органов (стенки носовой полости, трахея, легкие, пищевод, желудок, тонкий и толстый кишечник, печень, поджелудочная железа, почка, клоака, селезенка, головной мозг, поперечно-полосатая мышечная ткань) и сыворотки крови отбирали через 1, 18, 30, 42 и 54 ч после заражения. Для анализа готовили 10 % гомогенаты органов механическим способом на стерильном растворе Хенкса с добавлением антибиотиков.

Метод титрования. Определение концентрации вируса в образцах гомогенатов органов и сыворотке крови птиц проводили путем титрования на РКЭ с последующей регистрацией вируса в реакции гемагглютинации [3]. Параллельно концентрацию вируса в пробах от кур определяли методом обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени. РНК из проб выделяли методом нуклеосорбции на силикагеле с использованием набора «РИБО-сорб» (производитель – ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора). Реакции обратной транскрипции и ПЦР-амплификации проводили с наборами реагентов «Реверта-Л» и «АмплиСенс Influenza virus A H5N1-FL» в соответствии с инструкциями производителя (ФГУН «ЦНИИ эпидемиологии»

Роспотребнадзора). ПЦР и детекцию продуктов амплификации в режиме реального времени производили в аппарате «Rotor-Gene 6000» (Corbett Research, Австралия). Для учета накопления продуктов ПЦР в режиме реального времени были использованы стандартные образцы в виде кДНК, полученные из разведений ВЖ с концентрациями вируса 5,5 и 1,5 lg ЭИД₅₀/мл. Контрольные образцы были приготовлены из ВЖ с титром 8,5 lg ЭИД₅₀/мл путем последовательных 10-кратных разведений. Из пробы от каждого разведения выделена РНК, синтезирована кДНК и проведена ПЦР с учетом накопления продуктов реакции в режиме реального времени. Вычисление накопления продуктов ПЦР при проведении реакции с исследуемыми образцами проводили путем обработки результатов в стандартной программе аппарата «Rotor-Gene 6000», используя известные значения концентраций контрольных образцов.

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку и сравнение результатов осуществляли стандартными методами [1]. Для установления статистических взаимосвязей был использован корреляционный анализ с установлением простой линейной корреляции (Пирсона) [2].

Результаты и обсуждение

На первом этапе были проведены исследования, с использованием РКЭ для титрования биологических проб, по изучению динамики распространения ВГП в организме кур, инфицированных 10–100 ЛД₅₀. Результаты исследований представлены в табл. 1. Отмечено, что первичным очагом накопления ВГП в организме кур при интраназальном инфицирова-

Таблица 1

Динамика накопления вируса гриппа птиц А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005) у кур при интраназальном заражении 10–100 ЛД₅₀

Вид органов и тканей	Концентрация ВГП в органах кур [lg ЭИД ₅₀ /г(мл)] через разные временные промежутки после инфицирования									
	1 ч		18 ч		30 ч		42 ч		54 ч	
	М	Sm	М	Sm	М	Sm	М	Sm	М	Sm
Стенки носовой полости	<0,2	-	0,43	0,27	1,60	0,21	3,15	0,29	5,80	0,17
Легкие	<0,2	-	<0,2	-	1,39	0,28	4,01	0,27	7,76	0,30
Клоака	<0,2	-	<0,2	-	1,05	0,22	2,17	0,27	6,39	0,27
Сыворотка крови	<0,2	-	<0,2	-	0,70	0,17	1,50	0,24	7,20	0,21
Почка	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	4,33	0,27	7,07	0,29
Кишечник (тонкий и толстый)	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	1,97	0,28	6,07	0,22
Печень	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	3,27	0,22	5,98	0,27
Селезенка	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	4,24	0,21	5,80	0,15
Головной мозг	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	3,67	0,21	5,66	0,27
Желудок	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	2,54	0,28	5,47	0,22
Поперечно-полосатая мышечная ткань	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	1,85	-	4,69	0,17
Трахея	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	1,47	0,27	3,66	0,17
Пищевод	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	2,00	0,30	3,57	0,27
Поджелудочная железа	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	0,62	0,21

Примечание: М – средняя концентрация вируса в грамме органа или миллилитре сыворотки крови; Sm – стандартное отклонение (коэффициент Стьюдента для оценки 95 % доверительных интервалов для всех величин составляет 1,96); 0,2 – величина в lg ЭИД₅₀/г(мл) чувствительности использованного метода титрования вируса; «-» – величина не определена.

нии является слизистая носовой полости, где вирус появляется через 18 ч после заражения и достигает максимальной концентрации к 54 ч (5,80 lg ЭИД₅₀/г). Позднее (через 30 ч) патоген регистрировали в легких, клоаке и сыворотке крови, к 54 ч после заражения отмечались высокие концентрации. Причем в легких в данный период наблюдается самое высокое накопление вируса (7,76 lg ЭИД₅₀/г) по сравнению с таковым в других органах и сыворотке крови кур. Затем (через 42 ч) ВГП обнаруживается практически во всех изучаемых органах. При этом обращает на себя внимание тот факт, что самых высоких концентраций вирус достигает в почках, кишечнике, печени, селезенке и головном мозге также к 54 ч после заражения.

В дальнейшем нами проведены исследования, связанные с изучением возможности использования метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени для количественной оценки накопления вируса гриппа птиц (ВГП) субтипа H5N1 во внутренних органах инфицированных птиц. После проведения ОТ-ПЦР в режиме реального времени и оценки концентрации вируса в органах методом титрования на РКЭ были получены данные, представленные в табл. 2. Данные корреляционного анализа указывают на наличие высокой положительной корреляционной связи между результатами, полученными методом ПЦР и инфицирования РКЭ ($r=0,89$), что говорит о возможности использования ПЦР для изучения накопления ВГП в органах животных и птиц.

Результаты исследования по выявлению у инфицированных кур первичного очага инфекции (слизистая носа) для ВГП (штамм A/Chicken/Kurgan/05/2005) подтвердили ранее полученные нами данные аналогичного эксперимента с использованием другого штамма ВГП: A/Chicken/Suzdalka/

Nov-11/2005. Появление вируса одновременно через 30 ч после заражения в крови, легких и клоаке свидетельствует о том, что его проникновение в эти органы происходит, скорее всего, гематогенным путем из слизистой носа, возможно, через эндотелий кровеносных сосудов обонятельной области. Более поздняя регистрация вируса в трахее, чем в легких, подтверждает это предположение, но не исключает вероятности существования нисходящего способа распространения патогена из носовой полости по дыхательному тракту кур.

К моменту гибели кур (через 54 ч после заражения) в некоторых органах их пищеварительной системы (тонком и толстом кишечнике, печени, желудке) вирус накапливается до высоких концентраций (5,0–6,1 lg ЭИД₅₀/г). Вероятно, эти органы инфицированных кур являются одним из источников поступления вируса в каловые массы. Более высокий уровень накопления вируса в этот период отмечен в клоаке, которая, несомненно, добавляет в ее содержимое существенную порцию патогена. Еще более высокие концентрации патогена регистрируются в почках (7,1 lg ЭИД₅₀/г) по сравнению с таковыми в пищеводе, желудке, тонком и толстом кишечнике, печени, поджелудочной железе и клоаке, что дает основание считать, что основной вклад в обсеменение патогеном клоакального содержимого инфицированных кур вносит вирус, поступающий в клоаку с мочой.

В последние годы для идентификации вируса гриппа и определения контаминации им объектов внешней среды используются молекулярно-биологические методы, в частности, коммерческие и лабораторные варианты тест-систем, основанные на ОТ-ПЦР [8] и количественной ПЦР с регистрацией сигнала накопления продуктов амплифика-

Таблица 2

Динамика накопления вируса гриппа птиц (ВГП) в органах и сыворотке крови интраназально инфицированных кур, оцененные с помощью методов ПЦР и титрования на РКЭ

Вид органа (время после заражения, ч)	Средняя концентрация ВГП в различных органах интраназально инфицированных кур, оцененная разными методами:	
	титрование на РКЭ, lg ЭИД ₅₀ /мл	ПЦР, lg копий РНК/мл
Стенки носовой полости (42)	3,7	3,8
Стенки носовой полости (54)	6,3	6,2
Легкие (30)	1,2	4,0
Легкие (54)	7,2	6,5
Трахея (54)	4,3	5,2
Сыворотка крови (30)	0,7	0
Сыворотка крови (54)	7,2	7,2
Мозг (42)	3,7	4,8
Мышца (42)	1,8	3,2
Мышца (54)	4,8	5,8
Кишечник (42)	2,2	2,0
Кишечник (54)	6,3	6,0
Селезенка (42)	4,2	3,2
Селезенка (54)	5,9	6,1
Желудок (54)	5,8	6,2

ции в режиме реального времени [7]. Однако эти молекулярно-биологические реакции не позволяют оценить концентрацию жизнеспособного (инфекционного) вируса в отличие от способа определения количества ЭИД₅₀ в исследуемом образце при титровании на РКЭ. Тем не менее, некоторые исследователи применяют метод ПЦР для изучения динамики накопления вируса гриппа птиц в органах животных и птиц [5]. Судя по результатам наших исследований по сравнительному изучению накопления ВГП в различных органах и сыворотке крови инфицированных кур, регистрируемого двумя методами (путем титрования на РКЭ и ОТ-ПЦР в режиме реального времени) с получением высокой степени корреляции между данными, применение этого молекулярно-генетического метода вполне оправдано. Наличие высокой положительной корреляционной зависимости между данными по накоплению ВГП в различных органах и сыворотке крови инфицированных кур, полученными с использованием двух методов – титрования на РКЭ и ОТ-ПЦР в режиме реального времени, свидетельствуют о том, что применение молекулярно-генетического метода вполне оправдано.

Таким образом, первичный орган накопления ВГП А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Kurgan/05/2005) у кур при интраназальном способе инфицирования дозой вируса 10–100 ЛД₅₀ находится в респираторном тракте животных (слизистая носовой полости), в котором патоген регистрируется уже через 18 ч после заражения, через 30–42 ч наблюдается во многих органах кур. К моменту гибели животных (54 ч после заражения) концентрация вируса во всех исследованных пробах органов достигает максимальных значений. При этом наивысшие показатели, превышающие 7 lg ЭИД₅₀/г (мл), отмечены в легких, сыворотке крови и почках животных. Показана высокая степень корреляции (коэффициент корреляции $r=0,89$) между результатами оценки концентрации ВГП путем титрования проб от животных с использованием куриных эмбрионов и ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: 1962.
2. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа; 1990. С. 208–215.
3. Мейхи Б., редактор. Вирусология. Методы. М.: Мир; 1988.
4. Национальный научно-исследовательский совет. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Вашингтон: Национальная Академия; 1996.
5. Antarasena C., Sirimujalin R., Prommuang P., Blacksell S.D., Promkuntod N., Prommuang P. Tissue tropism of a Thailand strain of high-pathogenicity avian influenza virus (H5N1) in tissues of naturally infected native chickens (*Gallus gallus*), Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) and ducks (*Anas spp.*). *Avian Pathol.* 2006; 35(3):250–3.
6. Das A., Spackman E., Thomas C., Swayne D.E., Suarez D.L. Detection of H5N1 high pathogenicity avian influenza virus in meat and tracheal samples from experimentally infected chickens. *Avian Dis.* 2008; 52(1):40–8.
7. Lee C.W., Suarez D.L. Application of real-time RT-PCR for the quantitation and competitive replication study of H5 and H7 subtype avian influenza virus. *J. Virol. Methods.* 2004; 119(2):151–8.
8. Pantin-Jackwood M.J., Swayne D.E. Pathobiology of Asian highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infections in ducks. *Avian Dis.* 2007; 51(1 Suppl):250–9.
9. Phipps L.P., Essen S.C., Brown I.H. Genetic subtyping of influenza A viruses using RT-PCR with a single set of primers based on conserved sequences within the HA2 coding region. *J. Virol. Methods.* 2004; 122(1):119–22.
10. Swayne D.E., Beck J.R. Experimental study to determine if low-pathogenicity and high-pathogenicity avian influenza viruses can be present in chicken breast and thigh meat following intranasal virus inoculation. *Avian Dis.* 2005; 49(1):81–5.
11. Swayne D.E. Understanding the complex pathobiology of high pathogenicity avian influenza viruses in birds. *Avian Dis.* 2007; 51(1 Suppl.):242–9.

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

1. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. L.: Medgiz; 1962. 180 p.
2. Lakin G.F. [Biometry]. M.: Vysshaya Shkola; 1990. P. 208–15.
3. Meikhi B., editor. [Virology Methods]. M.: Mir; 1988.
4. National Research Council. [Guide for the Maintenance and Use of Laboratory Animals]. Washington: National Academy of Sciences; 1996.

Authors:

Demina O.K., Sergeev Ar.A., P'yankov O.V., Shikov A.N., Sergeev Al.A., Berillo S.A., Sergeeva E.I., Agafonov A.P., Sergeev A.N. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia. E-mail: demina@vector.nsc.ru

Об авторах:

Демина О.К., Сергеев Ар.А., Пьянков О.В., Шиков А.Н., Сергеев Ал.А., Берилло С.А., Сергеева Е.И., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: demina@vector.nsc.ru

Поступила 21.06.11.

А.Л.Кравцов

ФОРМИРОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК – ЭФФЕКТИВНЫЙ МЕХАНИЗМ ЗАЩИТЫ ОРГАНИЗМА ОТ ПАТОГЕНА*ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

В обзоре обобщены и проанализированы современные литературные данные о способности клеток, реализующих механизмы врожденного иммунитета (нейтрофилов, эозинофилов и тучных клеток), формировать внеклеточные ловушки для захвата и киллинга патогенных микроорганизмов путем секреции ДНК и содержимого бактерицидных гранул в экстрацеллюлярное пространство. Эффективность улавливания и обезвреживания патогенов во внеклеточных ловушках выше, чем при фагоцитозе, и предполагают, что механизм внеклеточной бактерицидности играет важную роль в защите организма от бактерий, обладающих устойчивостью к лейкоцитарному фагоцитозу.

Ключевые слова: внеклеточные ловушки, врожденный иммунитет, бактериальная инфекция, секреция ДНК, секреторная дегрануляция, лейкоцитарные протеазы, антибактериальные пептиды.

A.L.Kravtsov

Formation of Extracellular Traps – the Effective Mechanism of Organism Protection from Pathogen*Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov*

Summarized and analyzed are modern literature data on capability of cells (neutrophils, eosinophils and labrocytes) realizing the mechanisms of innate immunity, to form extracellular traps that capture and kill pathogens by secretion of DNA and antibacterial granules content into extracellular space. The efficiency of capture and bacterial clearance is higher in extracellular traps than that in phagocytosis. The mechanism of extracellular bactericidal activity is supposed to play an important role in protection of organism from bacteria which are resistant to phagocytosis by leukocytes.

Key words: extracellular space, innate immunity, bacterial infection, DNA secretion, secretory degranulation, leukocyte proteases, antibacterial peptides.

Для создания быстрой неспецифической защиты организма от патогенов в последние годы предложена новая концепция разработки вакцин, в основе которой лежит принцип стимуляции функциональной активности клеток системы врожденного иммунитета [7]. Важной частью врожденного иммунного ответа является, наряду с фагоцитозом, образование сетеподобных структур (ловушек) для киллинга бактерий во внеклеточном пространстве [36, 37, 44]. Интерес исследователей к оценке врожденного иммунного ответа по данному показателю обусловлен тем обстоятельством, что примированные нейтрофилы крови иммунного (сенсibilизированного) организма отвечают на повторный контакт со специфическим антигеном более интенсивными и быстрее развивающимися дегенеративными изменениями в ядрах и цитоплазме [1, 26]. Хотя на практике это давно используется (показатель повреждения нейтрофилов – тест ППН *in vitro*) для диагностики инфекционных заболеваний (например, туберкулеза), а также для оценки напряженности приобретенного в результате вакцинации антибактериального иммунитета [8], без учета недавно установленной способности нейтрофилов формировать внеклеточные ловушки сложно объяснить, каким образом «повреждение» нейтрофилов в периферической крови или в очаге инфекционного воспаления может предотвратить распространение бактерий по всему организму [44].

Целью настоящей работы явился обзор литерату-

ры, посвященной изучению процесса формирования внеклеточных ловушек нейтрофилами, тучными клетками и эозинофилами, а также роли этих структур в защите организма хозяина от патогенных бактерий.

Нейтрофильные внеклеточные ловушки (neutrophil extracellular traps – NETs)

Нейтрофилы являются одной из самых многочисленных клеточных популяций в организме, и в крови человека доля этих клеток врожденного иммунитета составляет более 90 %. Нейтрофильные гранулоциты выполняют функцию киллинга патогенных микроорганизмов с помощью NETs и фагоцитоза, а также функцию регуляции иммунного ответа организма хозяина путем модуляции экспрессии клеточных рецепторов и активности провоспалительных цитокинов [5].

Впервые NETs были зарегистрированы с использованием электронной микроскопии в 2004 г. [14] и на рис. 1 показано, как выглядят эти структуры, формируемые активированными нейтрофилами во внеклеточном пространстве, когда они захватывают и убивают бактерии. При образовании NETs происходит деконденсация ядерного хроматина и дезинтеграция ядерной оболочки с одновременным нарушением целостности мембран лизосомальных гранул, что следует за обязательной предварительной стимуляцией в клетках «респираторного взрыва» с высвобождением реактивных форм кислорода. Активированный нейтрофил еще сохраняет свою

жизнеспособность, когда в нем происходит смешивание ядерного хроматина с содержимым бактерицидных гранул и формируется сетеподобная структура, секретируемая впоследствии во внеклеточное пространство. При высвобождении данной структуры активированный («поврежденный») нейтрофил погибает [1]. Морфологически этот процесс, названный «NETosis», отличается от других классических процессов клеточной гибели – апоптоза и некроза, прежде всего, деконденсацией хроматина и дезинтеграцией ядерной оболочки, исчезновением цитоплазматических гранул и смешиванием ядерного содержимого с материалом цитоплазмы. Молекула ДНК высвобождается из клетки без фрагментации ее эндонуклеазами. При апоптозе, наоборот, хроматин конденсируется и происходит его фрагментация без нарушения целостности ядерной оболочки. При некрозе нарушается целостность самой клетки, она лизируется, но без развития изменений в гранулах и ядерной мембране. Сетеподобная структура, состоящая из молекулы ДНК и содержимого цитоплазматических гранул, при некрозе и апоптозе не образуется [21].

Так как обработка ДНКазой приводит к разрушению NETs (рис. 2), молекула ДНК считается основным структурным элементом внеклеточных ловушек, формируемых нейтрофильными гранулоцитами. Нити ДНК в составе NETs имеют диаметр 15–17 нм, а в комплексе с локализованными на них белками – от 25 до 50 нм. Катионные белки внеклеточных ловушек (сериновые лейкоцитарные протеазы, гистоны и антибактериальные пептиды – АБП) определяют способность данных структур к эффективному киллингу патогенных бактерий [32, 44].

Важнейшим компонентом нейтрофильных ловушек считается лейкоцитарная эластаза (ЛЭ) [32], расщепляющая при дегрануляции ядерные гистоны (H1, H4) и запускающая, таким образом, процесс деконденсации хроматина активированных нейтрофи-

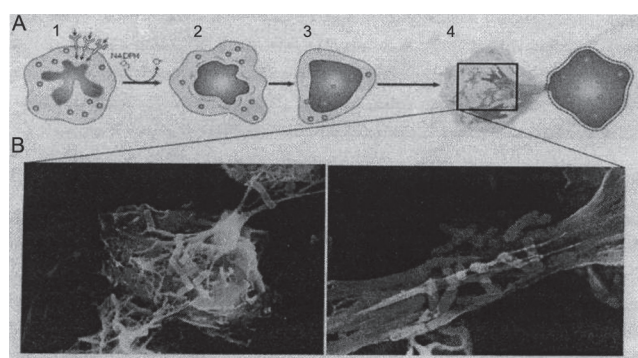


Рис. 1. **А.** Формирование NET активированными нейтрофилами. Активация нейтрофилов (1) приводит к «респираторному взрыву» и высвобождению реактивных форм кислорода. Нарушается целостность ядерной мембраны (2) и содержимое гранул смешивается внутри клетки с ядерным хроматином (3). Клеточная мембрана открывается и сетеподобная структура, состоящая из хроматина и бактерицидных катионных белков, высвобождается во внеклеточное пространство (4).

В. Снимок с сайта Института инфекционной биологии им. Макса Планка. Слева – нейтрофил выбрасывает свою ловчую сеть наружу, а справа – участок сети, в котором запутались бактерии рода *Shigella*

лов, необходимый для формирования NETs [39]. ЛЭ является протеазой, ответственной за избирательное расщепление бактериальных факторов вирулентности [46], за деградацию микробных антигенов, обладающих провоспалительными и иммуностимулирующими свойствами [33], а также за образование АБП из лизосомальных (небактерицидных) белков предшественников [18]. Этот катионный белок играет решающую роль в обезвреживании некоторых грамотрицательных микроорганизмов (например, *Borrelia burgdorferi* [23], *Pseudomonas aeruginosa* [27], *Escherichia coli* [19]) и считается ключевым белком врожденной антибактериальной защиты [46]. За счет адсорбции на молекуле ДНК достигается высокая концентрация ЛЭ в месте внедрения инфекционного агента. С другой стороны, адсорбция предотвращает (или ослабляет) повреждающий эффект этой самой опасной лейкоцитарной протеазы на белки плазмы крови и других тканей организма хозяина [32]. Кроме ЛЭ, в состав NETs входят: миелопероксидаза, катепсин G, желатиназа, АБП, гистоны, гуморальный паттернраспознающий рецептор пентраксин 3 и белки, распознающие пептидогликан [44].

Отрицательно заряженная молекула ДНК служит также основой для адсорбции участвующих в коагуляции плазменных сериновых протеаз (факторы XI, XII и калликреин), которые вместе с высокомолекулярным кининогеном входят в контактную систему. Образование NETs активирует контактную систему,

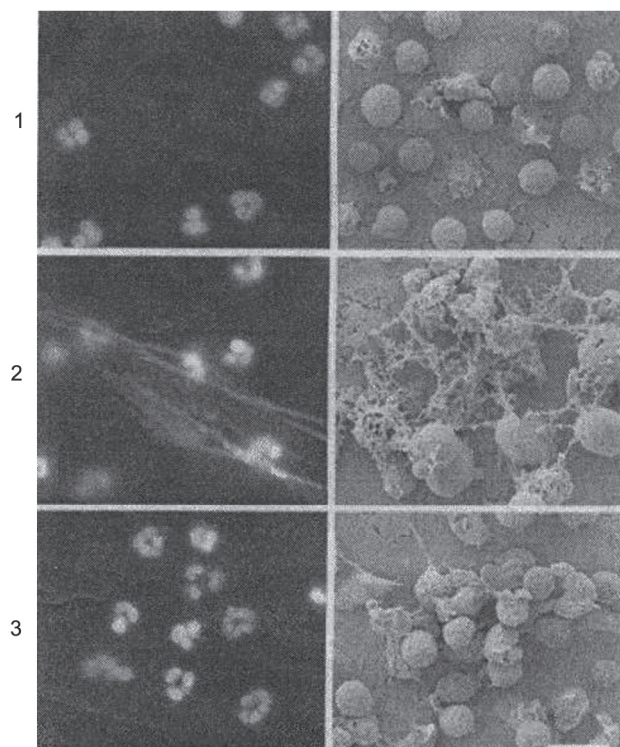


Рис. 2. Формирование NETs активированными нейтрофилами по данным световой (слева) и электронной (справа) микроскопии:

нейтрофилы до (1) и после (2) стимуляции комплексом фибриноген-белок M1 *S. pyogenes*, стимулированные нейтрофилы после обработки ДНКазой (3). Рисунок адаптирован из работы S.Oehmcke et al. [38]

что приводит к резкому повышению уровня секреции АБП и к усилению врожденного иммунного ответа [38]. Недавно полученные экспериментальные данные Т.А. Fuch *et al.* [22] наглядно иллюстрируют, что NETs – это основа для адгезии тромбоцитов и эритроцитов, ранее неизвестное связующее звено между инфекцией, воспалением и тромбозом. Важно, что NETs стимулируют внутрисосудистое свертывание крови, а препятствующий тромбообразованию гепарин предотвращает формирование NETs в образцах крови человека и животных.

Анализ литературы свидетельствует, что NETs формируют активированные нейтрофилы крови как человека [38], так и различных видов животных [14, 20, 44]. Запускать этот процесс могут различные провоспалительные стимулы, включая перекись водорода (H_2O_2), бактериальный липополисахарид (ЛПС), митоген форболмиристатацетат (ФМА) и хемокин интерлейкин-8 (ИЛ-8) (таблица). Стимулировать процесс образования NETs может также продукт расщепления 5-го компонента комплемента во время его активации в сыворотке крови (C5a), но только после примирования зрелых нейтрофилов интерферонами или фактором, стимулирующим образование колоний гранулоцитов и макрофагов (ГМ-КСФ) [35].

Сравнительные исследования, проведенные российскими учеными, показали, что эффективность захвата и киллинга бактерий NET структурами выше, чем при фагоцитозе. От данного механизма киллинга бактерий во многом зависит антибактериальная защита слизистых оболочек [1] и эффективность реализации нейтрофилами своего мощного бактерицидного потенциала в крови, обсемененной патогенными бактериями [26]. При бактериемии ЛПС активирует тромбоциты через TLR-4 (Toll-like receptor 4) типа на клеточной поверхности, что приводит к секреции этими клетками цитокинов. Цитокины индуцируют формирование стимулированными нейтрофилами NETs, которые захватывают и убивают бактерии в кровеносных сосудах [17, 34]. На добавление ЛПС чумного микроба в цельную кровь человека нейтрофилы уже через 30 мин отвечают, по данным проточной цитофлуориметрии, интенсивной азурофильной дегрануляцией [4] и, возможно, формируют внеклеточные ловушки, подобно тому, как это происходит в ответ на препарат «пирогенал» (ЛПС *P. aeruginosa*) при 30-минутной экспозиции в условиях *in vitro* [9]. Для запуска образования NETs может быть достаточен контакт с другими очищенными антигенами патогенных бактерий, например такими, как белок M1 *Streptococcus pyogenes* [31, 38] или поверхностный липофосфогликан *Leishmania amazonensis* [24]. Однако взаимодействие нейтрофилов с различными живыми микроорганизмами (таблица) оказывает более выраженный эффект на процесс образования NETs [14, 21]. Особо активны представители нормальной микрофлоры (*Bifidobacterium spp.*, *Lactobacterium spp.*), которые обитают в организме человека, постоянно активируют клетки врожденного иммунитета и, возможно, именно поэтому не проявляют свои патогенные свойства [1].

Время, необходимое для формирования NETs, составляет в зависимости от стимула от 10 мин до 4 ч [44].

На примере клеток *Staphylococcus aureus* в условиях *in vitro* было установлено, что нестимулированные (наивные) нейтрофилы обезвреживают бактерии сначала с помощью фагоцитоза, а затем путем образования NETs. Однако если нейтрофилы стимулировать ФМА или ЛПС, запустив процесс формирования NETs, то киллинг бактерий за счет фагоцитоза будет минимальным и они будут погибать в основном во внеклеточных ловушках. Спустя 3–4 ч после стимуляции, когда процесс образования ловушек завершается, киллерная активность нейтрофильных гранулоцитов по отношению к золотистому стафилококку на 100 % связана с функционированием NETs [21]. По нашим данным, гранулоциты цельной крови привитых против чумы людей отвечают *in vitro* на клетки чумного микроба, выращенные при 28 °C, более интенсивной секреторной дегрануляцией.

Факторы или микроорганизмы, вызывающие формирование внеклеточных ловушек

Фактор или микроорганизм	Тип клеток формирующих ловушки	Источник литературы
Интерлейкин –8 (ИЛ-8)	Нейтрофилы	[14]
Липополисахарид (ЛПС)	Нейтрофилы	[14]
Форболмиристатацетат (ФМА)	Нейтрофилы, тучные клетки	[14, 21, 43]
Перекись водорода	Нейтрофилы, тучные клетки	[21, 43]
Тромбоциты крови, активированные ЛПС через TLR4	Нейтрофилы	[17, 26, 34]
Интерферон (ИФН)γ + C5a	Нейтрофилы, эозинофилы	[35, 48]
Интерферон (ИФН)γ + ЛПС	Эозинофилы	[48]
Интерферон (ИФН)γ + эотаксин	Эозинофилы	[48]
ИЛ-5+ЛПС/C5a/эотаксин	Эозинофилы	[48]
Интерферон (ИФН)α + C5a	Нейтрофилы	[35]
ГМ-КСФ + C5a	Нейтрофилы	[35]
<i>Staphylococcus aureus</i>	Нейтрофилы, тучные клетки	[1, 14, 21, 43]
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Нейтрофилы, тучные клетки	[15, 38, 43]
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Нейтрофилы	[45]
Белок M1 <i>Streptococcus pyogenes</i> + фибриноген	Нейтрофилы, тучные клетки	[31, 38]
<i>Bifidobacterium spp.</i> и <i>Lactobacterium spp.</i>	Нейтрофилы	[1]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Тучные клетки	[43]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Нейтрофилы	[40]
<i>Candida albicans</i>	Нейтрофилы	[42]
<i>Escherichia coli</i>	Нейтрофилы	[1]
<i>Salmonella enterica</i>	Нейтрофилы	[14]
<i>Shigella flexneri</i>	Нейтрофилы	[14]
<i>Plasmodium falciparum</i>	Нейтрофилы	[11]
<i>Listeria monocytogenes</i>	Нейтрофилы	[14]
<i>Aspergillus nidulans</i>	Нейтрофилы	[12]
<i>Leishmania amazonensis</i>	Нейтрофилы	[24]
Липофосфогликан <i>L. amazonensis</i>	Нейтрофилы	[24]

Противочумная вакцинация активирует врожденный иммунный ответ на клетки чумного микроба, вероятно, путем стимуляции процесса формирования NETs [6]. Необходимы дальнейшие исследования в данном направлении с целью создания экспериментально-методической основы для оценки у людей напряженности приобретенного противочумного иммунитета.

Контроль за дегенеративными изменениями в ядерном хроматине и гранулах нейтрофилов можно осуществлять с помощью микроскопии [1, 26, 38], либо методом импульсной проточной цитофлуориметрии [4, 6, 29–30]. Разработанные в России оригинальные методы оценки содержания и антимикробной активности NETs в периферической крови и мукозальных секретах применяются на практике для определения эффективности иммуотропных препаратов и мукозальных вакцин [1].

Внеклеточные ловушки тучных клеток (Mast cell extracellular traps – MCETs) и эозинофильные внеклеточные ловушки (eosinophil extracellular traps – EETs)

На начальном этапе исследований считалось, что внеклеточные ловушки формируют только нейтрофилы. Однако в дальнейшем было установлено, что тучные клетки (ТК) также способны секретировать свою ядерную ДНК для образования внеклеточных ловушек. В связи с распространением данного феномена на другие клетки термины «NET и NETosis» было предложено заменить на «ЕТ и ETosis» [44].

ТК встречаются в коже, дыхательных путях, желудочно-кишечном тракте, а также в органах мочеполовой, эндокринной и нервной систем, где локализуются преимущественно вдоль кровеносных, лимфатических сосудов и нервных окончаний, в непосредственной близости к границе внешней и внутренней среды организма [10]. Они имеют общность происхождения с лейкоцитами и содержат в цитоплазматических гранулах мощный арсенал бактерицидных веществ, принимающих участие в антибактериальной защите [13]. Однако более распространено представление о ТК как эффекторах аллергических реакций или одноклеточных эндокринных железах, способных продуцировать различные классы биологически активных веществ (биогенные амины, пептидные гормоны, эйкозаноиды, цитокины, хемокины и др.). Механизмы киллинга бактерий ТК еще недостаточно изучены, но в последние годы отмечается повышенный интерес исследователей к их выяснению [10] и, в частности, формированию MCETs [44].

Способность ТК человека и мышей к секреции ядерной ДНК и формированию MCETs впервые была установлена в 2008 г. M. von Kockritz-Blickwede *et al.* [43] с помощью люминесцентной и сканирующей электронной микроскопии. В настоящее время такая способность зарегистрирована в опытах с различными патогенными микроорганизмами (таблица), включая *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes* [43], и, подобно формированию NETs, в ответ на белок M1 *S. pyogenes* [31]. Ключевыми компонентами MCETs являются молекула ДНК и гистоны ядерного хро-

матина, но по составу бактерицидных веществ эти структуры имеют принципиальное отличие от NETs. Вместо эластазы, миелопероксидазы и катепсин G, они содержат специфическую протеазу ТК триптазу и специфический АБП LL-37 [44]. В отличие от NETs, MCETs нельзя инактивировать только путем обработки их ДНКазой и требуется дополнительная обработка миелопероксидазой для деградации триптазы [43]. Механизм гибели ТК при формировании ловушек такой же, как и при образовании NETs, и также занимает по времени от 10 мин до 4 ч [44].

Эозинофилы демонстрируют сходные с нейтрофилами феномены созревания, за исключением того, что, видимо, у них формируется только один тип гранул. Эти клетки имеют обыкновение появляться в местах локализации чужеродных белков и паразитов, а также при аллергических реакциях. Однако роль эозинофилов в иммунитете, их точная функция (и) в защите организма от патогенных бактерий остается неясной [3]. Поэтому важным достижением в изучении механизмов врожденной антибактериальной защиты явилось установление факта катапультаподобного выброса (catapult-like ejection) эозинофилами митохондриальной ДНК для обезвреживания патогенных микроорганизмов [48]. Этот процесс занимает по времени не часы и минуты, а секунды. Подобно NETs, обработка EETs ДНКазой приводит к их разрушению и, как следствие, к неспособности функционирования механизма внеклеточной бактерицидности эозинофильных гранулоцитов [44]. За счет выброса содержимого своих гранул на поверхность паразитов, эозинофилы обнаруживают исключительную способность к их повреждению и уничтожению [3].

Формирование ETs при различных заболеваниях. Механизмы, используемые микробами для предотвращения захвата и бактерицидного эффекта ETs

Механизм внеклеточной бактерицидности, лежащий в основе нефагоцитарного типа тканевой резистентности [2], играет важную роль в киллинге грамположительных и грамотрицательных бактерий, микобактерий, грибов и паразитов (таблица), но вопрос о способности ETs захватывать и убивать вирусы остается открытым [36, 44]. Иерсинии, сальмонеллы и другие факультативные внутриклеточные паразиты в результате частичного (или полного) обезвреживания продуктами секреции нейтрофилов быстро подвергаются завершённому фагоцитозу макрофагами. Они утрачивают способность к размножению в макрофагах [2, 41].

Имеются сообщения о формировании ETs в условиях *in vivo* при различных заболеваниях, включая аппендицит [14], бактериальный вагиноз [1], малярию [11], кожный лейшманиоз [24], экспериментальную дизентерию [14], отиты [28], системную красную волчанку [25], пневмонию [37, 45] и инвазивный бронхолегочный аспергиллез [12]. Неспособность клеток врожденного иммунитета формировать ETs приводит к сепсису и другим инфекционным осложнениям, что, в частности, характерно для всех ново-

рожденных, обладающих в сравнении со взрослыми повышенной чувствительностью к инфекционным заболеваниям, вызываемым условно-патогенной микрофлорой [47]. При нарушении регуляции формирования и удаления ETs образуются аутоантитела к ДНК, гистонам, эластазе и другим белкам нейтрофилов крови [25], но роль ETs при аутоиммунных заболеваниях до конца неясна и в настоящее время является объектом изучения [11, 25, 32, 44].

Несколькими независимыми группами исследователей было установлено, что патогенные бактерии могут использовать для распространения в организме хозяина процесс разрушения ETs нуклеазами. Штаммы *S. pyogenes*, лишенные продукции кодируемой бактериофагом ДНКазы Sda1, обладали повышенной чувствительностью к киллингу NETs и пониженной степенью вирулентности, в то время как гетерологичная экспрессия Sda1 у других бактериальных штаммов приводила к неспособности нейтрофилов убивать микробные клетки вследствие разрушения NETs нуклеазой [15]. Приобретением кодируемой бактериофагом ДНКазы Sda1 и генетическим «переключением» на инвазивный фенотип по данному показателю объясняют причину быстрого распространения гипервирулентного клона M1 серотипа *S. pyogenes* по всему организму и развития различных инфекций кожи и мягких тканей, включая некротизирующие фасциты [15, 44]. Поверхностный белок M1, являющийся фактором вирулентности *S. pyogenes*, связывает АБП, что приводит к неспособности NETs и MCETs убивать стрептококки [31]. Установлена способность ДНКазы EndA *S. pneumoniae* разрушать NETs, что определяет устойчивость этого вида бактерий к киллингу нейтрофилами и, как следствие, их повышенную вирулентность при изучении на модели экспериментальной пневмонии мышей [20, 44].

От бактерицидного эффекта NETs микробную популяцию защищает образование биопленок [28]. Кроме того, чтобы защитить свои структурные белки и факторы вирулентности от разрушительного действия ЛЭ, патогенные бактерии продуцируют специальный ингибитор (экотин), специфически подавляющий активность этой сериновой трипсинаподобной протеазы. Мутанты, лишенные продукции экотина, обладают сниженной вирулентностью и их скорость размножения в условиях *in vivo* в сотни раз ниже, чем диких штаммов. Причем, это характерно для бактерий, патогенных для людей и животных (*Yersinia pestis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* и др.), но не для растений [19]. *Y. pestis* как возбудитель самой эпидемически опасной бактериальной инфекции (первично-легочной форму чумы) в 2 раза больше влияет на уровень экспрессии другого специфического ингибитора ЛЭ (Neutrophil/Monocyte Elastase Inhibitor или N/M EI) в лейкоцитах крови человека, чем близкородственный возбудитель псевдотуберкулеза. На возбудитель кишечного иерсиниоза в аналогичных экспериментальных условиях реакция по данному показателю отсутствовала. Хотя с помощью протеомики была изучена экспрессия 12 различных

лейкоцитарных белков, участвующих в регуляции иммунного ответа организма хозяина, особой реакции на чумные микробы не зарегистрировано ни по какому другому показателю [16].

По данным проточной цитофлуориметрии, живые чумные микробы, выращенные с аэрацией на жидкой питательной среде с температурой 37 °C (экспоненциальная культура), совсем не вызывают, попадая в цельную кровь человека, дегенеративные изменения в ядерном хроматине и бактерицидных гранулах клеток врожденного иммунитета в течение первых 6–8 ч инкубации крови при 37 °C. Поскольку такие изменения неизменно развиваются к 4 ч в ответ на клетки золотистого стафилококка и чумные микробы, выращенные при 28 °C [29, 30], можно предположить, что у возбудителя чумы имеется эффективный, но еще неизученный механизм подавления в крови человека процесса формирования NETs, связанный с изменением фенотипа при повышении температуры от 28 до 37 °C. Если это так, то для обезвреживания чумного микроба, вероятно, необходимо запустить процесс формирования внеклеточных ловушек, активировав клетки врожденного иммунитета пробиотиками или каким-либо другим иммуностимулирующим препаратом (ЛПС, белком M1 *S. pyogenes* и т.д.).

Таким образом, в антибактериальной защите важную роль играет, наряду с фагоцитозом, механизм внеклеточной бактерицидности нейтрофилов, эозинофилов, тучных клеток и, возможно, других клеток, участвующих в реализации механизмов врожденного иммунитета. На современном этапе развития науки наблюдается тенденция к переходу от изучения внутриклеточных, к исследованию еще недостаточно изученных внеклеточных механизмов бактерицидности. Необходимы исследования, направленные на изучение процесса формирования NETs в крови человека и животных под влиянием штаммов возбудителей особо опасных инфекций (чумы, сибирской язвы, холеры, туляремии и др.) с различными фенотипическими и генотипическими свойствами. Результаты изучения процесса формирования внеклеточных ловушек под влиянием возбудителей особо опасных инфекций и их антигенов могут представлять интерес как в аспекте дальнейшего изучения взаимодействия макро- и микроорганизма, так и с точки зрения характеристики эффективности вакцин по степени их активирующего воздействия на секреторную функцию гранулоцитов крови людей и животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долгушин И.И., Андреева Ю.С., Савочкина А.Ю. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов. М.: Изд-во РАМН; 2009. 208 с.
2. Исачкова Л.М., Плехова Н.Г. К развитию представлений об антиинфекционной резистентности. Эпидемиол. и инф. бол. 2002; 1:11–5.
3. Козинец Г.И., Высоцкий В.В., Погорелов В.М. и др. Кровь и инфекция. М.: Трида-Фарм; 2001. 456 с.
4. Кравцов А.Л., Гребенюкова Т.П., Тараненко Т.М., Кузнецов О.С., Храмченкова Т.А., Наумов А.В. Проточнocyтoфлуориметрический мониторинг за развитием азурофильной дегрануляции нейтрофилов в цельной крови человека в

ответ на эндотоксин *Yersinia pestis*. Пробл. особо опасных инф. 1999; 79:81–9.

5. Кравицов А.Л., Шмелькова Т.П. Секреторная дегрануляция нейтрофилов как триггер воспаления и регулятор иммунного ответа: роль сериновых лейкоцитарных протеаз и протеолитически активируемых рецепторов. Эпидемиол. и вакцинопрофилактика. 2011; 1(56):79–87.

6. Кравицов А.Л., Шмелькова Т.П., Шуковская Т.Н. Влияние противочумной вакцинации на функциональную активность клеток врожденного иммунитета человека. Пробл. особо опасных инф. 2011; 1(107):77–80.

7. Семенов Б.Ф., Зверев В.В. Концепция создания быстрой иммунологической защиты от патогенов. Журн. эпидемиол. микробиол. и иммунобиол. 2007; 4:93–100.

8. Фрадкин В.А. Диагностика аллергии реакциями нейтрофилов крови. М.: Медицина; 1985. 176 с.

9. Шишкова Ю.С., Савочкина А.Ю., Рыжкова А.И., Мезенцева Е.А. Влияние препарата «пирогенал» на образование нейтрофильных внеклеточных ловушек. Мед. наука и образование Урала. 2009; 10(3):23–4.

10. Яглова Н.В. Тучные клетки и врожденный иммунитет. Иммунология. 2009; 2:139–42.

11. Baker V.S., Imade G.E., Molta N.B. et al. Cytokine-associated neutrophil extracellular traps and antinuclear antibodies in *Plasmodium falciparum* infected children under six years of age. Malar. J. 2008; 7:41.

12. Bianchi M., Hakkim A., Brinkmann V. et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. Blood. 2009; 114(13):2619–22.

13. Bischoff S.C., Kamer S. Human mast cells, bacteria, and intestinal immunity. Immunol. Rev. 2007; 217:329–37.

14. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 2004; 303:1532–5.

15. Buchanan J.T., Simpson A.J., Aziz R.K. et al. Dnase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. Curr. Biol. 2006; 16:396–400.

16. Chromy B.A., Perkins J., Heidbrink J.L. et al. Proteomic characterization of host response to *Yersinia pestis* and near neighbors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2004; 320:474–9.

17. Clark S.R., Ma A.C., Tavener S.A. et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. Nat. Med. 2007; 13:463–9.

18. Cole A.M., Shi J., Ceccarelli A. et al. Inhibition of neutrophil elastase prevents cathelicidin activation and impairs clearance of bacteria from wounds. Blood. 2001; 97(1):297–304.

19. Eggers C.T., Murray I.A., Delmar V.A. et al. The periplasmic serine protease inhibitor ecotin protects bacteria against neutrophil elastase. Biochem. J. 2004; 379 (Pt.1):107–18.

20. Ermert D., Urban C.F., Laube B. et al. Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. J. Innate Immun. 2009; 1:181–93.

21. Fuchs T.A., Abed U., Goosmann C. et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. J. Cell Biol. 2007; 176:231–41.

22. Fuchs T.A., Brill A., Duerschmied D. et al. Extracellular DNA traps promote thrombosis. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2010; 107(36):15880–5.

23. Garcia R., Gusmani L., Murgia R. et al. Elastase is the only human neutrophil granule protein that alone is responsible for *in vitro* killing of *Borrelia burgdorferi*. Infect. Immunity. 1998; 66(4):1408–12.

24. Guimaraes-Costa A.B., Nascimento M.T., Froment G.S. et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2009; 106:6748–53.

25. Hakkim A., Furnrohr B.G., Amann K. et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2010; 107(21):9813–8.

26. Hickey M.J., Kubers P. Intravascular immunity: the host-pathogen encounter in blood vessels. Nature Rev. Immunology. 2009; 9:364–74.

27. Hirche T.O., Benabid R., Delslee G. et al. Neutrophil elastase mediates innate host protection against *Pseudomonas aeruginosa*. J. Immunology. 2008; 181:4945–54.

28. Hong W., Juneau R.A., Pang B., Swords W.E. Survival bacterial biofilms within neutrophil extracellular traps promotes non-typeable *Haemophilus influenzae* persistence in the chinchilla model otitis media. J. Innate Immun. 2009; 1:215–24.

29. Kravtsov A.L., Grebenyukova T.P., Bobyleva E.V. et al. Flow cytometric assay of human whole blood leukocyte DNA degradation in response to *Yersinia pestis* and *Staphylococcus aureus*. Proc. SPIE. 2001; 4241:260–6.

30. Kravtsov A.L., Bobyleva E.V., Grebenyukova T.P. et al. Flow microfluorometric analysis of phagocyte degranulation in bacteria infected whole blood cell cultures. Proc. SPIE. 2002; 4707: 395–402.

31. Lauth X., von Köckritz-Blickwede M., McNamara C.W. et al. M1 protein allows group A streptococcal survival in phagocyte extracellular traps through cathelicidin inhibition. J. Innate Immun. 2009; 1:202–14.

32. Lee W.L., Grinstead S. The tangled webs that neutrophils weave. Science. 2004; 303:1477–8.

33. Lopez-Boado Y.S., Espinola M., Bahr S., Belaouaj A. Neutrophil serine proteinases cleave bacterial flagellin, abrogating its host response-inducing activity. J. Immunol. 2004; 172:509–15.

34. Ma A.C., Kubers P. Platelets, neutrophils and neutrophil extracellular traps in sepsis. J. Thromb. Haemost. 2007; 6:415–20.

35. Martinelli S., Urosevic M., Daryadel A. et al. Induction of genes mediating interferon-dependent extracellular trap formation during neutrophil differentiation. J. Biol. Chem. 2004; 279:44123–32.

36. Medina E. Neutrophil extracellular traps: a strategic tactic to defeat pathogens with potential consequences for the host. J. Innate Immun. 2009; 1(3):176–80.

37. Mizgerd J.P. Mechanisms of disease acute lower respiratory tract infection. N. Engl. J. Med. 2008; 358:716–27.

38. Oehmske S., Morgelin M., Hervald H. Activation of the human contact system on neutrophil extracellular traps. J. Innate Immun. 2009; 1:225–30.

39. Papayannopoulos V., Metzler K.D., Hakkim A. et al. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. J. Cell Biol. 2010; 191:677–91.

40. Ramos-Kichik V., Mondragon-Flores R., Mondragon M. et al. Neutrophil extracellular traps are induced by *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb). 2008; 89:29–37.

41. Silva M.T. When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. J. Leukoc. Biol. 2010; 87:1–14.

42. Urban C.F., Reichard U., Brinkmann V. et al. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. Cell Microbiol. 2006; 8:668–76.

43. von Köckritz-Blickwede M., Goldmann O., Thulin P. et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular traps formation. Blood. 2008; 111:3070–80.

44. von Köckritz-Blickwede M., Nizet V. Innate immunity turned inside-out: antimicrobial defense by phagocyte extracellular traps. J. Mol. Med. 2009; 87(8):775–83.

45. Wartha F., Beiter K., Albiger B. et al. Capsule and D-alanylated lipoteichoic acids protect *Streptococcus pneumoniae* against neutrophil extracellular traps. Cell Microbiol. 2007; 9:1162–71.

46. Weinrauch Y., Drujan D., Shapiro S.D. et al. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. Nature. 2002; 417:91–4.

47. Yost C.C., Cody M.J., Harris E.S. et al. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. Blood. 2009; 113 (25):6419–27.

48. Yousefi S., Gold J.A., Andina N. et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. Nat. Med. 2008; 14:949–53.

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

1. Dolgushin I.I., Andreeva Yu.S., Savochkina A.Yu. [Neutrophil Extracellular Traps and Methods of Assessment of Neutrophils Functional Status]. M.: RAMS; 2009. 208 p.

2. Isachkova L.M., Plekhova N.G. [To the development of view about anti-infective resistance]. Epidemiol. Infek. Bol. 2002; 1:11–5.

3. Kozinets G.I., Vysotsky V.V., Pogorelov V.M. et al. [Blood and Infection]. M.; 2001. 456 p.

4. Kravtsov A.L., Grebenyukova T.P., Taranenko T.M., Kuznetsov O.S., Chramchenkova T.A., Naumov A.V. [Flow cytometric monitoring for the development of neutrophil degranulation (azurophil) in the whole human blood as a response to endotoxin of *Yersinia pestis*]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 1999; 79:81–9.

5. Kravtsov A.L., Shmel'kova T.P. [Secretory degranulation of neutrophils as a trigger of inflammation and regulator of immune response: the role of serine leukocyte proteases and protease-activated receptors]. Epidemiol. Vaktsinoprofilakt. 2011; 1(56):79–87.

6. Kravtsov A.L., Shmel'kova T.P., Shchukovskaya T.N. [Influence of the anti-plague vaccination on the functional activity of human innate immunity cells]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2011; 1(107):77–80.

7. Semenov B.F., Zverev V.V. [Concept of construction of rapid immunological protection from pathogens]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2007; 4:93–100.

8. Fradkin V.A. [Diagnostics of Allergy by Blood Neutrophil Reactions]. M.: Meditsina; 1985. 176 p.

9. Shishkova Yu.S., Savochkina A.Yu., Ryzhkova A.I., Mezentseva E.A. [Influence of "Pirogenal" preparation on formation of neutrophils extracellular traps]. Med. Nauka Obraz. Urala. 2009; 10(3):23–4.

10. Yaglova N.V. [Mast cells and innate immunity]. Immunologia. 2009; 139–42.

Authors:

Kravtsov A.L. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Кравицов А.Л. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 07.07.11.

П.Ю.Попова, Н.И.Микшис, А.Ю.Гончарова,
Т.Н.Каштанова, Ю.А.Попов

ОСОБЕННОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ АНТИТЕЛ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОМ СИБИРЕЯЗВЕННОГО ПРОТЕКТИВНОГО АНТИГЕНА, РЕКОМБИНАНТНЫМ ИЛИ ВАКЦИННЫМ ШТАММАМИ *BACILLUS ANTHRACIS*

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

Протективный антиген, полученный из аспорогенного рекомбинантного штамма *Bacillus anthracis*, в экспериментах *in vivo* вызывает развитие напряженного адаптивного иммунитета. Двукратная иммунизация кроликов дозой 50 мкг очищенного белкового препарата стимулирует выработку специфических антител в более высоких титрах, чем в случае иммунизации вакцинным или генно-инженерным сибиреязвенным штаммами. Выявлено, что рекомбинантный штамм *B. anthracis* дополнительно инициирует выработку антител к белку S-слоя возбудителя сибирской язвы.

Ключевые слова: сибирская язва, протективный антиген, вакцины, иммунитет, антителогенез.

P.Yu.Popova, N.I.Mikshis, A.Yu.Goncharova, T.N.Kashtanova, Yu.A.Popov

Peculiarities of Antibody Genesis in the Laboratory Animals Immunized with Anthrax Protective Antigen Preparation, *Bacillus anthracis* Recombinant or *Bacillus anthracis* Vaccine Strains

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Protective antigen, extracted from *Bacillus anthracis* asporogenic recombinant strain, triggers progression of a high-grade adaptive immunity *in vivo*. Two-fold immunization of rabbits with the purified protein preparation in a dose of 50 mcg induces production of specific antibodies in titers higher than those registered in case of immunization with vaccine or genetically engineered anthrax strains. It is determined that the recombinant *B. anthracis* strain initiates further production of antibodies towards S-layer protein of anthrax agent.

Key words: anthrax, protective antigen, vaccines, immunity, antibody genesis.

Противоэпидемические мероприятия в неблагополучных по сибирской язве очагах включают вакцинацию контингента групп риска и сельскохозяйственных животных. Используемая на территории России лицензированная живая аттенуированная вакцина *Bacillus anthracis* СТИ-1 обеспечивает формирование напряженного иммунитета. Однако ее недостатком является относительно высокая частота возникновения побочных эффектов, обусловленных действием токсичных продуктов [1]. Снижение риска возникновения нежелательных последствий возможно за счет использования для вакцинации очищенного препарата протективного антигена (ПА) – основного иммуногена возбудителя сибирской язвы [5].

В РосНИПЧИ «Микроб» на основе бесплазмидных производных вакцинных штаммов *B. anthracis* СТИ-1 и *B. anthracis* 55 были сконструированы рекомбинантные штаммы, лишенные детерминант синтеза основных факторов патогенности сибиреязвенного микроба, но содержащие ген *pag*, кодирующий синтез ПА [2, 3].

Цель данного исследования – сравнение динамики титров антител у кроликов, иммунизированных препаратом протективного антигена, полученного из генно-инженерного продуцента, вакцинным или рекомбинантным штаммами *B. anthracis*.

Материалы и методы

В работе использовали: рекомбинантный штамм *B. anthracis* СТИДПА-1 (КМ 96, патент РФ № 2321628) (Государственная коллекция патогенных бактерий, Саратов), вакцинный штамм *B. anthracis* СТИ-1 (ФГБУ «НЦЭСМП», Москва). Рекомбинантный и вакцинный штаммы *B. anthracis* выращивали на агаре Хоттингера (РосНИПЧИ «Микроб», Саратов) при температуре 37 °С. В среде при необходимости добавляли канамицин (Merck, Германия) – 25 мкг/мл.

ПА выделяли из штамма *B. anthracis* 55ДТПА-1(Spo⁻). Антиген очищали двухэтапной хроматографией, как описано ранее [2]. Подготовку споровой взвеси штаммов *B. anthracis* осуществляли по стандартной методике [3]. Для иммунизации использовали кроликов породы шиншилла массой от 2,5 до 3 кг (РосНИПЧИ «Микроб», Саратов). Титры антител к протеинам ПА и ЕА1 в сыворотках иммунизированных животных определяли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа [3].

Результаты и обсуждение

ПА получали из аспорогенного рекомбинантного продуцента *B. anthracis* 55ДТПА-1(Spo⁻) [3].

Очищенный белковый препарат вводили кроликам в дозе 50 мкг в сочетании с полным адъювантом Фрейнда. Инъекции делали подкожно двукратно с интервалом в 2 недели. Для сравнения использовали группы животных (по три особи в каждой), иммунизированных подкожно двукратно дозой $5 \cdot 10^7$ спор вакцинного (*B. anthracis* СТИ-1) или рекомбинантного (*B. anthracis* СТИДПА-1) штаммов. Повторные иммунизации культурами штаммов *B. anthracis* проводили на 21-е сутки. Кроликов контрольной группы оставляли интактными. Забор крови из краевой ушной вены биомоделей осуществляли на 7, 14, 21, 28, 35-е сутки, а также через 1,5; 2 и 2,5 мес. после первой иммунизации. Титры антител к ПА в сыворотках лабораторных животных определяли с помощью твердофазного иммуоферментного анализа.

При иммунизации кроликов препаратом очищенного ПА титры специфических антител достигали наиболее высоких значений, оставаясь на существенном уровне до конца срока наблюдения (рис. 1). Повторная иммунизация стимулировала дополнительное антителообразование в организме лабораторных животных. Нарастание титров специфических антител у кроликов, иммунизированных препаратом ПА, продолжалось в течение 1,5 мес. Максимальные значения (1/8000–1/128000) регистрировали через 45 сут после первой иммунизации или 30 сут после второй. В дальнейшем в сыворотках биомоделей происходило постепенное снижение количества антител к ПА до титров: 1/2000–1/64000 – к 2 мес. и 1/1000–1/16000 – через 2,5 мес. от начала эксперимента.

Динамика титров антител к ПА при использовании вакцинного или рекомбинантного штаммов *B. anthracis* отличалась большей сглаженностью показателей (рис. 1). Схожесть основных тенденций образования антител в случаях иммунизации споровыми аттенуированными культурами не ис-

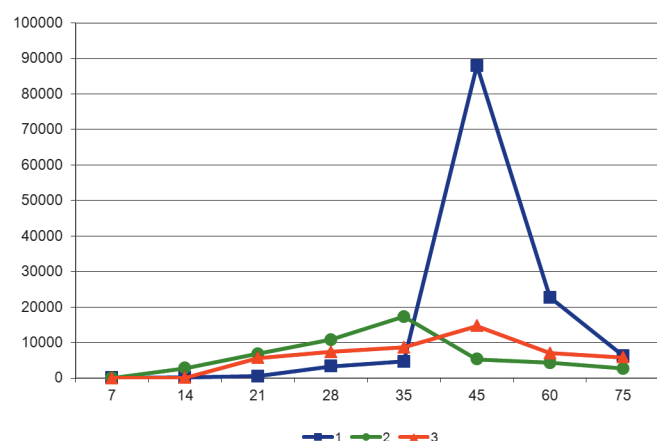


Рис. 1. Динамика титров анти-ПА антител при иммунизации лабораторных животных (кроликов) препаратом ПА, вакцинным и рекомбинантным штаммами. По оси абсцисс – сутки после первой иммунизации. По оси ординат – обратные значения титров анти-ПА антител в сыворотках кроликов, иммунизированных двукратно:

1 – препаратом очищенного ПА; 2 – споровой взвесью штамма *B. anthracis* СТИ-1; 3 – споровой взвесью штамма *B. anthracis* СТИДПА-1. На графиках приведены средние значения данных, полученных от 3 особей животных

ключала существования некоторых особенностей. Антителообразование у лабораторных животных, иммунизированных *B. anthracis* СТИ-1, характеризовалось более высокими значениями титров анти-ПА антител в первый месяц поствакцинального периода. Пик антителообразования у биомоделей, вакцинированных *B. anthracis* СТИ-1, приходился на 35-е сутки от начала эксперимента, а у кроликов, иммунизированных рекомбинантным штаммом *B. anthracis* СТИДПА-1, на 45-е сутки. Максимальные значения титров антител у кроликов в эти периоды находились в пределах от 1/4000 до 1/32000. В дальнейшем в обоих случаях происходило постепенное снижение количества антител. Однако у кроликов, получивших ту же дозу рекомбинантного штамма, данный процесс отличался меньшей интенсивностью. Через 2 и 2,5 мес. от начала эксперимента титры антител были на достаточно высоком уровне – 1/1000–1/16000 и 1/512–1/16000. У биомоделей, иммунизированных вакцинным штаммом, эти же значения составили 1/1000–1/8000 и 1/128–1/4000.

Как известно, иммунный ответ на введение живой сибиреязвенной вакцины характеризуется поливалентной детерминацией. Помимо доминирующего ПА, в его формировании принимают участие и другие составляющие сибиреязвенного токсина, а также различные поверхностные структуры, включая споровые антигены и белки S-слоя [4, 6]. В этой связи в сыворотках кроликов, иммунизированных вакцинным или рекомбинантным штаммами, дополнительно определяли титры антител к белку EA1. Хотя S-слой возбудителя сибирской язвы представлен двумя протеинами Sap и EA1, в макроорганизме синтезируется преимущественно EA1, продукция белка Sap более характерна для роста штаммов *B. anthracis* *in vitro* [8].

Количество анти-EA1 антител у кроликов, иммунизированных штаммами *B. anthracis* СТИ-1 и

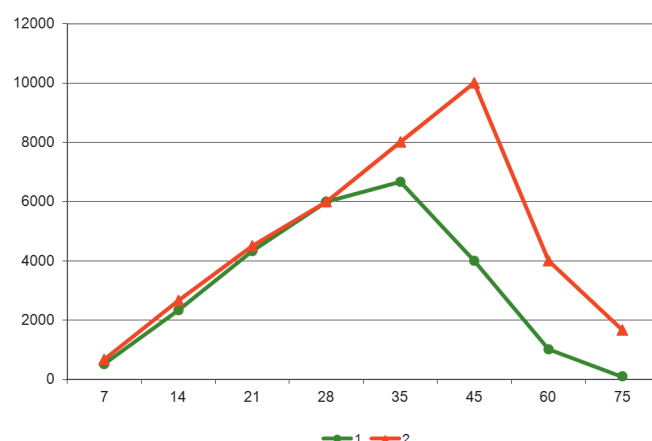


Рис. 2. Динамика титров анти-EA1 антител при иммунизации лабораторных животных (кроликов) вакцинным и рекомбинантным штаммами. По оси абсцисс – сутки после первой иммунизации. По оси ординат – обратные значения титров анти-EA1 антител в сыворотках кроликов, иммунизированных двукратно:

1 – споровой взвесью штамма *B. anthracis* СТИ-1; 2 – споровой взвесью штамма *B. anthracis* СТИДПА-1. На графиках приведены средние значения данных, полученных от 3 особей животных

B. anthracis СТИДТПА-1, в первые полтора месяца эксперимента закономерно увеличивалось (рис. 2). Изменения титров в обеих группах животных происходили почти синхронно в течение 28 сут. В последующем тенденция изменилась и значения титров антител к ЕА1 были выше у лабораторных животных, получивших иммунизирующую дозу рекомбинантной культуры. Максимум антител к белку S-слоя отмечали в сыворотках, взятых на 35-е сутки после первичной иммунизации кроликов вакциной *B. anthracis* СТИ-1 (1/2000–1/16000) и на 45-е сутки после введения первой дозы рекомбинантного штамма (1/4000–1/16000). Аналогичная закономерность распределения пиков антителообразования во времени была установлена и в исследовании влияния ПА на формирование иммунного ответа макроорганизма. Спустя 2 и 2,5 мес. значения титров анти-ЕА1 антител были значительно выше у биомоделей, иммунизированных споровой взвесью *B. anthracis* СТИДТПА-1, – 1/2000–1/8000 и 1/1000–1/2000 соответственно. В то же время у кроликов, которым вводилась такая же доза вакцинного штамма, они составили 1/512–1/2000 и 1/32–1/128. На наш взгляд, более напряженная выработка антител к ЕА1 у животных, иммунизированных генно-инженерным штаммом, связана с его генетическими особенностями, а именно отсутствием гена *pagR*, осуществляющего негативную регуляцию синтеза не только ПА, но и белков S-слоя сибиреязвенного микроба [7].

Таким образом, продуцируемый рекомбинантным аспорогенным штаммом ПА приводит к развитию у лабораторных животных адаптивного иммунитета, характеризующегося высокими титрами специфических антител. После двукратной иммунизации кроликов препаратом очищенного ПА происходит «всплеск» выработки анти-ПА антител, достигающий максимума к 45-му дню иммуногенеза. В течение последующего за пиком периода количество антител к ПА в сыворотках биомоделей, иммунизированных антигенным препаратом, превышало значения, регистрируемые у животных, иммунизированных живой сибиреязвенной вакциной. Относительное выравнивание значений титров антител достигается через 2,5 мес.

Дополнительно выявлены некоторые особенности динамики титров антител к ПА и белку S-слоя при иммунизации штаммом *B. anthracis* СТИДТПА-1. В случае двукратного введения споровой взвеси рекомбинантного штамма максимальные количества антител к ПА и ЕА1 регистрировали на 45-е сутки от начала иммунизации, а при аналогичной схеме введения вакцинной культуры – на 35-е сутки. Кроме того,

у животных, иммунизированных генно-инженерным штаммом, после достижения максимума титры антител к ПА и ЕА1 снижались менее интенсивно. В совокупности полученные данные свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения взаимодействия рекомбинантного ПА с клетками иммунной системы биомоделей с целью конструирования эффективных и менее реактогенных сибиреязвенных вакцин.

Работа выполнена по государственному контракту № 62-Д от 22.07.2011 г. в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маринин Л.И., Онищенко Г.Г., Кравченко Т.Б., Дятлов И.А., Тюрин Е.А., Степанов А.В., Никифоров В.В. Сибирская язва человека: эпидемиология, профилактика, диагностика, лечение. М.: ЗАО МП «Гигиена»; 2008. 416 с.
2. Микшис Н.И., Кудрявцева О.М., Болотникова М.Ф., Шулепов Д.В., Новикова Л.В., Попов Ю.А. и др. Иммуногенность рекомбинантных бациллярных штаммов с клонированным геном синтеза протективного антигена *Bacillus anthracis*. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2007; 3:15–21.
3. Микшис Н.И., Кудрявцева О.М., Шулепов Д.В., Гончарова А.Ю., Болотникова М.Ф., Новикова Л.В. и др. Аспорогенный рекомбинантный продуцент протективного антигена сибиреязвенного микроба. Биотехнология. 2010; 4:25–33.
4. Brossier F., Levy M., Mock M. Anthrax spores make an essential contribution to vaccine efficacy. Infect. Immun. 2002; 70:661–4.
5. Chitlaru T., Altboum Z., Reuveny S., Shafferman A. Progress and novel strategies in vaccine development and treatment of anthrax. Immunol. Rev. 2011; 239(1):221–36.
6. Gat O., Grosfeld H., Ariel N. Search for *Bacillus anthracis* potential vaccine candidates by a functional genomic-serologic screen. Infect. Immun. 2006; 74(7):3987–4001.
7. Mignot T., Mock M., Fouet A. A plasmid-encoded regulator couples the synthesis of toxins and surface structures in *Bacillus anthracis*. Mol. Microbiol. 2003; 47(4):917–27.
8. Mock M., Fouet A. Anthrax. Microbiol. Rev. 2001; 55:647–71.

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

1. Marinin L.I., Onishchenko G.G., Kravchenko T.B., Dyatlov I.A., Tyurin E.A., Stepanov A.V., Nikiforov V.V. [Anthrax in Humans: Epidemiology, Prophylaxis, Diagnostics, and Treatment]. M.: ZAO MP "Gigiena"; 2008. 416 p.
2. Mikshis N.I., Kudryavtseva O.M., Bolotnikova M.F., Shulepov D.V., Novikova L.V., Popov Yu.A. et al. [Immunogenicity of the recombinant bacillary strains with the genetically engineered gene responsible for *Bacillus anthracis* protective antigen synthesis]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 2007; 3:15–21.
3. Mikshis N.I., Kudryavtseva O.M., Shulepov D.V., Goncharova A.Yu., Bolotnikova M.F., Novikova L.V. et al. [Asporogenic recombinant producer of anthrax agent protective antigen]. Biotechnologia 2010; 4:25–33.

Authors:

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

Об авторах:

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

Поступила 05.07.11.

С.В.Генералов, Е.Г.Абрамова, Ж.В.Матвеева, И.М.Жулидов, О.А.Лобовикова, Л.В.Савицкая, Л.Н.Минаева, М.В.Галкина, Т.А.Михеева, А.В.Комиссаров, М.Н.Киреев, А.К.Никифоров

ПОЛУЧЕНИЕ КРОЛИЧЬЕГО АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА С ПРИМЕНЕНИЕМ КУЛЬТУРАЛЬНОГО АНТИГЕНА

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

Показана возможность применения фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253», репродуцированного на клеточной культуре Vero, в качестве антигена при получении гетерологичного антирабического иммуноглобулина. Установлено, что наиболее рациональным представляется применение адьюванта – гидроксида алюминия. При этом специфические антитела к 73-му дню иммунизации накапливаются в титре не ниже 1:500 (специфическую активность определяли в реакции нейтрализации на белых мышах и в дот-иммуноанализе). Уровень специфической активности экспериментальных образцов антирабического иммуноглобулина, выделенных из иммунной кроличьей сыворотки, соответствует 332 и 347 МЕ/мл. Физико-химические и биологические свойства антирабического иммуноглобулина, полученного по технологии с использованием культурального антигена, удовлетворяют требованиям нормативной документации на коммерческий препарат гетерологичного антирабического иммуноглобулина.

Ключевые слова: антирабический иммуноглобулин, вирус бешенства, культура клеток.

S.V.Generalov, E.G.Abramova, Zh.V.Matveeva, I.M.Zhulidov, O.A.Lobovikova, L.V.Savitskaya, L.N.Minaeva, M.V.Galkina, T.A.Mikheeva, A.V.Komissarov, M.N.Kireev, A.K.Nikiforov

Production of Rabbit Anti-Rabies Immunoglobulin Using Cultural Antigen

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Justified is the possibility of application of fixed rabies virus "Moscow 3253", reproduced on the cell culture Vero, as an antigen for heterologous anti-rabies immunoglobulin production. Application of the adjuvant – aluminium hydrate – is determined to be effective. Herein, by the day 73 post immunization, specific antibodies titer is $\geq 1:500$ (wherein specific activity has been identified by means of neutralization test, carried out on white mice, and dot-blot immunoassay). The level of specific activity in experimental samples of anti-rabies immunoglobulin, isolated from rabbit immune serum, corresponds to 332 and 347 ME/ml. Physicochemical and biological properties of anti-rabies immunoglobulin, produced with the help of cultural antigen, fully comply with regulatory requirements specified for commercial preparation of heterologous anti-rabies immunoglobulin.

Key words: anti-rabies immunoglobulin, rabies virus, cell culture.

Вирус бешенства способен вызвать у человека и животных неизлечимое заболевание, которое, по оценке ВОЗ, входит в группу инфекционных болезней, наносящих значительный ущерб экономике и здравоохранению. В Российской Федерации, по данным Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, ежегодно за антирабической помощью обращаются 430–470 тыс. человек, больше половины из них получают специфическое антирабическое лечение. Для специфической профилактики бешенства используют антирабические вакцину и иммуноглобулин, в производстве которых применяют фиксированные штаммы вируса бешенства. В мировой биотехнологической практике антирабический иммуноглобулин (АИГ) производят из гипериммунной сыворотки человека или животных. В России широкое применение имеет препарат гетерологичного антирабического иммуноглобулина, полученный из лошадиной сыворотки. В настоящее время многие производители гетерологичного АИГ, в том числе и институт «Микроб», в качестве иммунизирующего материала применяют антиген на

основе инактивированного фиксированного вируса бешенства, полученного из мозговой ткани животных [15].

Отрицательной стороной применения подобного антигена является накопление в сыворотке крови продуцентов антител к мозговой ткани, которые могут быть причиной нежелательных явлений [6, 15]. Для их устранения рекомендуется на этапе иммунизации продуцентов использовать фиксированный вирус бешенства, выращенный на культуре животных клеток. К настоящему времени для получения культурального антигена предложены первичнотрипсинизированные и перевиваемые клетки почек сирийского хомяка [9, 11], куриные фибробласты [10], клетки почечного эпителия зеленой мартышки (Vero) [7, 10, 14].

Задачей исследования явилась разработка альтернативного способа получения гетерологичного антирабического иммуноглобулина с использованием антигена, полученного на основе репродуцированного на перевиваемой клеточной линии Vero вируса бешенства «Москва 3253». Выбор субстрата для культивирования вируса обусловлен тем, что данная

клеточная линия безопасна для человека и используется в России для производства МИБП.

Материалы и методы

Фиксированный вирус бешенства (штамм «Москва 3253») выращивали на перевиваемой клеточной линии Vero суспензионным методом с использованием биореактора BioG-M Plus («BioTron», Корея) вместимостью 5 л. К предварительно выращенной в биореакторе суспензии клеток Vero добавляли вируссодержащую жидкость, заражающая доза при этом составила 0,2 ЛД₅₀ на 1 клетку. Для культивирования клеток Vero использовали среду Игла МЕМ с 10 % содержанием сыворотки крупного рогатого скота («Биолот», Россия); вируса бешенства – среду 199 («Биолот», Россия) с содержанием человеческого сывороточного альбумина 0,1 % и антибиотиков (пенициллин – 100 ЕД/мл, стрептомицин 0,1 мг/мл). Выращивание проводили при температуре 32 °С и pH 7,2 в течение 72 ч, затем вируссодержащую суспензию собирали в стерильную посуду и инактивировали фенолом в конечной концентрации 0,5 % при 37 °С в течение 24 ч согласно действующим методическим указаниям МУ 3.3.1.1099-02 «Безопасность работы с производственными штаммами фиксированного вируса бешенства». Удаление клеточного дебриса осуществляли предварительным осаждением и фильтрацией жидкости через ацетатцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,45 и 0,2 мкм. Вируссодержащую жидкость концентрировали методом тангенциальной ультрафильтрации с помощью фильтрационной установки Vivaflow 200 («Sartorius», Германия), снабженной полипропиленовой мембраной с номинальной отсечкой по молекулярной массе 300 кДа, с площадью фильтрации 0,2 м².

Полученный концентрат использовали для иммунизации продуцентов антирабической сыворотки – кроликов *Oryctolagus cuniculus* породы «шиншилла». Животных иммунизировали подкожно в объеме 1 мл на 0, 7, 21, 28, 52, 59-е сутки. Титр вируснейтрализующих антител определяли на 42 и 73-е сутки. Аналогичную схему иммунизации применяли при использовании адъювантов: гидроксида алюминия и полиоксидония.

Фракционирование специфических антител осуществляли риванол-спиртовым методом [4]. Осадок иммуноглобулина растворяли в физиологическом растворе до конечной концентрации 10,0 %. Для получения высокоочищенного раствора иммуноглобулина проводили предварительную фильтрацию через ацетатцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,8 и 0,45 мкм. Для улучшения показателей цветности и прозрачности осуществляли фильтрацию через глубинные фильтры Zeta Plus («CUNO», Франция). Для стерилизации жидкого раствора иммуноглобулина осуществляли его фильтрацию через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

Специфическую активность антирабической сыворотки и иммуноглобулина определяли *in vitro* в дот-иммуноанализе [8] и *in vivo* в реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах [13]. Подсчет титра нейтрализующих антител проводили по методу Reed и Muench [13]. Физико-химические свойства иммуноглобулина исследовали согласно МУК 4.1/4.2588-96 «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям». Статистический анализ полученных результатов проводили по общепринятым методам [1].

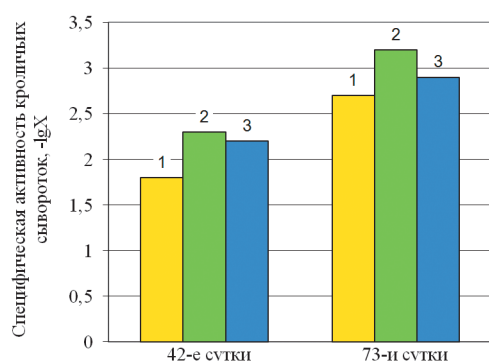
Результаты и обсуждение

На активность гипериммунной сыворотки существенное влияние оказывают качество и доза вирусного антигена, способ и частота его введения. При расчете иммунизирующей дозы исходили из того, что уровень содержания вирусных частиц в исследуемой культуральной жидкости должен быть близок таковому в антигене органо-тканевого происхождения, применяемому в настоящее время в производстве гетерологичного АИГ. Количество вирусных частиц в культуральном антигене оценивали по содержанию в материале вирусной РНК методом количественной ПЦР. В антигене органо-тканевого происхождения содержание вирусной РНК составило 10⁸–10⁹ копий/мл. Аналогичная концентрация вирусной РНК в культуральном антигене была достигнута в процессе концентрирования вируссодержащей культуральной жидкости методом тангенциальной ультрафильтрации [3]. Выбор интервала между инъекциями и способ введения антигена обусловлены опытом и рекомендациями как отечественных, так и зарубежных исследователей [6, 7, 10, 12].

Для изучения возможности повышения специфической активности антирабической сыворотки исследовали действие адъювантов: гидроксида алюминия и полиоксидония. Гидроксид алюминия традиционно применяют в производстве вакцин. Благодаря высокой способности к сорбции он выполняет функцию антигенного депо, а также неспецифически усиливает фагоцитоз [5].

Полиоксидоний представляет собой N-оксидированное производное полиэтиленпиперозина с высокой молекулярной массой [5]. Полиоксидоний не обладает антигенными свойствами, не оказывает аллергизирующего, мутагенного и канцерогенного действия. Введение антигена в сочетании с полиоксидонием обеспечивает высокий гуморальный ответ даже у низкореагирующих особей. В настоящее время полиоксидоний применяют в производстве гриппозной вакцины [5]. Сотрудниками ГИСК им. Л.А.Тарасевича (ФГБУ «НЦ ЭСМП») показан адъювантный эффект полиоксидония при его введении белым мышам совместно с культуральной антирабической вакциной отечественного производства [2].

Уровень антителообразования в ответ на введение рабического антигена изучен на трех груп-



Специфическая активность кроличьих антирабических сывороток, полученных с применением культурального антигена:

1 – группа животных, иммунизированных культуральным рабическим антигеном без адьюванта; 2 – группа животных, иммунизированных культуральным рабическим антигеном с гидроксидом алюминия (3 мг/мл); 3 – группа животных, иммунизированных культуральным рабическим антигеном с полиоксидонием (1,5 мг/мл)

пах животных. Первую группу иммунизировали культуральным антигеном без адьюванта, вторую и третью – культуральным антигеном, содержащим гидроксид алюминия (3 мг/мл) или полиоксидоний (1,5 мг/мл) соответственно. На рисунке показана зависимость изменения титра антител в кроличьей сыворотке от используемого адьюванта.

Анализ *in vitro* специфической активности антирабической сыворотки, полученной на 42-е сутки иммунизации, показал, что оба адьюванта (гидроксид алюминия и полиоксидоний) способствовали усилению продукции антител. При этом у второй группы животных, иммунизированных антигеном с гидроксидом алюминия, наблюдали самый высокий уровень антител – (1:160 – 1:320) или $-\lg(X \pm x) = (2,3 \pm 0,3)$. Значения специфической активности сывороток у первой и третьей группы были соответственно равны (1:40 – 1:80), или $-\lg(X \pm x) = (1,8 \pm 0,3)$, и 1:160, или $-\lg(X \pm x) = (2,2 \pm 0,0)$. К 73-м суткам уровень титра антител возрос во всех опытных группах, наиболее высокую активность также проявляли сыворотки, полученные от второй группы животных – (1:1280 – 1:2560), или $-\lg(X \pm x) = (3,2 \pm 0,3)$. У первой и третьей групп значения специфической активности сывороток составили (1:320 – 1:640),

или $-\lg(X \pm x) = (2,7 \pm 0,3)$, и (1:640 – 1:1280), или $-\lg(X \pm x) = (2,9 \pm 0,3)$. Анализ полученных результатов свидетельствует о возможности использования культурального антигена для иммунизации продуцентов антирабической сыворотки и целесообразности применения адьювантов. При этом наиболее рациональным представляется использование в качестве адьюванта гидроксида алюминия, хотя следует отметить тенденцию к увеличению образования антител при применении полиоксидония.

Следующим этапом явилось получение экспериментальных образцов антирабического иммуноглобулина из исследованных образцов иммунной кроличьей сыворотки с наиболее высокими титрами. Дополнительно вируснейтрализующая активность данных сывороток была изучена *in vivo*. По данным реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышцах, значения специфической активности иммунных сывороток находилось в пределах 1:513–1:640 (10–13 МЕ/мл). Были получены две экспериментальные серии АИГ.

Экспериментальные серии кроличьего антирабического иммуноглобулина были изучены по основным биологическим и физико-химическим параметрам. Согласно требованиям нормативной документации PN 002639/01-250210 на препарат АИГ, получаемый из лошадиной сыворотки, уровень его специфической активности не должен быть ниже 150 МЕ при исследовании в реакции нейтрализации вируса бешенства в количестве от 100 до 1000 LD₅₀/0,03 мл. Уровень специфической активности образцов АИГ, полученных из кроличьей сыворотки, составляет 332 и 347 МЕ/мл (при титре антител соответственно 1:8786 и 1:9190).

Физико-химические показатели: pH, электрофоретическая чистота, прозрачность, цветность также соответствовали требованиям нормативной документации, предъявляемым к коммерческому препарату гетерологичного АИГ (таблица).

Таким образом, в результате проведенных экспериментов получены образцы АИГ из сыворотки кроликов, иммунизированных культуральным рабическим антигеном. Физико-химические свойства и уро-

Характеристика физико-химических и биологических свойств АИГ, полученного из сыворотки кроликов, иммунизированных культуральным антигеном

Показатель	Образец 01	Образец 02	Требования НД PN 002639/01-250210
Специфическая активность в реакции нейтрализации, МЕ/мл	332	347	Не менее 150
Специфическая активность в дот-иммуноанализе	1:5000 – 1:10000	1:5000 – 1:10000	—
Содержание белка, %	10,0	10,0	10,0±1,0
pH	7,2	6,8	7,0±0,4
Электрофоретическая чистота	Фракция γ-глобулина – не менее 90 %; наличие α,β-глобулинов – не более 10 %. Альбумин отсутствует	Фракция γ-глобулина – не менее 90 %; наличие α,β-глобулинов – не более 10 %. Альбумин отсутствует	Фракция γ-глобулина – не менее 80 %; наличие примесей – α,β-глобулинов – не более 20 %. Альбумин отсутствует
Прозрачность	0,05	0,04	Не более 0,05
Цветность	0,14	0,13	Не более 0,15

вень специфической активности исследуемых образцов удовлетворяют требованиям НД РН 002639/01-250210 на коммерческий препарат гетерологичного АИГ. Положительный опыт получения АИГ из иммунной сыворотки кроликов свидетельствует о необходимости дальнейших исследований в разработке технологии получения культурального рабического антигена и возможности его применения для иммунизации лошадей – более крупных продуцентов антирабической сыворотки.

Работа выполнена по государственному контракту № 73-Д от 25.07.2011 в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)»

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: 1962. 180 с.
2. Авдеева Ж.И., Алпатова Н.А., Акользина С.Е., Медуницын Н.В. Иммуноадьювантный эффект цитокинов. Тихоокеанский медицинский журнал. 2009; 3:19–22.
3. Бракт К., Катаевский Е.Е., Савельев С.П. Фильтрация кросс-флоу. Фармацевтические технологии и упаковка. 2009; 6:47–51.
4. Карпов С.Н., Прегер С.М., Синельников Г.Е., Федорова Ю.В. Гипериммунные сыворотки. Томск; 1976. 380 с.
5. Медуницын Н.В., Покровский В.И. Основы иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекционных болезней. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2005. 512 с.
6. Селимов М.А. Бешенство. М.: Медицина; 1978. 336 с.
7. Ситник Н.П., Загидуллин Н.В., Исрафилов А.Г., Еникеева Л.Ф., Мухачева А.В., Шафеева Р.С. и др. Способ получения высокоспецифичной гетерологичной антирабической сыворотки. Патент РФ 2322503, опубл. 20.04.2008. Бюл. № 11.
8. Шарапова Н.А., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Киреев М.Н., Савицкая Л.В., Минаева Л.Н., Михеева Т.А., Галкина М.В., Краснов Я.М. Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина in vitro в дот-иммуноанализе. Пробл. особо опасных инф. 2010; 1(103):63–6.
9. Conales C.A., Valentini E.J.G., Albas A., Mendonca R., Fuches R., Soares M.A. et al. The preparation of cultured rabies virus and the production of antiserum for human use. J. Biol. Stand. 1988; 16:27–32.
10. Goel S.K., Sharma S., Singh U. Antibody response to purified chick embryo cell vaccine in equines for production of equine rabies immune globulin. Biologicals. 2003; 31:233–6.

11. Lepine P., Atanasiu P. Производство лечебной антирабической сыворотки на животных. Методы лабораторных исследований по бешенству. Женева: ВОЗ; 1975. С. 295–300.
12. Luekrajat T., Wangsai J., Phanuphak P. Production of antirabies serum of equine origin. Laboratory techniques in rabies. Geneva: WHO; 1996. P. 401–4.
13. Meslin F.-X., Kaplan M.M., Koprowsky H., editors. Laboratory techniques in rabies. Geneva: WHO; 1996. 469 p.
14. Ozkan O., Aylan O., Ates C., Celebi B. Production of heterolog anti-rabies immune sera. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi. 2004. 15: 49–54.
15. WHO Expert Consultation on Rabies: first report. WHO technical report series 931. Geneva: WHO; 2004. 121 p.

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

1. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. L.; 1962. 180 p.
2. Avdeeva Zh.I., Alpatova N.A., Akol'zina S.E., Medunitsyn N.V. [Immune-adjuvant effect of cytokines]. Tikhookeansky Meditsinsky Zhurnal. 2009; 3:19–22.
3. Brakht K., Katalevsky E.E., Savel'ev S.P. [Cross-flow filtration]. Farmatsevt. Tekhnol. Upakovka. 2009; 6:47–51.
4. Karpov S.N., Preger S.M., Sinel'nikov G.E., Fedorova Yu.V. [Hyperimmune Sera]. Tomsk; 1976. 380 p.
5. Medunitsyn N.V., Pokrovsky V.I. [Fundamental Concepts of Immune Prophylaxis and Immune Therapy as Related to Infectious Diseases]. M.: GEOTAR-Media; 2005. 512 p.
6. Selimov M.A. [Rabies]. M.: Meditsina; 1978. 336 p.
7. Sitnik N.P., Zagidullin N.V., Israfilov A.G., Enikeeva L.F., Mukhacheva A.V., Shafeeva R.S. et al. [Method of preparation of heterologous anti-rabies serum]. RF Patent 2322503.
8. Sharapova N.A., Abramova E.G., Nikiforov A.K., Kireev M.N., Savitskaya L.V., Minaeva L.N., Mikheeva T.A., Galkina M.V., Krasnov Ya.M. [Activity test for anti-rabies sera and heterologous anti-rabies immunoglobulin preparation in vitro using dot-blot immunoassay]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; 103:63–6.

Authors:

Generalov S.V., Abramova E.G., Matveeva Zh.V., Zhulidov I.M., Lobovikova O.A., Savitskaya L.V., Minaeva L.N., Galkina M.V., Mikheeva T.A., Komissarov A.V., Kireev M.N., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Лобовикова О.А., Савицкая Л.В., Минаева Л.Н., Галкина М.В., Михеева Т.А., Комиссаров А.В., Киреев М.Н., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 10.11.11.

В.А.Говорунова, Л.И.Маринин, Р.И.Миронова, М.В.Храмов, А.Н.Мокриевич, А.М.Баранов

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

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

Разработана дифференциально-диагностическая плотная питательная среда для выделения и идентификации возбудителя сибирской язвы. В состав среды входят: питательная основа (ферментативный гидролизат рыбной муки), агар-агар, D (+)-сорбит, индикатор pH бромтимоловый синий и антибиотик широкого спектра действия (полимиксин). Среда позволяет дифференцировать по цвету и морфологии колоний вирулентные (капсулообразующие) и авирулентные (бескапсульные) штаммы *Bacillus anthracis*, а также близкородственные сапрофитные микроорганизмы.

Ключевые слова: питательная среда, возбудитель сибирской язвы, D(+)-сорбит, бромтимоловый синий, микроорганизмы.

V.A.Govorunova, L.I.Marinin, R.I.Mironova, M.V.Khramov, A.N.Mokrievich, A.M.Baranov

Diagnostic Nutrient Media for Isolation and Identification of Anthrax Agent

State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

Designed is a differential-diagnostic solid nutrient media for isolation and identification of anthrax agent. This media contains: nutrient base (enzymic hydrolysate of fishbone powder), agar-agar, D (+)-sorbit, pH indicator bromthymol blue, and broad-spectrum antibiotic (polymyxin). The media makes it possible to differentiate virulent (capsular) and avirulent (non-capsular) *Bacillus anthracis* strains, as well as closely related saprophyte microorganisms, depending upon the color and colony morphology.

Key words: nutrient media, anthrax agent, D(+)-sorbit, bromthymol blue, microorganisms.

Анализ большинства разработанных к настоящему времени питательных сред для выделения и дифференциации штаммов возбудителя сибирской язвы [2, 4] показал, что всем им свойственны те или иные недостатки. В некоторых случаях это нестабильность проявления дифференцирующих признаков, например, фосфатазообразования, продукции лецитиназы и других биохимических особенностей *B. anthracis* и близкородственных бацилл. В других – невозможность проведения внутривидовой дифференциации штаммов *B. anthracis* (вирулентных и аттенуированных). Это положение отражено в Постановлении Главного государственного санитарного врача Российской Федерации № 41 от 27.06.2008 г. «О мерах совершенствования мероприятий по профилактике сибирской язвы в Российской Федерации» в котором указано, что в настоящее время у нас в стране отсутствуют селективные питательные среды для выделения возбудителя сибирской язвы.

Целью настоящей работы являлась разработка плотной питательной среды для выделения и идентификации возбудителя сибирской язвы.

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов. В работе использовали штаммы возбудителя сибирской язвы и других микроорганизмов из коллекции Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (ФБУН ГНЦ ПМБ).

Питательные среды. В качестве основы пита-

тельной среды использовали ферментативный гидролизат рыбной муки производства ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболensk).

Химические реактивы и добавки. D(+)-сорбит по ТУ 6-09-1588-87; бромтимоловый синий по ТУ 6-09-2086-77; полимиксин М-сульфат (Агрофарм, Россия); натрия гидроокись (NaOH) по ГОСТ 4328-77; спирт этиловый ректификованный по ГОСТ 18300-87; агар-агар микробиологический (Becton Dickinson Difco, США); перекись водорода по ГОСТ 177-88.

Результаты и обсуждение

Одним из перспективных направлений развития экспресс-индикации возбудителей инфекционных заболеваний считается энзимоиндикационное, связанное с наличием у микроорганизма определенных биохимических свойств, отличающих его от других представителей данного рода. Это направление может быть реализовано посредством использования дифференциально-диагностических питательных сред. В состав таких сред входят: питательная основа, обеспечивающая размножение бактерий; химический субстрат, отношение к которому является диагностическим признаком для данного микроорганизма; цветной индикатор, изменение окраски которого свидетельствует о наличии у исследуемого микроорганизма ферментной системы к использованному субстрату.

При сравнительной оценке ферментативной активности штаммов *B. anthracis* и близкородственных

Морфология и окраска колоний микроорганизмов рода *Bacillus*, выращенных на дифференциально-диагностической питательной среде

Вид микроорганизма	Окраска колоний	Морфология колоний
Вирулентные штаммы <i>B. anthracis</i>	Желтая (желто-зеленая)	Колонии мелкие (1,5–2 мм), круглой формы с фестончатым краем, выпуклым центром, с нежной зернистой структурой, с ярким желтоватым ореолом вокруг колонии.
Аттенуированные штаммы <i>B. anthracis</i>	Зеленая (светло-зеленая)	Колонии среднего размера (3–6 мм), круглой формы, без выраженного центра, с однородной структурой, матовые.
<i>B. subtilis</i>	Желтая или сине-зеленая	Колонии крупные (4–8 мм), с выраженным фестончатым краем, поверхность плоская, бугристая, с выраженным центром.
<i>B. cereus</i>	Желтая или сине-зеленая	Колонии очень крупные (4–10 мм), с выраженным фестончатым краем, поверхность плоская, бугристая, без выраженного центра.
<i>B. thuringiensis</i>	Сине-зеленая	Колонии среднего размера (3–7 мм), круглой формы с фестончатым краем, с ярко окрашенным синим центром.

бацилл нами была установлена разница в их способности к утилизации сорбита. Эта особенность и позволила провести исследования по разработке плотной диагностической питательной среды для одновременного выделения и дифференциации сибиреязвенных культур и спорообразующих сапрофитов.

В ходе работ экспериментальным путем был подобран состав питательной среды, обеспечивающий оптимальные условия для роста и проявления биохимической активности тестируемых микроорганизмов, определены рабочие концентрации ферментируемого субстрата и регистрирующего его утилизацию индикатора. Установлено, что наилучшие результаты могут быть получены при использовании в качестве основы для питательной среды ферментативного гидролизата рыбкоостной муки. Оптимальная концентрация в среде D (+)-сорбита составила 2 %. В качестве индикатора утилизации сорбита был выбран бромтимоловый синий в конечной концентрации 0,003 %. Подавление роста неспецифической микрофлоры обеспечивалось за счет введения в состав среды антибиотика широкого спектра действия (полимиксина).

В результате была разработана дифференциально-диагностическая питательная среда следующего состава:

- панкреатический гидролизат рыбкоостной муки (ГРМ) – 20,0 г,
- агар-агар микробиологический – 15,0 г,
- раствор D(+)-сорбита 20 % – 100,0 мл,
- спиртовой раствор бромтимолового синего 1,6 % – 1,9 мл,
- полимиксин М сульфат – 25 мг,
- вода дистиллированная – до 1 литра.

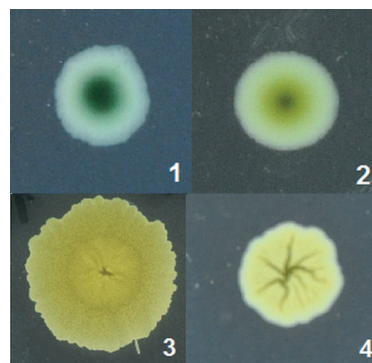
Для приготовления среды в дистиллированную воду добавляли гидролизат рыбкоостной муки, агар-агар, перемешивали и прогревали смесь при температуре 50–60 °C до полного растворения компонентов. Доводили pH среды до 7,2–7,4 добавлением NaOH. Стерилизовали среду автоклавированием при температуре (120±1) °C в течение 20 мин. Отдельно готовили: 20 % раствор D(+)-сорбита и стерилизовали кипячением; 1,6 % спиртовой раствор бромтимолового синего; навеску полимиксина М-сульфата.

В расплавленную питательную среду при температуре 45–50 °C стерильно добавляли раствор

D(+)-сорбита, спиртовой раствор бромтимолового синего и навеску полимиксина М-сульфата. После тщательного перемешивания среду разливали в чашки Петри слоем 2,0–2,5 мм; застывшая питательная среда должна иметь сине-зеленый цвет (цвет морской волны). Чашки с разлитой средой можно хранить до 1 месяца в плотно укуренных пакетах при температуре 2–4 °C.

Для проведения анализа исследуемый материал наносили на поверхность питательной среды в чашке Петри в объеме 0,1–0,2 см³ и тщательно растирали стеклянным шпателем. Этим же шпателем последовательно растирали остатки культуры еще на 4–5 чашках для получения изолированных колоний. Посевы инкубировали в термостате при температуре (36±1) °C в течение 28–36 ч, после чего проводили визуальную идентификацию выросших колоний микроорганизмов на основании их морфологии и окраски (таблица).

В ходе проведенных работ [3] нами были апробированы 16 штаммов *B. anthracis* и 13 штаммов близкородственных сапрофитов. Сапрофиты на диагностической среде образовывали колонии сине-зеленого цвета. В дополнительных исследованиях других родственных сапрофитов были обнаружены штаммы, которые давали колонии желтого цвета, но по своей морфологии они четко дифференцировались от колоний *B. anthracis* (рисунок). Состав среды защищен патентом Российской Федерации [1].



Колонии микроорганизмов рода *Bacillus* на дифференциально-диагностической питательной среде (32 ч культивирования при (36±1) °C):

1 – колония *B. thuringiensis*; 2 – колония аттенуированного штамма *B. anthracis*; 3 – колония *B. cereus*; 4 – колония *B. subtilis*

Эксперименты по выделению штаммов *B. anthracis* из свежих и длительно хранившихся трупов животных, а также из образцов почвы потребовали введения в среду полимиксина для подавления роста посторонней микрофлоры.

Таким образом, разработанная дифференциально-диагностическая плотная питательная среда с дополнительным внесением антибиотика для выделения и идентификации возбудителя сибирской язвы позволяет дифференцировать по цвету и морфологии колонии вирулентных (капсулообразующих) и авирулентных (бескапсульных) штаммов *B. anthracis*, а также близкородственных сапрофитных микроорганизмов.

Авторы выражают благодарность В.М.Храмову за фотографии, представленные в статье.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Говорунова В.А., Мацаренко Г.В., Маринин Л.И., Степанов А.В. Плотная питательная среда для выявления возбудителя сибирской язвы. Патент РФ 2125610, опубл. 24.01.1999 г.
2. Егорова И.Ю., Селянинов Ю.О., Вологина И.В. Сравнительная оценка методов индикации *B. anthracis* в почве. Ветеринария. 2006; 6:26–30.
3. Маринин Л.И., Дятлов И.А., Мокриевич А.Н., Бахтеева И.В., Белова Е.В., Борзилов А.И. и др. Методы изучения биоло-

гических свойств возбудителя сибирской язвы. (Уч.-метод. пособие). М.: Гигиена; 2009. 304 с.

4. Методические указания. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы. МУК 4.2.2413-08. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2009. 67 с.

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

1. Govorunova V.A., Matsarenko G.V., Marinin L.I., Stepanov A.V. [Solid nutrient media for identification of anthrax agent]. RF Patent 2125610.
2. Egorova I.Yu., Selyaninov Yu.O., Vologina I.V. [Comparative evaluation of methods of *B. anthracis* indication in soils]. Veterinariya. 2006; 6:26–30.
3. Marinin L.I., Dyatlov I.A., Mokrievich A.N., Bakhteeva I.V., Belova E.V., Borzilov A.I. et al. [Methods of Study of Anthrax Agent Biological Properties. Study Guide]. M.: Gigiena; 2009. 304 p.
4. Methodic Regulations [Laboratory diagnostics and detection of anthrax agent]. MR 4.2.2413-08. M.: Rospotrebnadzor Federal Center of Hygiene and Epidemiology; 2009. 67 p.

Authors:

Govorunova V.A., Marinin L.I., Mironova R.I., Khramov M.V., Mokrievich, A.N. Baranov A.M. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

Об авторах:

Говорунова В.А., Маринин Л.И., Миронова Р.И., Храмов М.В., Мокриевич А.Н., Баранов А.М. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Московская обл., п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 30.03.12.

А.К.Никифоров, А.В.Комиссаров, А.Ю.Ульянов, С.А.Еремин, О.А.Волох, Н.И.Белякова,
Ю.А.Алешина, Ю.Г.Васин

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА – ПРОДУЦЕНТОВ ПРОТЕКТИВНЫХ АНТИГЕНОВ ВАКЦИНЫ ХОЛЕРНОЙ БИВАЛЕНТНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ТАБЛЕТИРОВАННОЙ В СКОНСТРУИРОВАННОМ БИОРЕАКТОРЕ

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

Изучена кинетика накопления основных антигенов при выращивании штаммов *Vibrio cholerae* М-41 серовара Огава и 569В серовара Инаба в производственных и разработанном реакторах. Установлена возможность получения кондиционных нативных протективных антигенов на разработанном биореакторе. Показана идентичность физиологических и морфологических свойств производственных штаммов холерных вибрионов в ходе их глубинного культивирования на производственных и разработанном биореакторах. Показатели качества вакцины холерной химической бивалентной таблетированной, полученной с использованием разработанного биореактора, соответствуют требованиям нормативной документации и не уступают таковым препарата, производимого традиционным способом.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, холерная вакцина, холероген-анатоксин, О-антиген, культивирование, свойства.

A.K.Nikiforov, A.V.Komissarov, A.Yu.Ul'yanov, S.A.Eremin, O.A.Volokh, N.I.Belyakova, Yu.A.Aleshina,
Yu.G.Vasin

Examination of Processes of Cultivation of *V. cholerae* strains – Producers of Protective Antigens of Cholera Bivalent Chemical Vaccine in Tablets – in the Engineered Bioreactor

Studied is the kinetics of major antigen accumulation at growing of *Vibrio cholerae* M-41 Ogawa and 569 B Inaba strains in industrial and engineered reactors. Demonstrated is the possibility to obtain conditional native protective antigens in the engineered bioreactor. Shown is the identity of physiological and morphological properties of industrial *Vibrio cholerae* strains during their submerged cultivation in industrial and engineered bioreactors. Cholera bivalent chemical vaccine obtained using engineered bioreactor possesses quality indices meeting the requirements of normative documents and equal to those of preparation received by traditional approach.

Key words: *Vibrio cholerae*, cholera vaccine, cholera toxin, O-antigen, cultivation, properties.

Для создания производственных мощностей приготовления холерной бивалентной химической вакцины, с учетом обеспечения биологической безопасности производства и современных достижений в области разработки оборудования для медицинских иммунобиологических препаратов, коллективом ученых РосНИПЧИ «Микроб» [4] был сконструирован, изготовлен и установлен на аппаратурно-технологической линии приготовления вакцины реактор-ферментер.

В предыдущих исследованиях нами была изучена кинетика роста биомассы производственных штаммов *V. cholerae* М-41 серовара Огава и 569В серовара Инаба. Было показано, что она значимо не отличается от аналогичных показателей в существующих производственных реакторах.

Целевыми продуктами при выращивании производственных штаммов являются О-антигены, продуцируемые холерными вибрионами сероваров Огава и Инаба, и холерный токсин, выделяющийся в культуральную среду при культивировании *V. cholerae* 569В серовара Инаба. Поэтому представлялось целесообразным изучить кинетику накопления вышеуказанных антигенов в производственных и разработанном реакторах.

Каждый микроорганизм живет со строго определенным значением pH и очень чувствителен к его

изменению. Это приводит либо к замедлению роста, либо к гибели. От pH зависит активность фермента, заряд клеточных оболочек, растворимость катионов и анионов и т.д. Общеизвестно, что при глубинном периодическом культивировании микроорганизмов основную роль в изменение pH культуральной жидкости вносят продукты метаболизма бактерий при потреблении, в основном, углеродных источников их питания [1, 2]. Поэтому несомненный интерес представляло изучение физиологических потребностей в источниках углерода производственных штаммов холерных вибрионов – продуцентов протективных антигенов и их морфологических свойств при культивировании в сконструированном биореакторе. Значимый научно-практический интерес представляло исследование физико-химических и иммунобиологических свойств вакцины холерной химической бивалентной таблетированной, полученной с использованием разработанного биореактора, что и являлось целями данной работы.

Материалы и методы

В работе использованы штаммы *V. cholerae* М-41 серовара Огава и 569В серовара Инаба, являющиеся продуцентами компонентов холерной химической вакцины, и *V. cholerae* 3122-Р серовара Огава

Кинетика накопления антигенов в ходе культивирования

Продолжительность выращивания, ч	Содержание О-антигена <i>V. cholerae</i> 569В Инаба в РИД с О1 сывороткой, обратный титр			Содержание холерного токсина <i>V. cholerae</i> 569В Инаба в РИД с АХС, обратный титр			Содержание О-антигена <i>V. cholerae</i> М-41 Огава в РИД с О1 сывороткой, обратный титр		
	ПР	СР	НЗ	ПР	СР	НЗ	ПР	СР	НЗ
5	1	1	-	1	1	-	0	1	-
6	2	2	-	2	2	-	1	2	-
7	6	6	-	3	3	-	2	4	-
8	10	10	-	4	4	-	6	8	-
9	10	10	Не менее 4	4	4	Не менее 1	10	12	Не менее 8

Примечание. ПР – производственный реактор; СР – сконструированный реактор; НЗ – нормируемое значение; «—» требования отсутствуют.

и *V. cholerae* 879-М серовара Инаба, которые применялись для контроля иммуногенности препаратов (Государственная коллекция патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб»).

Выращивание штаммов *V. cholerae* М-41 серовара Огава и *V. cholerae* 569В серовара Инаба с целью получения протективных антигенов проводили на разработанном биореакторе и реакторе-ферментере типа РЗРЯ-6/0,63, установленных на аппаратно-технологической линии производства холерной химической вакцины.

Выделение протективных антигенов после этапа осаждения сульфатом аммония осуществляли на сверхцентрифугах СГО-100 и Beckman при 15000 и 10000 г соответственно.

Активность О-антигенов и токсина холерных вибрионов определяли в реакции иммунодиффузии в геле (РИД) по Оухтерлони с сывороткой диагностической холерной О1 адсорбированной и антихолерогенной сывороткой (АХС) соответственно.

Определение ионов аммония и сульфат-ионов, остаточного формальдегида, рН, потери в массе при высушивании проводили в соответствии с методиками, изложенными в методических указаниях (МУК 4.1/4.2.588-96, 1998).

Определение иммуногенности проводили в тесте активной защиты на белых беспородных мышках. Специфическую безвредность (остаточную токсичность) проверяли в полуфабрикате специфической фракции Инаба на кроликах-сосунках. Специфическую безопасность вакцины определяли на кроликах породы шиншилла. Антигенную активность по анатоксинсвязыванию (ЕС) определяли в готовой продукции и полуфабрикате фракции Инаба, на кроликах породы шиншилла.

Результаты и обсуждение

Анализ полученных данных по изучению кинетики накопления антигенов в производственных и разработанном реакторах (табл. 1) показывает, что они значительно не отличаются, при этом полученные полупродукты (О-антигены и холерный токсин) соответствуют нормируемым требованиям.

На следующем этапе исследований изучено изменение уровня рН культуральной среды в ответ на

введение основного энергетического источника питания холерных вибрионов – глюкозы. Временные профили рН среды культивирования и количества глюкозы на производственном и разработанном биореакторах представлены на рисунке.

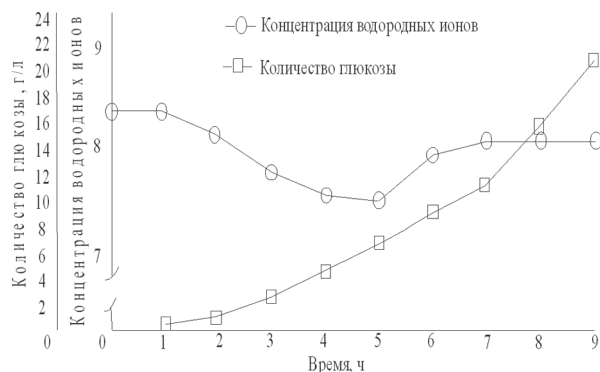
Анализ кривых, представленных на рисунке, показывает практически полное совпадение временных профилей рН среды культивирования и количества глюкозы на производственном и сконструированном биореакторах при выращивании штамма *V. cholerae* 569В Инаба. Максимальное закисление культуральной среды происходит к 5-му часу выращивания, после чего наблюдается возрастание рН, которое достигает своего максимума к 7-му часу и далее не меняется до окончания выращивания.

Временные профили рН среды культивирования и количества глюкозы на производственном и сконструированном биореакторах при выращивании штамма *V. cholerae* М-41 Огава сходны со значениями, полученными при выращивании штамма *V. cholerae* 569В Инаба. Также максимальное закисление культуральной среды происходит к 5-му часу выращивания, после чего наблюдается возрастание рН, которое достигает своего максимума к 7-му часу и далее не меняется до окончания выращивания.

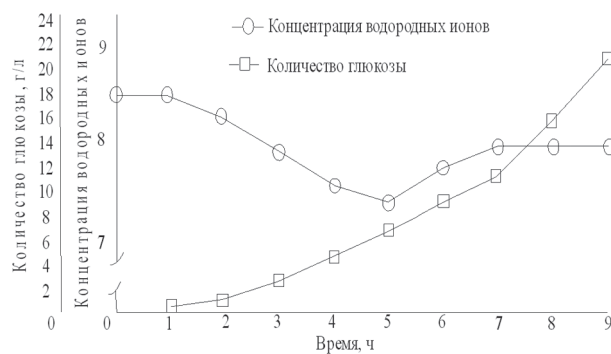
Таким образом, изучение изменения уровня рН культуральной среды в ответ на введение основного энергетического источника питания холерных вибрионов – глюкозы при культивировании производственных штаммов в производственном и сконструированном биореакторах не выявило значимых различий.

Кроме того, на всех этапах культивирования производственных штаммов проверяли их морфологию путем микроскопии мазков, окрашенных по Граму. В мазках, приготовленных из культуральной жидкости производственных и сконструированного биореакторов, вибрионы имели вид слегка изогнутых грамтрицательных палочек длиной 1,5–4,0 мкм, толщиной 0,2–0,4 мкм, обладали полиморфизмом.

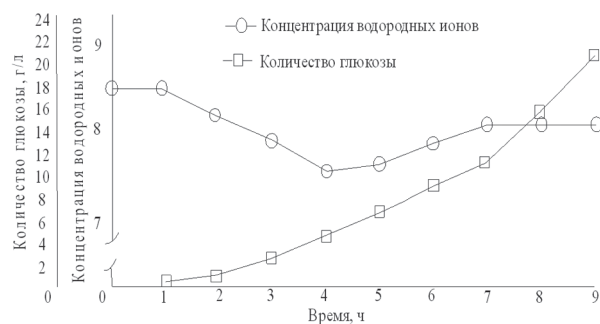
На заключительном этапе работы были определены физико-химические и иммунобиологические свойства вакцины холерной бивалентной химической таблетированной, полученной на сконструированном ферментационном оборудовании и с использованием разработанной экспериментальной технологии концентрирования. Одновременно с эксперименталь-



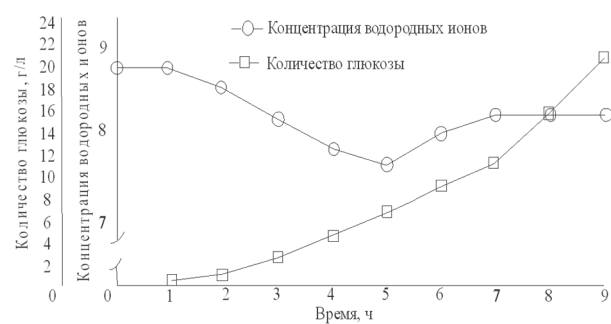
а



б



в



г

Временные профили pH среды культивирования и количества глюкозы:

а – на производственном биореакторе при выращивании штамма *V. cholerae* 569B Инаба; б – на сконструированном биореакторе при выращивании штамма *V. cholerae* 569B Инаба; в – на производственном биореакторе при выращивании штамма *V. cholerae* M-41 Огава; г – на сконструированном биореакторе при выращивании штамма *V. cholerae* M-41 Огава

ными сериями вакцины исследованиям, в качестве контроля, были подвергнута производственная се-

рия № 86, полученная по регламентной технологии. Полученные данные, представленные в табл. 2, по-

Таблица 2

Результаты исследования нормируемых физико-химических и иммунобиологических свойств серий вакцины

Наименование показателя	Требования нормативной документации	Значение показателя по сериям	
		контроль	экспериментальная
Описание	Таблетка – серовато-желтая компактная масса, покрытая светлой блестящей кислотоустойчивой оболочкой	Соответствует	
Ионы аммония и сульфат-ионы	Не допускается наличия ионов аммония и сульфат-ионов	Отсутствуют	
pH растворенного препарата	От 6,7 до 7,4	6,7	6,9
Распадаемость	Оболочка таблетки вакцины должна быть устойчива к действию децимолярного раствора соляной кислоты в течение 3 ч и распадаться в децимолярном растворе натрия гидроксида в течение 1 ч при температуре (37±1) °C	Устойчива – 3 ч 25 мин; распадается в течение 57 мин	Устойчива – 3 ч 35 мин; распадается в течение 55 мин
Средняя масса таблетки	От 0,285 г до 0,315 г	0,3	0,29
Формалин	Не более 0,2 %	0,012	0,014
Потеря в массе при высушивании	Не более 5 %	4,6	4,15
Микробиологическая чистота	Допускается не более 1000 колоний непатогенных микроорганизмов на одну таблетку. Вакцина не должна содержать патогенных и условно патогенных микроорганизмов	Не содержит патогенных и условно патогенных микроорганизмов; непатогенных – 44 колонии	Не содержит патогенных и условно патогенных микроорганизмов; непатогенных – 34 колонии
Токсичность	Вакцина должна быть нетоксичной	Нетоксичны	
Специфическая безопасность	Вакцина должна быть специфически безопасной	Специфически безопасны	
Специфическая активность			
антигенная активность по анатоксиносвязыванию	Должна содержать (100000±20000) единиц связывания анатоксина (ЕС)	100000	120000
содержание О-антигена	Не менее 2000 у.е. штаммов <i>V. cholerae</i>	10240	10480
иммуногенность	ЕД ₅₀ должна быть не более 1/20000 части таблетки	1/125000 (сер. Огава) 1/68000 (сер. Инаба)	1/142000 (сер. Огава) 1/100000 (сер. Инаба)

казали, что экспериментальная серия удовлетворяет требованиям нормативных документов, а ее качество не уступает вакцине, приготовленной по существующей технологии.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что культивирование производственных штаммов холерных вибрионов на разработанном биореакторе обеспечивает получение кондиционных нативных протективных антигенов. Изучение физиологических и морфологических свойств производственных штаммов холерных вибрионов в ходе их глубинного культивирования на производственных и разработанном биореакторах показало их идентичность. Исследование физико-химических и иммунобиологических свойств вакцины холерной химической бивалентной таблетированной, полученной с использованием разработанного биореактора, выявило, что она соответствует требованиям нормативной документации и не уступает по качеству препарату, производимому традиционным способом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. М.: КолосС; 2004. 296 с.
2. Лапшенков Г.И., Носов Г.А., Зиновкина Т.В. и др. Инженерные основы биотехнологии. М.: МГАТХТ им. М.В.Ломоносова; 2005. 380 с.

3. Никифоров А.К., Васин Ю.Г., Щербаков Д.А., Ульянов А.Ю., Строганов В.В., Еремин С.А. Ферментационная установка для культивирования микроорганизмов. Патент 86184 РФ, опубл. 27.08.09 г. Бюл. № 24.

4. Ульянов А.Ю., Еремин С.А., Васин Ю.Г. и др. Разработка биореактора и оценка возможности его использования в производстве холерной вакцины. Вестник Саратовского государственного университета им. Н.И.Вавилова. 2011; 1:39–44.

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

1. Biryukov V.V. [Fundamentals of Industrial Biotechnology]. M.; 2004. 296 p.
2. Lapshenkov G.I., Nosov G.A., Zinovkina T.V. et al. [Engineering Fundamentals in Biotechnology]. M.; 2005. 380 p.
3. Nikiforov A.K., Vasin Yu.G., Shcherbakov D.A., Ul'yanov A.Yu., Stroganov V.V., Eremin S.A. [Fermentation unit for cultivation of microorganisms]. RF patent № 86184.
4. Ul'yanov A.Yu., Eremin S.A., Vasin Yu.G. et al. [Engineering of bioreactor and assessment of its possible application in the production of cholera vaccine.]. Vestnik Sar. Gosagr. Universit. 2011; 1:39–44.

Authors:

Nikiforov A.K., Komissarov A.V., Ul'yanov A.Yu., Eremin S.A., Volokh O.A., Belyakova N.I., Aleshina Yu.A., Vasin Yu.G. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Никифоров А.К., Комиссаров А.В., Ульянов А.Ю., Еремин С.А., Волох О.А., Белякова Н.И., Алешина Ю.А., Васин Ю.Г. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 06.02.12.

А.Н.Шиков¹, Е.И.Сергеева¹, О.К.Демина¹, В.А.Терновой¹, В.В.Рябинин², Е.В.Костина²,
Е.М.Малкова¹, А.Н.Синяков², А.П.Агафонов¹

РАЗРАБОТКА ДНК-БИОЧИПА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ СУБТИПОВ ВИРУСА ГРИППА А

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

²Новосибирский институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Разработан ДНК-биочип для определения субтипов вируса гриппа А, патогенных для человека. Микрочип способен определять Н1, Н3, Н5-субтипы гемагглютинина (включая Н1-субтип гемагглютинина пандемического вируса гриппа А/Н1N1(2009)) и N1, N2-субтипы нейраминидазы вируса гриппа. Полученный микрочип был успешно апробирован на штаммах высокопатогенного вируса гриппа птиц А/Н5N1, пандемического вируса гриппа А/Н1N1(2009), сезонных вирусах гриппа А/Н1N1 и А/Н3N2.

Ключевые слова: вирус гриппа А, биочип, субтипирование вируса гриппа.

A.N.Shikov¹, E.I.Sergeeva¹, O.K.Demina¹, V.A.Ternovoy¹, V.V.Ryabinin², E.V.Kostina², E.M.Malkova¹,
A.N.Sinyakov², A.P.Agaphonov¹

Development of DNA-Biochip for Identification of Influenza A Virus Subtypes

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

²Novosibirsk Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk

Developed was the DNA-biochip to identify subtypes of influenza A virus, pathogenic for humans. Microchip was capable of detecting H1, H3, H5-subtypes of hemagglutinin (including H1-subtype of pandemic A/H1N1(2009) influenza virus) and neuraminidase subtypes N1,N2 of influenza virus. This microchip was successfully tested on the strains of A/H5N1 highly pathogenic avian influenza virus, A/H1N1(2009) pandemic influenza virus, A/H1N1 and A/H3N2 seasonal influenza viruses.

Key words: A influenza virus, biochip, subtyping of influenza virus.

Вирус гриппа типа А принадлежит семейству *Orthomyxoviridae*. Субтипирование вируса гриппа происходит согласно антигенной специфичности поверхностных гликопротеинов — гемагглютинина (НА) и нейраминидазы (НА), в настоящее время известно 16 субтипов гемагглютинина и 9 субтипов нейраминидазы [6]. Только комбинация из трех субтипов гемагглютинина вируса гриппа (Н1, Н2 и Н3) и двух субтипов нейраминидазы (N1 и N2) вызывали эпидемии и пандемии в прошлом [1]. Самой известной масштабной пандемией считается пандемия испанского гриппа (H1N1) в 1918 г., жертвами которого стали по разным данным от 20 до 50 млн человек [4]. За ней следуют пандемии азиатского гриппа (H2N2) в 1957 г. и гонконгского (H3N2) в 1968 г., унесшие около 4 и 1 млн человеческих жизней соответственно [10]. В 2003 г. внимание человечества было приковано к новому высокопатогенному варианту гриппа птиц H5N1, летальность для людей при котором достигает 60 % [5]. Опасения пандемии не подтвердились, однако периодические случаи заражения людей этим вариантом вируса гриппа регистрируются в Египте, Таиланде, Китае, Индонезии, Камбоджи, Вьетнаме, Турции [http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2010_12_09/en/index.html].

Весной 2009 г. появился новый вариант вируса гриппа H1N1sw [3], содержащий в своем составе фрагменты геномов вирусов гриппа человека, птиц и свиней. В июне этого же года ВОЗ объявила о пандемии гриппа, вызванного этим вариантом

вируса [http://www.who.int/csr/don/2009_04_24/en/index.html]. Для своевременного реагирования и введения мероприятий, препятствующих быстрому распространению высокопатогенных вариантов вируса гриппа птиц и пандемического вируса гриппа А/Н1N1(2009), в настоящее время остро встал вопрос о дифференциальной диагностике вируса гриппа и его субтипировании.

Основными методами субтипирования в настоящее время являются серологические (реакция торможения гемагглютинации — РТГА), а также методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Однако вследствие высокой скорости изменчивости поверхностных гликопротеинов НА и НА могут возникать трудности в субтипировании. По этой причине актуально использовать дополнительные методы диагностики, а также их комбинации для получения достоверного результата.

В настоящий момент детекция на основе ДНК-биочипа является одним из альтернативных методов дифференциальной диагностики вируса гриппа, так как этот метод позволяет совместить производительность метода амплификации нуклеиновых кислот и широкие возможности скрининга с помощью микрочипа. Ранее в литературе описывались попытки создать на основе ДНК-биочипов систему для детекции и субтипирования вируса гриппа [2, 7, 6].

Целью работы явилась оригинальная разработка ДНК-биочипа, выявляющего 6 субтипов (Н1, в том числе Н1sw пандемического вируса гриппа

А/Н1N1(2009), Н2, Н3, Н5, Н7, Н9) гемагглютини́на и 3 субти́па (N1, N2, N3) нейраминидазы для дифференциальной диагностики данных субтипов вируса гриппа типа А.

Материалы и методы

Штаммы вируса гриппа. В работе использовались штаммы вируса гриппа типа А: А/Aichi/2/68(Н3N2), А/chicken/Kurgan/05/2005(Н5N1), А/Novosibirsk/1/09(Н1N1), А/Ekaterinburg/01/2009(Н1N1)у. Штамм вируса гриппа А/Aichi/2/68(Н3N2) был получен из НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН, Москва, а А/chicken/Kurgan/05/2005(Н5N1) – из НИИ гриппа РАМН, Санкт-Петербург. Вирусы сезонного гриппа А/Novosibirsk/1/09(Н1N1) и пандемического гриппа А/Ekaterinburg/01/2009(Н1N1) у выделены в ГНЦ ВБ «Вектор». Все штаммы были наработаны на культуре клеток MDCK (Madin Darby Canine Kidney), полученной из отдела клеточных технологий ГНЦ ВБ «Вектор». Клетки культивировались в атмосфере, содержащей 5 % CO₂ при температуре 37 °С. Для поддержания культуры клеток использовали питательную среду DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium (ООО «Биолот», Россия) с добавлением 2 ммоль/л глутамина («Sigma-Aldrich», США) и антибиотиков: 100 мкг/мл пенициллина и 100 МЕ/мл стрептомицина.

Получение препаратов вируса гриппа типа А. Для исследования были использованы препараты вирусов, приготовленные следующим образом: на 5-е сутки после заражения из культуральных сосудов отбирали культуральную вируссодержащую жидкость (КВЖ). Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 6000 g при температуре 4 °С в течение 10 мин, а к надосадочной жидкости добавляли полиэтиленгликоль – ПЭГ 6000 до конечной концентрации 8 % (масса/объем). Суспензию перемешивали в течение 1 ч при температуре 4 °С и затем центрифугировали 20 мин при 1000 g. Полученный осадок ресуспендировали в STE буфере (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,8) и наносили на градиент, состоящий из 10–60 % растворов сахарозы. Центрифугирование проводили в течение 4 ч при 150000 g. Фракции, содержащие по результатам реакции гемагглютинации (РГА) максимальное количество вируса гриппа, использовали для анализа.

Экстракция РНК и синтез кДНК вируса гриппа типа А. Вирусную РНК выделяли из объема 50 мкл с использованием коммерческого набора «РибоСорб» (ООО «ИнтерЛабСервис», Москва) согласно инструкции производителя. Комплиментарная ДНК синтезировалась на матрице суммарной РНК с использованием синтетического праймера 5'-GACTAATACGACTCACTATAGGGAGCAAAAGCAGG-3', универсального для всех субтипов вируса гриппа. Синтез проводился в 20 мкл раствора, состоящего из 1 мкл праймера 5'-GACTAATACGACTCACTATAGGGAGCAAAAGC

AGG-3' (20 мкМ), 9 мкл РНК и 2 мкл dNTP (10 mM) нагревали 10 мин при температуре 65 °С, охлаждали во льду, добавляли 4 мкл 5х кДНК буфера, 1 мкл 0,1 M DTT, 1 мкл РНКазина (40 а.е.), 1 мкл воды, 1 мкл обратной транскриптазы ThermoScript («Invitrogen», США). Смесь центрифугировали и инкубировали при температуре 55 °С – 5 мин, при 60 °С – 55 мин.

Изготовление микрочипов для субтипирования вируса гриппа типа А. Печатающая микрочипы, зонды наносили на стеклянные, содержащие изотиоцианатную группу, слайды методом контактной печати на споттере BioOdyssey Calligrapher Miniarrayer («BioRad», США).

Использованные для амплификации фрагменты генов нейраминидазы, гемагглютини́на, М1 белка матрикса пары праймеров приведены в таблице. Длина нарабатываемых ампликонов составляла ~830 и 600 нуклеотидов для гена нейраминидазы, ~600 и 800 нуклеотидов для гена гемагглютини́на и ~900 нуклеотидов для гена М1 соответственно.

Для получения флуоресцентно меченных ампликонов проводили ПЦР в асимметричном режиме. Состав реакционной смеси (50 мкл): буфер для ПЦР (1,5 mM MgCl₂, KCl, (NH₄)₂SO₄, трис-HCl, pH 8,7) («Qiagen», Германия), 1,5 mM MgCl₂, 200 nM dATP, dCTP, dGTP, 70 nM dTTP, 100 nM dUTP-Cy3, 80 nM прямого праймера, 1 мкМ обратного праймера, 1,25 ед. Hot Start Taq-полимеразы («Qiagen», Германия) и 2 мкл раствора кДНК. ПЦР проводили в термочиклере iCycler («BioRad», США), используя следующий протокол: 95 °С – 15 мин, затем 35 циклов: 94 °С – 30 с; 52–55 °С – 30 с; 72 °С – 10 с, финальная элонгация – 72 °С – 1 мин. Контроль прохождения ПЦР осуществляли электрофоретически, используя 1 % агарозный гель. Флуоресцентно меченные ампликоны очищали от избытка меченых трифосфатов на гель-фильтрующих колонках («Qiagen», Германия), высушивали досуха на вакуумной центрифуге при температуре 60 °С.

Гибридизация анализируемых ампликонов. Высушенный образец ампликона растворяли в 10 мкл воды, добавляли 10 мкл 2-кратного гибридизационного буфера (1-кратный гибридизационный буфер: 6х SSC, 5х раствор Денхардта, 0,1 % Tween 20) и прогревали перед нанесением на слайд 2 мин при температуре 97 °С, а затем охлаждали во льду. Гибридизацию проводили в гибридизационной камере («ArrayIt», США) при температуре 55–60 °С в течение 2 ч. Затем слайд последовательно отмывали в растворах 6х SSC, 2х SSC + 0,1 % SDS, 2х SSC и 1х SSC, центрифугировали и сканировали на сканере Scan Array Express 2.0 («Perkin Elmer», США) при длине волны возбуждающего лазера $\lambda = 543$ нм.

Результаты и обсуждение

Первая публикация о разработке ДНК-биочипа была в журнале Science в 1995 г. [11], за 15 лет этот

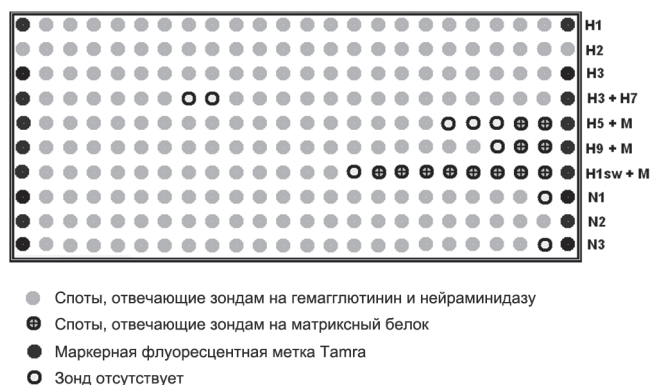


Рис. 1. Структура биочипа для идентификации субтипов вируса гриппа А, потенциально опасных для человека

метод занял значительное место в области биосенсорных технологий. В настоящее время ДНК-биочипы широко используются в исследовании нуклеиновых кислот и белков, современные ДНК-биочипы позволяют проводить количественные исследования экспрессии генов и точечных мутаций.

В мире разработаны биочипы для идентификации и типирования энтеровирусов [12], субтипирования вируса гриппа [2, 7, 6], генотипирования вируса кори [9], дифференциальной диагностики микозов [8] и другие.

В данной работе представлен метод выявления вируса гриппа и субтипирования гемагглютинина (субтипов Н1, в том числе Н1sw пандемического вируса гриппа А/Н1N1(2009), Н2, Н3, Н5, Н7, Н9) и 3 субтипа (N1, N2, N3) на основе оригинального ДНК-биочипа. На рис. 1 представлена схема разработанного биочипа.

Нанесение зондов осуществляли на стеклянные, содержащие изотиоцианатную группу, слайды. Каждый слайд содержал 6 эквивалентных микромассивов зондов (микроэррей). Средний диаметр спотов (ячеек микрочипа с иммобилизованными зондами) был ~360 мкм, расстояние между спотами ~760 мкм. Формат микроэррея составлял 24×10 спотов. Печать проводилась из 384-луночного планшета (24×16).

На рис. 1 приведено расположение зондов на планшете и, соответственно, в микроэррее. В край-

ние ячейки каждой строки планшета, за исключением строки В, добавлялся маркерный зонд, несущий на 3'-конце аминокислотную группу, необходимую для иммобилизации на поверхности слайда, а на 5'-конце – флуорофор на основе тетраметилродамина (Tamra), позволяющий визуализировать границы субэррея и определять качество печати чипа.

Каждый микромассив ДНК-биочипа, предназначенный для субтипирования одного штамма вируса, содержит зонды выявляющие Н1, Н1sw, Н2, Н3, Н5, Н7, Н9-субтип гена гемагглютинина и N1, N2, N3-субтип гена нейраминидазы, а также зонды, выявляющие ген М1 вируса гриппа типа А. Последние зонды используются для подтверждения, что анализируемый вирус относится именно к типу А. Левый и правый края микроэррея образуют споты, содержащие флуоресцентную метку. Они предназначены для контроля печати слайда и позиционирования спотов при измерении их флуоресценции. Один микрочип может содержать до 6 микромассивов зондов. Таким образом, на одном микрочиповом слайде можно проанализировать 6 различных изолятов вируса гриппа.

Принципиальная схема субтипирования генов вируса гриппа А на микрочипе включает следующие стадии:

- из анализируемого образца выделяют суммарную РНК;

- с использованием универсального праймера 5'-GACTAATACGACTCACTATAGGGAGCAAAAGCAGG-3', специфичного к РНК вируса гриппа типа А, получают кДНК;

- с помощью праймеров 5'-CTATAGGGAGCAAAGCAGGAGT-3' и 5'-CACTATAGAAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT-3', специфичных к гену нейраминидазы, из кДНК путем проведения ПЦР получают полноразмерный ампликон гена нейраминидазы вируса гриппа типа А;

- полученный ампликон реамплифицируют в асимметричном режиме с праймерами NA_F1 и NA_R1, NA_F2 и NA_R2 (таблица) и метят путем введения флуоресцентной метки в его состав;

- аналогичным образом, используя праймеры HA_F1 и HA_R1, HA_F2 и HA_R1 (таблица), полу-

Структура олигонуклеотидных праймеров, использованных при разработке ДНК-биочипа для субтипирования вируса гриппа

Праймер	Длина*	Структура праймера (5' – 3')	Ген
NA_F1	23	CTATAGGGAGCAAAAGCAGGAGT (1 (2))	NA
NA_R1	22	TAACAGGARCCTCTCTARTG	
NA_F2	23	CAYTAYGAGGARTGYTCTCTGTTA 1	
NA_R2	30	CACTATAGAAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT 12	
HA_F1	28	GACTCACTATAGGGAGCAAAAGCAGGGG	HA
HA_R1	23	TCWATRAANCCNGCDATDGCCHCC	
HA_F2	23	GGDGCHATHGCNGGNTTYATWGA	
HA_R2	34	GGTGACACTATAGAAGTAGAAACAAGGGTGTGTTT	
M_T7_F	38	GACTAATACGACTCACTATAGGGAGCAAAAGCAGGTAG	M1
M_SP6_R	43	GACATTTAGGTGACACTATAGAAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT	

*Длина праймера в нуклеотидах.

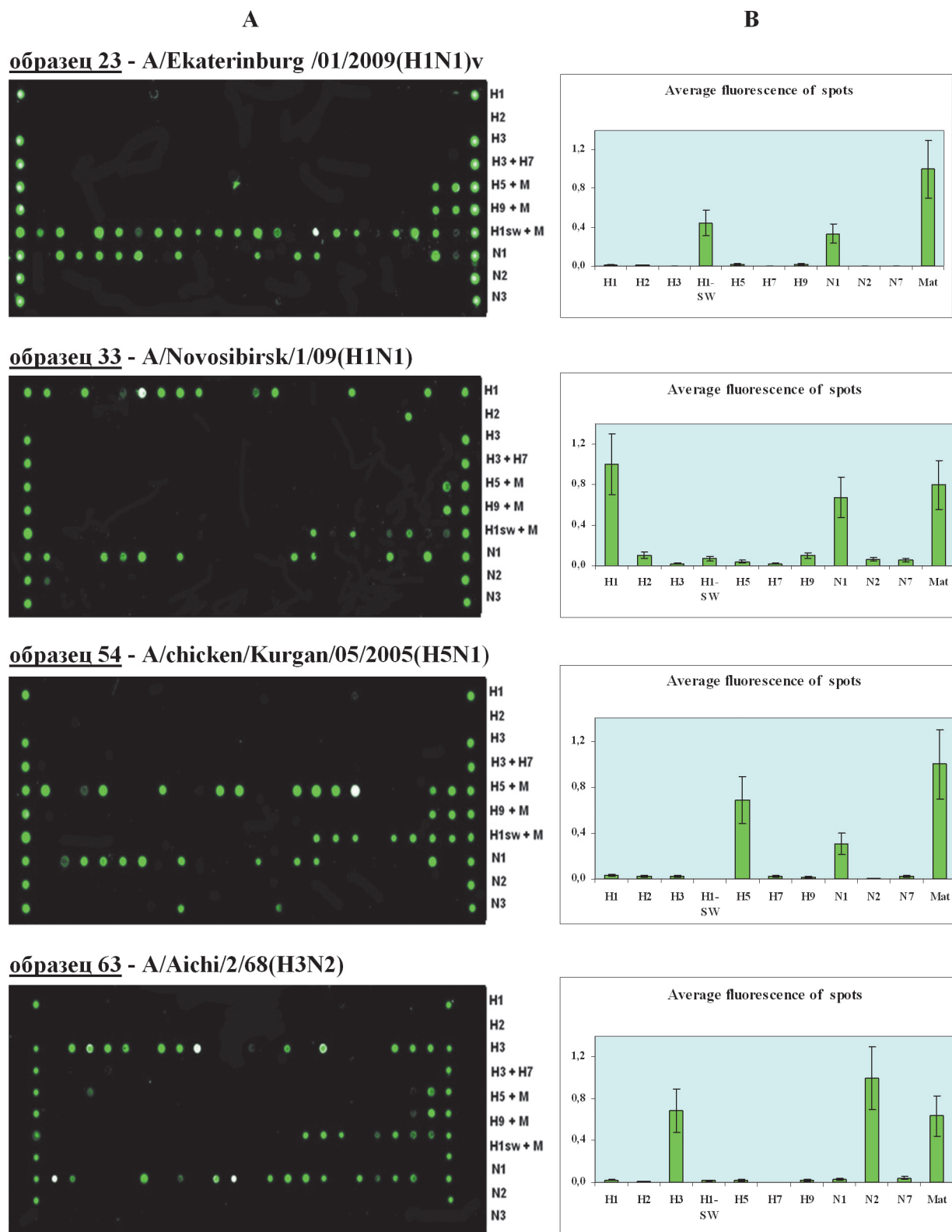


Рис. 2. Результаты анализа субтипизуемых штаммов гриппа:

A – гибридационный паттерн анализируемого штамма. **B** – результаты субтипирования после подсчета среднего значения флуоресцирующих пятен. *H1, H2, H3 H1v* (субтип пандемического вируса гриппа 2009), *H5, H7, H9* – субтипы гена гемагглютинина, *N1, N2, N7* – субтипы гена нейраминидазы, *Mat* – маркер гена матриксного белка

чают флуоресцентно меченные ампликоны гена гемагглютинина;

- используя праймеры M_T7_F и M_SP6_R (таблица), получают флуоресцентно меченные ампли-

коны гена M1 белка матрикса вируса гриппа типа A;

- на следующей стадии проводят гибридизацию смеси полученных ампликонов с дискриминирующими зондами, входящими в состав разработанного

микрочипа;

- анализ результатов гибридизации проводят с помощью сканера микрочипов и программы ScanArray Express («Perkin-Elmer», США).

Для объективного представления результатов гибридизации на микрочипе проводили анализ результатов сканирования чипа не визуально, а инструментально. С этой целью нами после проведения сканирования проводился анализ флуоресценции спотов с использованием программы ScanArray Express («Perkin-Elmer», США). Результаты анализа представляются в виде гистограммы. При определении субтипа вируса гриппа определяли среднее значение флуоресценции спота каждого субтипа. Экспериментально установлено, что такой подход дает лучшие результаты при оценке соотношения сигнал/шум.

При помощи созданного ДНК-биочипа были проанализированы кодированные пробы вируса гриппа типа А субтипа Н3Н2 (штамм А/Аichi/2/68(Н3Н2)), субтипа Н5Н1 (штамм А/chicken/Kurgan/05/2005(Н5Н1)), субтипа Н1Н1 (штамм А/Novosibirsk/1/09 (Н1Н1)) и пандемического вируса гриппа А субтипа Н1Н1 (А/Еkaterinburg/01/2009(Н1Н1)в). Анализируемые образцы были успешно субтипированы с помощью разработанного микрочипа (рис. 2).

При исследовании анализируемых проб значение специфической флуоресценции достоверно превышало значение фоновой ($P < 0,05$). Кроме того, во всех образцах достоверно детектирован М ген.

Таким образом, был разработан ДНК-биочип, выявляющий сезонные штаммы вируса гриппа Н1Н1 и Н3Н2 субтипов, высокопатогенный вирус гриппа птиц субтипа Н5Н1 и пандемический вариант вируса гриппа субтипа Н1Н1(2009). Преимуществом используемого микрочипа является одновременное субтипирование анализируемого изолята вируса гриппа со всеми возможными зондами, специфическими для каждого субтипа гемагглютинина и нейраминидазы. Показана принципиальная возможность использования для диагностики и субтипирования высокопатогенного вируса гриппа птиц А/Н5Н1, пандемического вируса гриппа А/Н1Н1(2009), сезонных вирусов гриппа А/Н1Н1 и А/Н3Н2 ДНК-биочипа. Наличие специфических зондов для Н7 и Н9-субтипов вируса гриппа потенциально позволяет разработанному микрочипу выявлять и эти субтипы. Очевидна необходимость оценки чувствительности полученного метода в последующей работе. При дальнейшем усо-

вершенствовании данная разработка является перспективной как дополнительный, альтернативный метод субтипирования вируса гриппа типа А. Также этот метод имеет перспективы для использования его в практике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Burke A. Cunha Influenza: historical aspects of epidemics and pandemics. Infect. Dis. Clin. North Am. 2004; 18:141–55.
2. Fesenko E.E., Kireyev D.E., Gryadunov D.A., Mikhailovich V.M., Grebennikova T.V., L'vov D.K. et al. Oligonucleotide microchip for subtyping of influenza A virus. Influenza Other Respi Viruses. 2007; 1(3):121–9.
3. Garten R.J., Davis C. T., Russell C.A. et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. Science. 2009; 325:197–8.
4. Gottfredsson M., Halldorsson B., Jonsson S. et al. Lessons from the past: Familial aggregation analysis of fatal pandemic influenza (Spanish flu) in Iceland in 1918. Proc. Natl Acad. Sci USA. 2008; 105:1303–8.
5. Guleria R., Kumar J., Mohan A., Wig N. Influenza A: from highly pathogenic H5N1 to pandemic 2009 H1N1. Epidemiology and clinical features. Indian J. Microbiol. 2009; 49:315–9.
6. Huang Y., Tang H., Duffy S., Hong Y., Norman S., Ghosh M. et al. Multiplex Assay for Simultaneously Typing and Subtyping Influenza Viruses by Use of an Electronic Microarray. J. Clin. Microbiol. 2009; 47(2):390–6.
7. Kessler N., Ferraris O., Palmer K., Marsh W., Steel A. Use of the DNA flow-thru chip, a three-dimensional biochip, for typing and subtyping of influenza viruses. J. Clin. Microbiol. 2004; 42(5):2173–85.
8. Leinberger D.M., Schumacher U., Autenrieth I.B., Bachmann T.T. Development of a DNA Microarray for Detection and Identification of Fungal Pathogens Involved in Invasive Mycoses. J. Clin. Microbiol. 2005; 43:4943–53.
9. Neverov A.A., Riddell M.A., Moss W.J., Volokhov D.V., Rota P.A. et al. Genotyping of Measles Virus in Clinical Specimens on the Basis of Oligonucleotide Microarray Hybridization. J. Clin. Microbiol. 2006; 44:3752–9.
10. Peiris J.S.M., Menno D.J., Guan Y. Avian Influenza Virus (H5N1): a Threat to Human Health. Clin. Microbiol. 2007; 20(2):243–67.
11. Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science. 1995; 270:467–70.
12. Susi P., Hattara L., Waris M., Luoma-aho T., Siitari H., Hyytiä T., Saviranta P. Typing of Enteroviruses by Use of Microarray Oligonucleotide Arrays. J. Clin. Microbiol. 2009; 47:1863–70.

Authors:

Shikov A.N., Sergeeva E.I., Demina O.K., Ternovoy V.A., Malkova E.M., Agaphonov A.P. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Ryabinin V.V., Kostina E.V., Sinyakov A.N. Novosibirsk Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine. Novosibirsk, Russia.

Об авторах:

Шиков А.Н., Сергеева Е.И., Демина О.К., Терновой В.А., Малкова Е.М., Агафонов А.П. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Рябинин В.В., Костина Е.В., Синяков А.Н. Новосибирский институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Новосибирск

Поступила 24.11.11.

А.В.Горбунов, Н.С.Нефёдова, М.А.Шмидт

МЕДИКО-САНИТАРНЫЕ И ПАЗАРИТОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЭКОЛОГИИ СИЗОГО ГОЛУБЯ (COLUMBA LIVIA)

ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И.Вавилова», Саратов

Собраны сведения, освещающие санитарно-гигиенические и паразитологические аспекты жизнедеятельности сизого голубя в Саратове. Установлены типы внешних патологий голубя, их природа и частота проявлений. Синантропная популяция голубя и гнезда птиц обследованы на наличие гельминтов и эктопаразитов. Определена роль гнездовой станции чердаков жилых зданий в санитарной и эпидемиологической обстановке селитебной зоны города.

Ключевые слова: сизый голубь, синантропизация, патология, паразитология, гнездовые колонии, эпизоотологическая и санитарная гигиена.

A.V.Gorbunov, N.S.Nefedova, M.A.Shmidt

Medico-Sanitary and Parasitological Aspects of Rock Pigeon Ecology (Columba livia)

N.I.Vavilov Saratov State Agrarian University, Saratov

Collected are the data on sanitary-hygienic and parasitological aspects of rock pigeon vital activity in Saratov. Distinguished are the types of pigeon exterior pathologies, their character and frequency of occurrence. Synanthropic population and nests of the birds are searched for the presence of helminthes and ectoparasites. Identified is the role of nesting sites, located in attics of residential buildings, in sanitary and epidemiological situation of the city settlement zone.

Key words: rock pigeon, synanthropization, pathology, parasitology, nesting colonies, epizootiological and sanitary hygiene.

Синантропная популяция сизого голубя широко распространена в Саратове. В разные годы нашего исследования (2000–2011 гг.) численность популяции оценивается от 40–50 до 70–80 тыс. особей. Голубь оседло живет на селитебной территории города и образует разного типа скопления числом от 20 до 1000 особей. Постоянно голуби концентрируются в общественных местах (парки, скверы, площади, остановки, вокзал, автостанция, торговые места, продовольственные рынки), у мусорных контейнеров, на свалках ТБО, складах и предприятиях, связанных с хранением, переработкой и реализацией зернопродуктов. Наиболее постоянные по времени скопления птиц образуются на чердаках многоэтажных жилых домов. Тесный контакт голубя с населением Саратова имеет потенциальную санитарно-эпидемиологическую опасность [1, 2].

В процессе изучения экологии сизого голубя в Саратове мы собрали некоторые сведения, освещающие санитарно-гигиенические и паразитологические аспекты жизнедеятельности голубя в городе.

В 6 районах Саратова обследовано 51 скопление голубей общим числом 3230 особей. Наблюдаемые скопления насчитывали от 40 до 120 птиц. Всего отмечено 148 птиц (4,6 %) с наружными патологиями, а доля скоплений с такими птицами составила 92 %. Число голубей с патологиями в одном скоплении – 1–14 (до 11 %) особей. Птицы с наружными патологиями распределились следующим образом: повреждения оперения (разреженность и курчавость опухала) – 9 особей (6,0 %); повреждение глаз – 1

(0,7 %); искривление клюва – 3 (2,0 %); повреждение восковицы – 7 (4,7 %); опухоль на голове – 1 (0,7 %); нарост на цевке лапы – 1 (0,7 %); отсутствие одного или всех фаланг пальцев на лапе – 118 (79,7 %); механическое повреждение цевки одной или обеих лап – 11 (7,4 %).

Патология оперения у птиц вызвана пухоедами *Columbicola columbae* и *Goniocotes bidentatus*. Основными местами их локализации были маховые, кроющие и пуховые перья. Обширные повреждения наблюдали под крыльями, на боках и надхвостье. Патология, вызванная пухоедами, наблюдается относительно редко, но сами насекомые обнаружены у 62 % взрослых птиц.

Патология восковицы и искривление верхнего клюва птиц обусловлены паразитированием *Knemidocoptes mutans*. При вскрытии восковицы клещ не обнаружен, но характерная картина патогенеза свидетельствует о его паразитизме.

Повреждения цевки голубей имеют разную природу. У 7 птиц это механические повреждения, сопровождающиеся утратой пальцев и различной их деформацией, у 3 птиц развилось заболевание кнемидокоптоз ног, вызванное клещом *Knemidocoptes mutans*. Поражалась нижняя часть цевки лап. В одном случае клещ идентифицирован.

Вскрыто 290 взрослых голубей. Из них 40 отловлены в сельской местности на зернохранилище. Эти птицы были здоровые, патологий не имели, гельминты и эктопаразиты на них не обнаружены. Другие 240 голубей добыты в разных районах Саратова: 120 осо-

бей летом и 120 – зимой. Еще 10 птиц пойманы большими, зимой на улице. Все голуби осмотрены внешне, ощиплены; у них вскрыты и осмотрены носовая полость, система пищеварения и все внутренние органы. Обнаружен аргасовый клещ *Argas zeflexus* (1–4 экз.), летом у 12 % птиц, зимой – 8 %; летом у 15 % голубей единично встречены два вида гамазид – *Omithonyssus sylviarum*, *Dermanyssus gallinae*. Гельминты не обнаружены, но в помете голубей их яйца встречаются. Осмотр 240 внешне здоровых птиц показал: три голубя имели признаки частичной закупорки зоба (твердый зоб), вызванной твердой пищей; две птицы имели некротические поражения (3–4 мм) слизистой оболочки железистого желудка. В зимний период у 5 птиц обнаружена гиперемия брыжейки в сочетании с венозным застоем в печени и сердце; 4 голубя имели на серозной оболочке тонкого кишечника парные инкапсулированные конгломераты желтоватого цвета размером с просыное зерно; 7 голубей (5 летом и 2 зимой) имели на слизистой оболочке толстого отдела кишечника расширенные, утолщенные участки длиной 6–10 мм. 10 больных голубей были проверены лабораторно на орнитоз – специфические антитела в РСК и РА не обнаружены. Среди них одна птица имела сильный воспалительный процесс клоаки и венозную гиперемию толстого отдела кишок; один голубь страдал переломом крыла, имел обширную гиперемию и гематому грудной мышцы и органов грудной полости; другая птица страдала отеком легких и имела мокрые выделения на клюве (выраженная клиника при орнитозе, но путем исследования мазков-отпечатков органов вирусносительства не установлено); семь других показали явные признаки истощения.

При тотальном обследовании в июле 2010 г. 216 птенцов-слетков 10 гнездовых колоний голубя установлен паразитизм пухоедов в 100 % случаев; перьевых клещей – 65 %; блох, иксодовых, аргасовых, краснотелковых клещей – 8–15 %; у 15 % птиц в помете обнаружены яйца гельминтов. В этих колониях в гнездах голубей (осмотрено 150 гнезд, расположенных на полу и 50 гнезд, расположенных на чердачных перекладах). Отмечены членистоногие из 14 отрядов, среди которых доминируют жесткокрылые, двукрылые, ногохвостки, чешуекрылые и клещи. Часто встречаются личинки мух и кожеедов. Птенцы голубя регулярно попадают в вентиляционные шахты квартир, где погибают и разлагаются. Через вентиляционные отверстия в квартиры проникают все микроскопические сочлены голубино биоценоза, в том числе блохи, клещи, личинки и жуки кожеедов. Тем же путем в квартиры заносится воздушная смесь пыли, частиц помета, яиц гельминтов, пухоеды и перьевые клещи голубя.

Чердаки здания – это ключевое жизненное пространство экологической ниши голубя. Здесь происходят спаривание, размножение и основная дефекация птиц, размещаются гнезда, места отдыха, ночевки, укрытия, образуются трофические и топические связи, формируется социальное поведение (хоминг,

импринтинг). Жизнь на чердаках занимает большую долю бюджета голубя: летом 25–40 % времени в сутки, зимой 65–70 % того же времени.

Постоянное местообитание колонии на чердаке характеризуется большим числом гнезд (25–370). Их биомасса составляет от 6,25–92,5 до 107,5–1591,1 кг на одном чердаке. В качестве строительного материала в гнезда заносятся веревки, вата, обрывки ткани, полиэтиленовая пленка, проволока, бумага, оболочка от кабеля. Пол чердака усеян экскрементами голубя, которые образуют субстрат из смеси керамзита, мелкого щебня, песка, экскрементов и стеблей растений. В 1 кг поверхностного субстрата стебли составляют до 20 г, экскременты – до 36 г. На площади чердака 780 м² их общая биомасса достигает 729,3 кг. Основной объем экскрементов размещен компактно в гнездах и главным образом в кучках – «сталагмитах» высотой 10–60 см. Их биомасса составляет 250–1050 кг. На чердаке многочисленны трупы и мумифицированные тушки птиц. Их количество на одном чердаке может достигать до 400 штук.

Таким образом, обитание синантропной популяции сизого голубя, в основном, связано с селитебной территорией города. С точки зрения эпизоотологии и санитарной гигиены наиболее опасным местом являются вентиляционные системы многоэтажных жилых зданий. Гнездование голубя в городе способствует локальному образованию специфической органической пыли, обладающей повышенной инвазивностью для человека. На голубях паразитируют пухоеды, перьевые клещи, клещ *Knemidocoptes mutans*. На птицах и в их гнездах обнаружены аргасовые, гамазовые, краснотелковые и иксодовые клещи, блохи и другие членистоногие (14 отрядов). В теплое время в гнездах голубей сосредотачивается много насекомых и их личинок, чему благоприятствуют скопления помета, растительные остатки, тушки погибших птиц. Голуби подвержены глистным инвазиям. Возбудитель орнитоза не обнаружен.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болезни птиц. М.: Сельскохозяйственная литература; 1962. 544 с.
2. Львов Д.К., Ильичев В.Д. Миграции птиц и перенос возбудителей инфекций (эколого-географические связи птиц с возбудителями инфекций). М.: Наука; 1979. 270 с.

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

1. [Avian Diseases]. M.: Agricultural Literature; 1962. 544 p.
2. L'vov D.K., Il'ichev V.D. [Bird Migrations and Vection of Infectious Agents (Ecological-Geographic Association of Birds and Infectious Agents)]. M.: Nauka; 1979. 270 p.

Authors:

Gorbunov A.V., Nefedova N.S., Shmidt M.A. N.I. Vavilov Saratov State Agrarian University. 335, Sokolovaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: biolog-55@mail.ru

Об авторах:

Горбунов А.В., Нефёдова Н.С., Шмидт М.А. Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И.Вавилова». 410005, Саратов, ул. Соколова, 335. E-mail: biolog-55@mail.ru

Поступила 27.03.12.

О.И.Коготкова, П.Б.Новиков, А.А.Зуенко, Л.В.Ляпустина, Т.М.Гридина, Т.И.Егшатын, А.Н.Куличенко

СИСТЕМА МЕНЕДЖМЕНТА КАЧЕСТВА В СТАВРОПОЛЬСКОМ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОМ ПРОТИВОЧУМНОМ ИНСТИТУТЕ

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь

Представлен анализ организации и направлений деятельности системы менеджмента качества. Определены направления ее дальнейшего совершенствования.

Ключевые слова: система менеджмента качества, область сертификации.

O.I.Kogotkova, P.B.Novakov, A.A.Zuenko, L.V.Lyapustina, T.M.Gridina, T.I.Egshatyan, A.N.Kulichenko

Quality Management System in Stavropol Research Anti-Plague Institute

Stavropol Anti-Plague Research Institute, Stavropol

The analysis of the structure of quality management system and the areas of its activity is presented. Trends for its further improvement are defined.

Key words: quality management system, certification scope.

Важным разделом в работе при оказании различных медицинских услуг, в том числе при проведении клинической лабораторной диагностики инфекционных заболеваний, при производстве медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП), является соблюдение регламентированных требований к качеству выпускаемой продукции и оказываемых услуг.

Система менеджмента качества (СМК) – это совокупность взаимосвязанных компонентов (процессов, персонала, документов, информационных технологий и т.д.), обеспечивающих стабильную, эффективную и качественную деятельность организации с позиции всех заинтересованных сторон.* Наличие сертифицированной СМК является одним из требований при государственной аккредитации и лицензировании различных видов деятельности организации.

Учитывая сказанное выше, целью работы был анализ функционирования системы менеджмента качества в Ставропольском противочумном институте.

СМК в институте была создана в 90-е годы прошлого века как комплекс организационных и технических мер, обеспечивающих выпуск МИБП для диагностики и профилактики особо опасных инфекций в соответствии с регламентированными требованиями. Работа в области СМК проводилась в различных направлениях с учетом требований GMP: управление качеством, обучение персонала, состояние технологических помещений и оборудования, документация, производство, контроль качества, рекламации, самоинспекция.

Позднее, в связи с введением в России ГОСТов серии Р ИСО, разработаны обязательные процедуры: «Управление документацией», «Управление записями», «Предупреждающие действия», «Корректирую-

щие действия», «Управление несоответствующей продукцией», «Внутренний аудит».

Для дальнейшего развития и совершенствования СМК с учетом процессного подхода было необходимо решить ряд задач: разработать политику руководства института в области качества; представить организационную структуру СМК в институте; выделить категории процессов в действующей СМК; систематизировать документацию, используемую в СМК; сертифицировать СМК на соответствие ГОСТу Р ИСО 9001-2008; определить основные направления развития СМК.

В настоящее время СМК охватывает различные сферы деятельности института: проведение фундаментальных и прикладных научных исследований и работ; разработку, производство и реализацию МИБП; оказание медицинских услуг по бактериологии; деятельность в области послевузовского и дополнительного образования; работу Испытательного лабораторного центра (ИЛЦ).

Дифференциация процессов является исходным этапом создания СМК. Процессы управления (менеджмента) необходимы для реализации стратегии предприятия и относятся к области ответственности руководства. Реализация основных процессов обеспечивает производство продукции и оказание услуг. Вспомогательные процессы служат для их поддержки. Поэтому в сфере деятельности СМК нами также выделено три вида процессов

Основными документами СМК служат Руководство по качеству мастер-файл (информация о предприятии) и документированные процедуры (стандарты предприятия), реализация которых осуществляется на основе разработанной политики в области качества.

Проведенная работа позволила нам в 2009 г. пройти сертификацию СМК на соответствие требованиям

*Исаев Р.А. Типовая система менеджмента качества коммерческого банка и ее архитектура. Методы менеджмента качества. 2010; 11:10–15.

ГОСТа Р ИСО 9001-2008 в ООО «Ставропольский краевой центр сертификации».

В связи с расширением деятельности института в области лабораторных исследований в 2010 г. проведена аккредитация впервые созданного в институте Испытательного лабораторного центра на соответствие требованиям ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025-2006. Для этого нами дополнительно были разработаны заявление о политике в области качества и руководство по качеству, система внешнего и внутреннего контроля качества.

Наличие сертифицированной СМК является одним из условий проведения в 2011 г. регистрации деклараций производства медицинских диагностических препаратов органом по сертификации медицинских изделий ЗАО «МЕДИТЕСТ», Москва.

Таким образом, проведенный анализ свидетельствует о том, что в институте разработана, внедрена и функционирует СМК. Развитие данной системы – процесс динамичный, охватывающий в течение времени новые области деятельности института. Это влечет за собой изменения в организационной структуре СМК, расширение процессов и объема регламентированной

документации, а также количества охваченного персонала и структурных подразделений.

В перспективе необходимо поддерживать и совершенствовать существующую СМК: проводить своевременную актуализацию документов, ввести и поддерживать электронную систему документооборота, разработать комплексную систему самоинспекции с учетом различных областей действия. СМК в институте является составной частью комплекса мероприятий по обеспечению защиты прав потребителей и удовлетворению потребительского рынка в заявленных товарах и услугах.

Authors:

Kogotkova O.I., Novakov P.B., Zuenko A.A., Lyapustina L.V., Gridina T.M., Egshatyan T.I., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Об авторах:

Коготкова О.И., Новаков П.Б., Зуенко А.А., Ляпустина Л.В., Гридина Т.М., Егшатын Т.И., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 18.07.11.

К 60-ЛЕТИЮ СТАВРОПОЛЬСКОГО НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ПРОТИВОЧУМНОГО ИНСТИТУТА

В 1952 г. на базе Ставропольской противочумной станции организован научно-исследовательский противочумный институт Кавказа и Закавказья. На институт было возложено оперативное и научное руководство противочумными учреждениями в Ставропольском крае, Грозненской области, Дагестанской АССР, Азербайджанской, Армянской и Грузинской ССР. Первым директором института был В.Н.Тер-Вартанов, обладавший богатым опытом в организации мероприятий по ликвидации чумы в Ставропольском крае. Большая роль в организации эпидемиологических и микробиологических исследований принадлежала профессорам И.Г.Иоффу и М.П.Покровской.

Научные направления деятельности института на протяжении всей его истории определялись эпидемиологической ситуацией в стране и на Кавказе. Вопросы изучения чумы всегда были основными. Специалистами института были открыты и изучены 8 природных очагов чумы Северного Кавказа и Закавказья. Весомый вклад в эти исследования внесли известные ученые – О.Н.Бочарников, П.Е.Найден, А.И.Дятлов, В.М.Гусев, П.А.Петров, П.Ф.Емельянов, И.З.Климченко, А.К.Акиев, Г.М.Грижебовский, М.П.Григорьев и др. Значительные успехи достигнуты в изучении возбудителя чумы. Выделен новый подвид – *Yersinia pestis caucasica*, циркулирующий в высокогорных очагах чумы. Изучены два новых плазмидовара *Y. pestis* из очага Центрального Кавказа, обладающие избирательной вирулентностью по отношению к лабораторным животным. Впервые выявлена их гетерогенность по VNTR-профилю и MLVA генотипам, дана оценка генетической вариабельности и территориального распределения штаммов с разными генотипами в целом по очагу и отдельным ландшафтно-географическим районам.

Создана уникальная, имеющая всероссийское и мировое значение, коллекция блох, насчитывающая свыше 3 млн экземпляров 917 видов, собранных на территории России, стран ближнего и дальнего зарубежья. При коллекции хранится самая полная в России научная библиотека по блохам, насчитывающая более 25 тыс. оттисков статей и 4 тыс. экземпляров книг. Основоположником и первым руководителем лаборатории медицинской паразитологии (создана в 1934 г. на базе ПЧС) был лауреат Государственной премии СССР, профессор И.Г.Иофф. В лаборатории работали выдающиеся ученые-паразитологи – О.И.Скалон, В.Е.Тифлов, Б.А.Ростигаев, А.И.Гончаров, Н.Ф.Лабунец, Б.К.Котти, И.В.Чумакова, Л.И.Белявцева, внесшие неоценимый вклад в разработку проблем экологии, эпизоотологии и

регуляции численности переносчиков возбудителей природно-очаговых болезней. Сотрудничество специалистов лаборатории с зарубежными учеными позволило создать 9 определителей блох на территории СССР и сопредельных стран.

Создана, систематизирована и поддерживается коллекция штаммов возбудителя чумы и других микроорганизмов, выделенных в очагах особо опасных инфекций на территории Кавказа и Закавказья, а также полученных из стран Европы, Азии, Африки, Южной Америки. Фонд ее составляет 3165 штаммов возбудителей I–IV групп патогенности.

Противоэпидемическая работа осуществлялась в рамках разработанных институтом региональных комплексных программ по обеспечению эпидемиологической безопасности в постоянном взаимодействии с санитарно-эпидемиологическими и противочумными учреждениями. Благодаря этой деятельности эпидемиологическая обстановка по особо опасным и природно-очаговым инфекциям на Кавказе была стабилизирована. В формирование и развитие научных эпидемиологических направлений большой вклад внесли известные ученые: В.Н.Фёдоров, Ю.М.Ралль, А.К.Акиев, М.П.Козлов, В.Н.Савельев, Г.Д.Брюханова, Ю.М.Евченко, В.И.Таран, А.П.Бейер, О.В.Малецкая. С 1973 г. в институте функционирует сотрудничающий с ВОЗ Центр по чуме (руководитель – профессор Г.М. Грижебовский), на базе которого прошли подготовку специалисты из 10 зарубежных стран, проведено два международных симпозиума.

Сегодня специалисты эпидотдела разрабатывают системы противоэпидемических мероприятий с применением ГИС-технологий для обеспечения биологической безопасности в регионе проведения массовых мероприятий (Олимпийские игры 2014 г.), при чрезвычайных ситуациях различного генеза.

Сотрудники института работали в эпидемических очагах холеры в Российской Федерации, на Украине, в республиках Северного Кавказа и Закавказья. Собрана и изучена большая коллекция патогенных штаммов холерного вибриона, создан электронный «Справочник-кадастр распространения холерного вибриона эльтор в воде поверхностных водоемов, сточных водах и у людей на Кавказе». Изучены биологические свойства холерных вибрионов, обусловивших вспышки холеры эльтор на Кавказе в период седьмой пандемии. Внесен существенный вклад в изучение гибридных вариантов *V. cholerae* биовара эльтор, вызвавших заболевание холерой в Дагестане в 1993, 1994 и 1998 гг.

С деятельностью ПЧС, а затем созданного института связано изучение туляремии на Северном

Кавказе. Учеными института В.Г.Пилипенко, М.А.Мирошниченко, М.М.Рудневым, Т.А.Щекиной, М.П.Тарасовым, Г.И.Басиловой, Н.И.Тихенко, А.А.Зайцевым, А.Ф.Брюхановым проведены исследования по выявлению природных очагов туляремии, изучению их эпизоотолого-эпидемиологических особенностей, биологических свойств возбудителя, усовершенствованию методов лабораторной диагностики и профилактики этого заболевания, определены основные факторы, способствующие укоренению туляремии на территории природного очага Ставропольского края, видовой состав носителей и переносчиков. Установлена возможность бактерионосительства при туляремии у высокочувствительных лабораторных и диких грызунов, разработаны научно-методические подходы к изучению латентной инфекции у животных с разной чувствительностью к возбудителю.

Первые достоверные сведения о бруцеллезе в регионе Северного Кавказа получены экспедицией Всесоюзного института эпидемиологии и микробиологии под руководством П.Ф.Здродовского в 1933–1936 гг. В последующем проблемой бруцеллеза занимаются высококвалифицированные специалисты бруцеллезной лаборатории: А.М.Полякова, И.Ф.Таран, Г.И.Лямкин, Н.И.Тихенко, Р.Е.Цыганкова, Л.В.Ляпустина и др. Изучение эпидемических вспышек бруцеллеза на территории Кавказа и Закавказья позволило разработать и внедрить научно-обоснованную систему мероприятий по борьбе с этой инфекцией, провести эпидемиологическое районирование территории субъектов Юга России. Был изучен природный очаг бруцеллеза в северных предгорьях Кавказа с новыми, неизвестными ранее носителями (мышевидные грызуны) и возбудителем (*Brucella suis*, 5 биовар), результатом чего явилось внесение дополнений в таксономию рода бруцелл. Получены новые данные о бактериофагии, бактериоциногении, L-трансформации, метаболизме и антигенной структуре бруцелл.

В 1967 г. была создана лаборатория сибирской язвы, первая в противочумной системе. За прошедшие 45 лет проделана огромная работа: разработаны и внедрены в практику медико-биологические препараты для лабораторной диагностики этой инфекции, индикации и идентификации возбудителя, предложены в качестве резервных два вакцинных штамма (228/8 и СТИ-ПР); внедрены методы молекулярного типирования возбудителя, которые впервые в Российской Федерации применены при эпидемиологическом мониторинге; исследовано 1302 штамма сибиреязвенного микроба; на основе использования ГИС-технологий создано 10 справочных атласов-кадастров неблагополучных по сибирской язве пунктов.

В институте начиная с 2000 г. проводятся научные исследования по выявлению вируса ККГЛ, изучению механизмов эпидемического и эпизоотического процессов, профилактике инфекции. Разработаны рекомендации по энтомологическому обследованию и

проведению акарицидных обработок пастбищ в природном очаге ККГЛ. Продемонстрирована высокая диагностическая ценность выявления РНК вируса ККГЛ с использованием тест-системы «АмплиСенс-ККГЛ».

Производственная деятельность института складывается из двух направлений – это производство вакцины чумной живой, разработка и производство диагностических препаратов. Отдел по выпуску чумной вакцины ЕВ организован в 1958 г. под руководством В.И. Кузнецовой. Большая группа ученых-энтузиастов, врачей, биологов, инженеров посвятила свою жизнь разработке и совершенствованию технологии производства живой чумной вакцины – А.И.Тинкер, Д.А.Будыка, И.В.Печникова, А.Д.Некрасов, Г.Н.Верховцева, Э.А.Чернова, Т.Н.Фунтикова, М.Н.Гончарова, В.Ф.Иванова, Е.Л.Ракитина и многие другие.

В 1987 г. создана научно-производственная лаборатория препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций (руководитель – И.С.Тюменцева). Организовано производство 10 наименований МИБП (диагностикумы эритроцитарные, тест-системы диагностические иммуноферментные, иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие). Многолетние научные исследования, выполняемые совместно с профессором В.И.Ефременко, завершились разработкой биотехнологии производства диагностических препаратов нового поколения – магнитоуправляемых аффинных сорбентов.

Уже через год после образования института был организован отдел подготовки специалистов по особо опасным инфекциям. В настоящее время профессиональная переподготовка, повышение квалификации, последипломная подготовка специалистов высшего и среднего звена с медицинским и биологическим образованием осуществляется по 12 программам. В подготовку кадров большой вклад внесли: Е.Ф.Оганян, Н.И.Макаров, И.И.Черченко, Л.А.Пшеничная, С.В.Никульшин, С.М.Кальной, Г.П.Абгарян, Т.Г.Онацкая, Н.М.Швецова, В.И.Ефременко, Л.В.Ляпустина и др.

С 2008 г. на базе института функционируют Референс-центры по мониторингу за возбудителями бруцеллеза, Крымской геморрагической лихорадки, сибирской язвы, центр индикации и диагностики опасных инфекционных болезней Роспотребнадзора для субъектов Южного федерального округа, региональный центр по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней I–II групп патогенности. На базе института с 2011 г. функционирует совет по защите докторских и кандидатских диссертаций Д 208.109.01.

С целью оперативного реагирования на санитарно-эпидемиологические последствия чрезвычайных ситуаций различного происхождения в 1963 г. на базе института созданы специализированные противэпидемические бригады. За время своего существования СПЭБ института неоднократно принимали участие в ликвидации последствий ЧС природного и

антропогенного характеров: землетрясение в Армении (1988–1989 гг.), эпидемии холеры в 70-х годах прошлого столетия, в 1994 г. (Дагестан), боевые действия в Чеченской Республике (1995, 1999–2000 гг.), в Республике Южная Осетия (2008 г.) и др.

В результате проведенной в 2007–2010 гг. модернизации СПЭБ оснащены мобильными лабораториями на базе автошасси, современным высокотехнологичным оборудованием. Возможности современной СПЭБ института по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия были реализованы в зоне грузино-югоосетинского вооруженного конфликта в августе 2008 г. Это был первый опыт деятельности СПЭБ на территории другого государства.

Существенный личный вклад в становление и развитие института внесли его руководители: заслуженный врач Каракалпакской АССР и РСФСР В.Н.Тер-Вартанов (1952–1963 гг.), профессор В.Г.Пилипенко (1963–1979 гг.), профессор Ю.Г.Сучков (1979–1982 гг.), профессор, заслуженный деятель науки РФ И.Ф.Таран (1983–1988 гг.), профессор, заслуженный деятель науки РФ В.И.Ефременко (1989–2007 гг.), профессор, лауреат Государственной премии РФ А.Н.Куличенко (с 2007 г. по настоящее время). Кадровый потенциал института в настоящее время составляют 350 сотрудников, в их числе 56 кандидатов

и 23 доктора наук, из которых 10 имеют ученое звание профессора, 2 – почетное звание «Заслуженный деятель науки Российской Федерации», 1 – лауреат Государственной премии РФ.

Если подвести итоги научно-практической, научно-производственной и образовательной деятельности института за 60 лет его существования, то получаются внушительные цифры: опубликовано 4576 печатных работ, издано 39 монографий, 68 сборников научных трудов и тезисов докладов научных конференций, защищено 39 докторских и 132 кандидатских диссертаций, получено 156 авторских свидетельств и патентов РФ на изобретения и полезные модели, утверждено 367 инструктивно-методических документов, составлено 7 компьютерных баз данных, 19 атласов и кадастров, подготовлено 33 аспиранта и 93 соискателя, обучено 8650 врачей, биологов и лаборантов, разработаны вакцина чумная живая и 33 диагностических препарата.

60 лет на страже эпидемиологического благополучия на Кавказе – таков исторический вклад Ставропольского научно-исследовательского противочумного института в развитие эпидемиологической науки и противоэпидемической практики в России.

А.Н.Куличенко, Г.И.Лямкин, Н.П.Буравцева

К 60-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ БАКЫТА БАХИЯУЛЫ АТШАБАРА

26 апреля 2012 г. исполнилось 60 лет со дня рождения Бакыта Бахияулы Атшабара, директора Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций им. М.Айкимбаева, доктора медицинских наук, известного ученого и специалиста в области особо опасных инфекционных болезней.

Б.Б.Атшабар – достойный представитель противочумной системы, всегда следующий ее лучшим традициям. Он прошел все этапы профессионального становления от врача Джангалинского противочумного отделения Уральской ПЧС до директора одного из ведущих противочумных учреждений Центрально-Азиатского региона. Он возглавил Казахский противочумный научно-исследовательский институт в трудное для Республики Казахстан время. Ему удалось сохранить и восстановить этот уникальный научный центр, единственное в стране учреждение, работающее с возбудителями инфекционных болезней I группы патогенности.

Научная эрудиция, целеустремленность и большая трудоспособность способствовали профессиональному росту Б.Б.Атшабара и принесли ему заслуженную известность и уважение медицинской и



научной общественности не только в Республике Казахстан, но и за рубежом. Он является экспертом Всемирной организации здравоохранения, президентом Ассоциации биологической безопасности Центральной Азии и Кавказа, членом-корреспондентом International Ecoenergy Academy.

Круг научных интересов Б.Б.Атшабара широк – это вопросы природной очаговости и эпизоотологии чумы, микробиологии и генетики *Y. pestis*, эпидемиологии и профилактики особо опасных зоонозных болезней.

Бакыт Бахияулы – прекрасный организатор, требователен к себе и подчиненным, пользуется заслуженным авторитетом у коллег и сотрудников КНЦКЗИ и противочумных станций. Вклад Б.Б.Атшабара в развитие медицинской науки и здравоохранения Республики Казахстан отмечен правительственными и ведомственными наградами.

Редколлегия и редакционный совет журнала «Проблемы особо опасных инфекций» желают Бакыту Бахияулы Атшабару новых успехов на благородном поприще борьбы с опасными инфекционными болезнями.

К 65-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ЗУРАБА ЛЕВАНОВИЧА ДЕВДАРИАНИ

16 апреля 2012 года исполнилось 65 лет заведующему лабораторией иммунодиагностики РосНИПЧИ «Микроб», доктору медицинских наук, профессору Зурабу Левановичу Девдариани.

Основным направлением научной деятельности З.Л.Девдариани является научно-технологическая разработка новых поли- и моноклональных иммуноглобулиновых тест-систем для индикации и идентификации возбудителей особо опасных инфекций; иммунохимическая и иммунобиологическая характеристика их диагностически значимых и протективных антигенов. В сферу его научных интересов входит изучение иммуно- и патогенеза чумы, структурной организации и функциональной активности антигенов патогенных микроорганизмов, а также клеточная иммунологическая инженерия, клиническая лабораторная иммунодиагностика инфекционных и соматических болезней, вакцинология.

З.Л.Девдариани является научным руководителем плановых НИР, НИОКР, проводимых в рамках федеральных целевых программ. Он – автор более 250 научных работ. Под его руководством выполнено 9 кандидатских и 1 докторская диссертации. Он является членом диссертационных советов Д208.078.01 при



РосНИПЧИ «Микроб» и Д208.094.02 при СГМУ. Читает лекции на курсах специализации и усовершенствования врачей и биологов по особо опасным инфекциям. З.Л.Девдариани ведет большую научно-общественную работу. Он – член научно-производственного Совета РосНИПЧИ «Микроб», председатель межведомственной проблемной комиссии 48.02 «Диагностика, профилактика и лечение особо опасных инфекционных болезней и член бюро КНС по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации.

Входит в состав редколлегии научно-практического журнала «Проблемы особо опасных инфекций».

За высокие показатели в научно-общественной и педагогической деятельности Девдариани З.Л. награжден ведомственным знаком «Отличник госсанэпидслужбы».

З.Л.Девдариани является высококвалифицированным специалистом, пользуется заслуженным авторитетом у сотрудников института «Микроб», научных организаций и противочумных учреждений.

Редколлегия журнала «Проблемы особо опасных инфекций» желает Зурабу Левановичу Девдариани успехов, здоровья и долгих лет плодотворной научной деятельности.

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://microbe.rospotrebnadzor.ru>).

2. Размер статей (включая таблицы, рисунки, резюме и список литературы) не должен превышать у оригинальных – 8 стр. (шрифт Times New Roman, размер шрифта 12, межстрочный интервал 1,5, поля 2 см), обзоров – 12–14 стр., кратких сообщений – 4 стр. Краткие сообщения представляются без таблиц и рисунков.

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 с указанием фамилии, имени и отчества (полностью).

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 подписочной 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 микроорганизма 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 обзоров – не более 50, кратких сообщениях – не более 5–8) приводятся работы отечественных и зарубежных авторов за последние 10 лет 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.

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.*)»

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. Фамилии иностранных авторов при упоминании в тексте статьи даются в иностранной транскрипции.

14. **Требования к электронным вариантам статей**: файлы с текстом и подписочными 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.

15. При невыполнении настоящих правил статьи не принимаются и отсылаются авторам на дооформление.

16. Редакция оставляет за собой право редактировать статьи, сокращать или исправлять. Вся работа проводится по авторскому оригиналу.

17. Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование.

18. В случае отклонения статьи по рецензии редакция направляет автору мотивированный отказ.

19. **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: rusrapi@microbe.ru