

# 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 3(113)**

**сентябрь · 2012**

**САРАТОВ**

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

З.Л.Девдариани, докт. мед. наук, профессор  
Г.А.Ерошенко, докт. биол. наук  
Т.Б.Караваева (отв. секретарь), канд. мед. наук  
Е.В.Куклев, докт. мед. наук, профессор  
М.Н.Ляпин, канд. мед. наук  
Н.В.Попов, докт. биол. наук, профессор  
Ю.А.Попов, докт. биол. наук, профессор  
Л.В.Самойлова, докт. мед. наук, профессор  
Л.В.Саяпина, докт. мед. наук  
Н.И.Смирнова, докт. биол. наук, профессор  
Т.М.Тараненко, докт. биол. наук, профессор  
В.П.Топорков, докт. мед. наук, 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](http://www.e-library.ru))*

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

September 2012, Issue 113

## 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: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru)  
<http://microbe.rospotrebnadzor.ru>

## Подписной индекс в каталоге «Почта России» – 24687

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

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

Пробл. особо опасных инф. Сентябрь 2012. Вып. 113. 1–104  
Технический редактор Т.К.Меркулова. Перевод на английский Т.Б.Караваевой, А.П.Рыжовой, А.Ю.Мощиной

Подписано в печать 19.07.12. Формат 60×88 1/8. Бумага мелованная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 12,8. Гарнитура Таймс. Заказ 879  
Журнал отпечатан в ООО «ИППОЛит-XXI век». 410012, Саратов, Б. Казачья, 79/85

Смоленский В.Ю., Топорков В.П., Карнауков И.Г., Топорков А.В., Кутырев В.В. Организационные и методические аспекты международного сотрудничества при обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения ..... 5

### Эпидемиология

Кузнецов А.А., Поршаков А.М., Матросов А.Н., Синцов В.К., [Осипов В.П.] Санджиев В.Б.-Х., Слудский А.А. Дифференциация Прикаспийского песчаного очага чумы по кратности эпизоотических проявлений ..... 15

Логачев А.И., Корзун В.М., Михайлов Е.П., Рожественский Е.Н., Балахонов С.В. Распространенность триптофанзависимых вариантов *Yersinia pestis* на территории Алтайского горного природного очага чумы ..... 20

Лопатин А.А., Куклев Е.В., Сафронов В.А., Раздорский А.С., Самойлова Л.В., Топорков В.П. Верификация математических моделей при чуме ..... 26

Низоленко Л.Ф., Бачинский А.Г. Определение влияния фактора изоляции при моделировании развития эпидемии натуральной оспы в мегаполисе ..... 29

Рыжков Ю.В., Соловьев М.Ю. Управление рисками в санитарно-карантинном контроле ..... 33

Титенко А.М., Андаев Е.И. Научно-методологический подход к эпидемиологическому анализу и лабораторной диагностике болезней, вызванных вирусами Марбург и Эбола .. 38

### Микробиология

Ерошенко Г.А., Видяева Н.А., Куклева Л.М., Кошель Е.И., Одинокоев Г.Н., Шавина Н.Ю., Князева Т.В., Мокроусова Т.В., Краснов Я.М., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Ерохин П.С., Бойко А.В., Кутырев В.В. Изучение образования биопленки у беспигментных и бесплазмидных мутантов штамма *Yersinia pestis* на биотических поверхностях в условиях *in vitro* и *in vivo* ..... 45

Полунина Т.А., Гусева Н.П., Киреев М.Н., Тараненко Т.М., Девдариани З.Л., Заднова С.П., Кузнецова Е.М., Степанов А.В., Ключева С.Н., Захарова Т.Л. Сравнительное изучение некоторых физико-химических и иммунохимических свойств препаратов липополисахарида чумного микроба, выделенных разными методами ..... 50

Сизова Ю.В., Черепяхина И.Я., Балахнова В.В., Бурлакова О.С., Сизова Е.В., Помухина О.И., Фецайлова О.П. Вариабельность свойств, характеризующих способность к выживанию холерных вибрионов, в биопленочных сообществах ..... 54

### Иммунология, патогенез, иммунопрофилактика

Громова О.В., Кузьмиченко И.А., Киреев М.Н., Клокова О.Д., Бронникова В.С. Фосфатазная активность в холерной химической вакцине и ее компонентах ..... 58

Демидова Г.В., Зюзина В.П., Соколова Е.П., Пасюкова Н.И., Беспалова И.А., Бородин Т.Н., Тынянова В.И. Толерантность к липополисахаридам вакцинного и вирулентного штаммов *Yersinia pestis* в условиях *in vivo* ..... 61

Киршева Н.А., Ганина Е.А., Комбарова Т.И., Шайхутдинова Р.З., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Инфекционная чувствительность мышей линии Balb/c к заражению *Photobacterium alymbyticum* и *Photobacterium temperata* ..... 64

Ключева С.Н., Щуковская Т.Н., Шмелькова Т.П., Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Смирнова Н.И., Волох О.А., Захаров Т.Л., Белякова Н.И., Еремин С.А., Никифоров А.К. Иммунобиологическая характеристика В-субъединицы холерного токсина ..... 67

Smolensky V.Yu., Toporkov V.P., Karnaukhov I.G., Toporkov A.V., Kutyrev V.V. Organizational and Methodological Aspects of International Cooperation for the Provision of Sanitary and-Epidemiological Welfare of the Population

### Epidemiology

Kuznetsov A.A., Porshakov A.M., Matrosov A.N., Sintsov V.K., [Osipov V.P.] Sandzhiev V.B-Kh., Sludsky A.A. Differentiation of the Pre-Caspian Sandy Plague Foci on the Basis of the Frequency of Epizootic Manifestations

Logachev A.I., Korzun V.M., Mikhailov E.P., Rozhdestvensky E.N., Balakhonov S.V. Distribution of Tryptophan-Dependent *Yersinia pestis* Variants in the Altai Mountain Natural Plague Focus

Lopatin A.A., Kuklev E.V., Safronov V.A., Razdorsky A.S., Samoiloa L.V., Toporkov V.P. Verification of Mathematical Models of Plague

Nizolenko L.F., Bachinsky A.G. Evaluation of the Effect of Isolation in the Modeling of Smallpox Epidemic Development in Megacity

Ryzhkov Yu.V., Solov'ev M.Yu. Framework of the Risk Management System in the Sphere of Sanitary-Quarantine Control

Titenko A.M., Andaev E.I. Scientific-Methodological Approach to the Epidemiological Analysis and Laboratory Diagnostics of the Diseases Caused by Marburg and Ebola Viruses

### Microbiology

Eroshenko G.A., Vidyayeva N.A., Kukleva L.M., Koshel' E.I., Odinokov G.N., Shavina N.Yu., Knyazeva T.V., Mokrousova T.V., Krasnov Ya.M., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Erokhin P.S., Boiko A.V., Kutyrev V.V. Studies of Biofilm Formation in Non-Pigmented and Plasmid-Deprived Mutants of *Yersinia pestis* on Biotic Surfaces, *in vivo* and *in vitro* Conditions

Polunina T.A., Guseva N.P., Kireev M.N., Taranenko T.M., Devdariani Z.L., Zadnova S.P., Kuznetsova E.M., Stepanov A.V., Klyueva S.N., Zakharova T.L. Comparative Study of Some Physical-Chemical and Immunochemical Properties of Plague Microbe Lipopolysaccharide Preparations Obtained with the Help of Different Techniques

Sizova Yu.V., Cherepakhina I.Ya., Balakhnova V.V., Burlakova O.S., Sizova E.V., Pomukhina O.I., Fetsaylova O.P. Variability of Properties Characterizing Persistent Potential of Cholera Vibrio in Biofilm Communities

### Immunology, Pathogenesis, Immunoprophylaxis

Gromova O.V., Kuz'michenko I.A., Kireev M.N., Klokova O.D., Bronnikova V.S. Phosphatase Activity in Chemical Cholera Vaccine and its Components

Demidova G.V., Zyuzina V.P., Sokolova E.P., Pasyukova N.I., Bepalova I.A., Borodina T.N., Tynyanova V.I. *In vivo* Tolerance to Lipopolysaccharides of Vaccine and Virulent *Yersinia pestis* Strains

Kirsheva N.A., Ganina E.A., Kombarova T.I., Shaikhutdinova R.Z., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. Infectious Sensitivity of BALB/c Mice to Infestation with *Photobacterium alymbyticum* and *Photobacterium temperata*

Klyueva S.N., Shchukovskaya T.N., Shmel'kova T.P., Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Smirnova N.I., Volokh O.A., Zakharova T.L., Belyakova N.I., Eremin S.A., Nikiforov A.K. Immunobiological Characteristics of Cholera Toxin B-Subunit

Сергеев А.А., Пьянков О.В., Демина О.К., Шиков А.Н., Сергеев А.А., Шишкина Л.Н., Сафатов А.С., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Изучение чувствительности кур к вирусу гриппа птиц А/Н5N1 .....

71

### Диагностика, биотехнология

Аленкина Т.В., Бочкарева Г.В., Саяпина Л.В., Касина И.В., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Абрамова Е.Г., Громова О.В., Никифоров А.К. Разработка и основные этапы внедрения препарата «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие холерные O139» .....

74

Зайцев А.А., Гнусарева О.А., Солодовников Б.В., Царева Н.С., Остапович В.В., Куличенко А.Н. Алгоритм лабораторной диагностики при исследовании иксодовых клещей на туляремию .....

79

Корсакова И.И., Храпова Н.П., Напалкова Г.М., Ломова Л.В., Дрефс Н.М., Голосеев Ю.А., Булатова Т.В. Сравнительный анализ иммунохимических методов исследования антигенов патогенных буркхолдерий .....

82

Куличенко А.Н., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Логвиненко О.В., Рязанова А.Г. Использование теста активации базофилов с антраксином для лабораторной (*in vitro*) диагностики сибирской язвы .....

86

Михайлов Л.М., Калиновский А.И., Баранникова Н.Л., Кузнецов В.И., Атлас А.Г., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Татарникова О.Г., Гордиенко Л.Н., Куликова Е.В., Балахонов С.В. Конструирование питательных сред для бруцелл в L-форме .....

89

Шарова И.Н., Казакова Е.С., Карнаухов И.Г., Щербakov Д.А., Щербакoва С.А., Самойлова Л.В., Топорков А.В., Кутырев В.В. Принципы организации и проведения лабораторной диагностики в мобильной лаборатории индикации для осуществления эпизоотологического мониторинга особо опасных и других природно-очаговых инфекций .....

94

### Краткие сообщения

Коготкова О.И., Зуенко А.А., Жарникова И.В., Гридина Т.М., Новаков П.Б., Ляпустина Л.В., Лямкин Г.И., Вилинская С.В., Куличенко А.Н. Валидация технологического процесса производства диагностикума бруцеллезного жидкого для реакции агглютинации, суспензии для диагностических целей .....

97

Теплякова Т.В., Булычев Л.Е., Косогова Т.А., Ибрагимова Ж.Б., Юрганова И.А., Кабанов А.С., Пучкова Л.И., Бормотов Н.И., Бардашева А.В. Противовирусная активность экстрактов из базидиальных грибов в отношении ортопоксвирусов .....

99

Фадеева А.В., Ерошенко Г.А., Шавина Н.Ю., Кутырев В.В. Анализ SXT констина антибиотикочувствительного штамма *Vibrio cholerae* неO1/неO139 серогруппы .....

102

### Юбилей

К 60-летию со дня рождения Виталия Васильевича Зверева .....

104

Sergeev A.A., P'yankov O.V., Demina O.K., Shikov A.N., Sergeev A.A., Shishkina L.N., Safatov A.S., Agafonov A.P., Sergeev A.N. Studies of Sensitivity to Avian Flu Virus A/H5N1 in Chickens

### Diagnostics, Biotechnology

Alenkina T.V., Bochkareva G.V., Sayapina L.V., Kasina I.V., Shul'gina I.V., Lobovikova O.A., Abramova E.G., Gromova O.V., Nikiforov A.K. Development and Main Stages of Introduction of the Preparation "Cholera O139 Diagnostic Fluorescent Immunoglobulins"

Zaitsev A.A., Gnusareva O.A., Solodovnikov B.V., Tsareva N.S., Ostapovich V.V., Kulichenko A.N. Algorithm of Laboratory Diagnostics Applied for Examination of Ixodic Ticks for Tularemia

Korsakova I.I., Khrapova N.P., Napalkova G.M., Lomova L.V., Drefs N.M., Goloseev Yu.A., Bulatova T.V. Comparative Analysis of Immunochemical Methods Applied for Studies of Pathogenic Burkholderia Antigens

Kulichenko A.N., Rakitina E.L., Ponomarenko D.G., Logvinenko O.V., Ryzanova A.G. Application of Basophil Activation Test with Anthraxin for Laboratory (*in vitro*) Diagnostics of Anthrax

Mikhailov L.M., Kalinovsky A.I., Barannikova N.L., Kuznetsov V.I., Atlas A.G., Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Tatarnikova O.G., Gordienko L.N., Kulikova E.V., Balakhonov S.V. Construction of nutrient media for L-form brucella

Sharova I.N., Kazakova E.S., Karnaukhov I.G., Shcherbakov D.A., Shcherbakova S.A., Samoylova L.V., Toporkov A.V., Kutyrev V.V. Principles of Organization and Carrying out of Laboratory Diagnostics in the Mobile Indication Laboratory Used for Epizootiological Surveillance over Particularly Dangerous and Other Natural Foci Infections

### Brief Communications

Kogotkova O.I., Zuenko A.A., Zharnikova I.V., Gridina T.M., Novakov P.B., Lyapustina L.V., Lyamkin G.I., Vilinskaya S.V., Kulichenko A.N. Validation of Technological Process of Production of Liquid Brucellosis Diagnosticum for Agglutination Reaction, Suspension for Diagnostic Purposes

Teplyakova T.V., Bulychev L.E., Kosogova T.A., Ibragimova Zh.B., Yurganova I.A., Kabanov A.S., Puchkova L.I., Bormotov N.I., Bardasheva A.V. Antiviral Activity of Extracts from Basidiomycetes for Orthopoxviruses

Fadeeva A.V., Eroshenko G.A., Shavina N.Yu., Kutyrev V.V. Analysis of the SXT Constin of Antibiotic-Sensitive *Vibrio cholerae* Strain of Non-O1/ Non-O139 Serogroup

### Anniversaries

To the 60-th Anniversary of Vitaly V. Zverev

В.Ю.Смоленский<sup>1</sup>, В.П.Топорков<sup>2</sup>, И.Г.Карнаухов<sup>2</sup>, А.В.Топорков<sup>2</sup>, В.В.Кутырев<sup>2</sup>

## ОРГАНИЗАЦИОННЫЕ И МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МЕЖДУНАРОДНОГО СОТРУДНИЧЕСТВА ПРИ ОБЕСПЕЧЕНИИ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО БЛАГОПОЛУЧИЯ НАСЕЛЕНИЯ

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

<sup>2</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Проведенное исследование структуры и содержания международного сотрудничества в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения в различных его форматах – на уровне ООН, ВОЗ, «Группы восьми», СНГ, ЕврАзЭС, ШОС, БРИКС, двухсторонних отношений Российской Федерации и Республики Казахстан позволило разработать модель формирования и развития сотрудничества, которую характеризуют такие функциональные признаки, как оценка особенностей эпидемиологической обстановки, реализация глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями, состояние внедрения ММСП (2005 г.), модернизация на системной основе методологии, технологии, материально-технических и кадровых ресурсов, производства медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП), стационарной сети и мобильных формирований для приведения межгосударственного потенциала к уровню, позволяющему эффективно предупреждать, выявлять и контролировать чрезвычайные ситуации санитарно-эпидемиологического характера (ЧС). Приоритетную значимость в списке ЧС имеют актуальные новые инфекционные болезни, в первую очередь требующие совершенствования информационно-аналитического и прогнозно-моделирующего обеспечения в системе эпидемиологического надзора и санитарной охраны территорий. Востребованность таких исследований реализована на примерах Крымской геморрагической лихорадки и лихорадки Западного Нила. Для реализации модели организационно необходим координирующий функциональный орган.

*Ключевые слова:* модель формирования международного сотрудничества в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения, чрезвычайные ситуации санитарно-эпидемиологического характера, новые инфекционные болезни, совершенствование информационно-аналитического, прогнозно-моделирующего функциональных направлений эпидемиологического надзора, санитарной охраны территорий.

V.Yu.Smolensky<sup>1</sup>, V.P.Toporkov<sup>2</sup>, I.G.Karnaukhov<sup>2</sup>, A.V.Toporkov<sup>2</sup>, V.V.Kutyrev<sup>2</sup>

## Organizational and Methodological Aspects of International Cooperation for the Provision of Sanitary-and-Epidemiological Welfare of the Population

<sup>1</sup>Federal Service for Consumer Rights Protection and Human Welfare, Moscow;

<sup>2</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

The study in question of the structure and content of international cooperation in the sphere of sanitary-and-epidemiological welfare of the population in its various formats – on the UN, WHO, "G-8", CIS, EurAsEC, SCO, and BRICS levels, as well as within the frames of bilateral relations between the Russian Federation and Republic of Kazakhstan – has made it possible to develop a model of international intercourse organization characterized by such functional features as assessment of the epidemiological situation peculiarities and IHR implementation status, realization of global strategy for infectious diseases control, systemic modernization of methodology, technologies, materials-and-equipment resources as well as human assets and production of medical immune-biological preparations (MIBP), stationary network and mobile complexes for emergency response in order to level the interstate potentials for the provision of effective prevention, detection and monitoring over emergency situations in the sphere of sanitary-and-epidemiological welfare of the population (ES). Top-priority in the list of the ESs is given to novel emerging infectious diseases control as it primarily demands improvement of the informational-and-analytical prognosis-modeling base within the frames of epidemiological surveillance system and sanitary protection of the state territories. Great need in such type of projects is substantiated based on the examples of Crimean-Congo hemorrhagic and West-Nile fevers control. Nevertheless, for the realization of the model, coordinating functional authority/agency is required.

*Key words:* model of international intercourse organization in the sphere of sanitary-and-epidemiological welfare of the population, emergency situations of sanitary-and-epidemiological type, novel emerging infectious diseases, improvement of informational-and-analytical prognosis-modeling functional trends of epidemiological surveillance and sanitary protection of the territories.

При осуществлении международного сотрудничества в рамках укрепления санитарно-эпидемиологического благополучия населения в любом формате международного партнерства стран создается спектр организационных и методических аспектов сотрудничества, которые требуют инвентаризации, вычленения наиболее значимых, повторяющихся и в тоже время учитывающих региональные особенности, а в итоге – унификации и оптимизации систем-

ных основ сотрудничества в указанной сфере деятельности. Другими словами, требуется разработка модели формирования международного сотрудничества в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

Эта модель, естественно, должна учитывать совокупный опыт международного сотрудничества в реализации приоритетных направлений совершенствования эпидемиологического надзора и санитар-

ной охраны территории перед лицом современных угроз и вызовов, потенциально опасных в отношении возникновения «острых» кризисных ситуаций в области общественного здравоохранения с глобальной социально-экономической значимостью. В настоящее время на уровне ВОЗ в качестве такой модели рассматривается пандемия гриппа нового подтипа [2].

В разработке модели должен быть учтен сложившийся пул болезней, уже имеющих глобальную социально-экономическую значимость. К ним относятся ВИЧ/СПИД, туберкулез, малярия, вероятно, вирусный гепатит.

Необходимо также учитывать и взрывные вспышки инфекционных болезней, управляемых средствами специфической иммунопрофилактики, создающие чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения (санитарно-эпидемиологического благополучия населения или санитарно-эпидемиологического характера) международного значения (далее ЧС). К ним относятся полиомиелит, корь, краснуха и, возможно, другие.

Модель формирования и развития партнерских отношений стран должна учитывать и массовые неинфекционные заболевания, обусловленные токсичными поражениями трансграничного происхождения. Все это аспекты совершенствования эпидемиологического надзора и санитарной охраны территорий.

Целью данного исследования является разработка модели формирования и развития международного сотрудничества в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения на основе совершенствования эпидемиологического надзора и санитарной охраны территорий.

Для ее реализации проанализированы материалы международного сотрудничества в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения, осуществляемого на уровне ООН, ВОЗ, «Группы восьми», СНГ, ЕврАзЭС, ШОС, БРИКС, Российской Федерации и Республики Казахстан. В организационно-методическом и научном обеспечении международного сотрудничества в указанной области принимали участие авторы данной работы.

При анализе материалов, прежде всего, очевидным становится то, что в наибольшей степени формирование международного сотрудничества в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения (общественного здравоохранения) определяется современными эпидемиологическими, социально-экономическими и геополитическими реалиями. Складывающиеся преимущественно на экономической и политической основе форматы международных объединений используют указанную область деятельности для укрепления и обеспечения стабильности функционирования этих основ в глобальном, региональном и национальном масштабе.

При развитии современных кризисных явлений в экономической сфере все попытки выстроить оптимальную модель международного сотрудничества в области санитарно-эпидемиологического благопо-

лучия населения, с учетом современной стратегии предупреждения реализации современных угроз и вызовов, борьбы с инфекционными болезнями, направленных на минимизацию вероятных крупных социально-экономических потрясений в будущем и их контроль, несомненно имеют важное научное и практическое значение.

### **Организация Объединенных Наций (ООН)**

Проведенный анализ показывает, что непосредственно на уровне ООН формируются и развиваются международные отношения в области контроля прежде всего тех инфекционных (паразитарных) болезней, социально-экономический вес которых уже приобрел глобальную значимость. Вместе с тем, требуются определенные меры, позволяющие оптимизировать доступность медицинской помощи населению, а следовательно, повысить эффективность контроля. Для осуществления этих мер необходимы политическая воля и крупные финансовые ресурсы.

В связи с этим в рамках ООН создана, например, Объединенная программа по борьбе с ВИЧ/СПИД (ЮНЭЙДС), а также утверждены Цели развития тысячелетия (ЦРТ), в том числе, касающиеся вопросов борьбы с инфекционными болезнями.

На первом Международном Форуме, посвященном достижению 6-й Цели развития тысячелетия (ЦРТ-6) в Восточной Европе и Центральной Азии (10–12 октября 2011 г., Москва), созванном в соответствии с итоговым документом саммита тысячелетия ООН (2001 г.), было констатировано получение ряда положительных результатов. Так, только в 2009 г. за счет вклада России в Глобальный фонд по борьбе со СПИДом, туберкулезом и малярией 114 тыс. чел. получили антиретровирусное лечение, 7000 новорожденных были спасены от заражения ВИЧ, снизилась заболеваемость туберкулезом, 60 % пациентов с сочетанной инфекцией ВИЧ/туберкулез получили необходимое лечение. Все эти мероприятия на уровне ООН, естественно, с поддержкой на уровне «Группы восьми», ШОС и других международных форматов направлены на повышение доступности медицинской помощи для населения по указанной, практически хронической, пандемической проблематике. В плане по достижению ЦРТ к 2015 г. предусмотрено: снизить на 50 % возникновение новых случаев ВИЧ-инфекции, увеличить до 80 % от общего числа нуждающихся количество пациентов, получающих антиретровирусную терапию, снизить на 50 % распространенность туберкулеза и смертность от туберкулеза при ВИЧ-инфекции, на 50 % снизить уровень заболеваемости и смертности от туберкулеза.

### **Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ)**

На уровне ВОЗ определяется общий спектр угроз для всех 194 стран-членов этой организации с высокой реальной и потенциальной социально-экономической значимостью. Сформированы организационные, методические подходы и создан современный нормативно-правовой инструмент при

осуществлении глобального и национального эпидемиологического надзора за острыми ситуациями с потенциалом глобальной социально-экономической значимости – Международные медико-санитарные правила (2005 г.), далее ММСП (2005 г.).

Главная задача международного сотрудничества на уровне ВОЗ – следование разработанной ВОЗ стратегии по реализации Международных медико-санитарных правил (2005 г.) на национальном уровне до 2016 г. [8]. Эта стратегия в своем существе предусматривает скоординированное методологическое, технологическое, материально-техническое, нормативно-правовое, кадровое перевооружение национальных возможностей на системной основе в расчете, прежде всего, на острые ЧС. Списки инфекционных болезней, требующих надзора и контроля на уровне ВОЗ, а также – СНГ, Таможенного союза (ЕврАзЭС), Российской Федерации, в соответствии с действующей нормативно-правовой базой опубликованы Г.Г.Онищенко и соавт. [13].

Приведенные в списках нозологические формы являются наиболее вероятными угрозами, при реализации которых возникают ЧС санитарно-эпидемиологического характера. На эти списки ориентируются при создании и совершенствовании сетевых структур, осуществляющих мониторинг возбудителей инфекционных (паразитарных) болезней I–IV групп патогенности, при разработке, создании, сертификации медицинских иммунобиологических препаратов для диагностики и профилактики инфекционных болезней, при подготовке кадров, производстве МИБП, формировании международной настороженности и противоэпидемической готовности. Вместе с тем, все приведенные списки болезней заканчиваются рубрикой «и другие», что означает способность других инфекционных болезней вызывать ЧС санитарно-эпидемиологического характера. Наряду с этим, в интегральное понятие ЧС санитарно-эпидемиологического характера вкладываются и массовые неинфекционные заболевания (отравления).

С учетом современного уровня развития высокоскоростных транспортных средств, глобализации торговли, миграционной активности населения весь мир, с точки зрения наличия и реализации угроз возникновения болезней, является единым эпидемиологическим пространством.

В целом, внешний фон угроз для всех стран, по данным ВОЗ [4], определяют: болезни, способные вызывать эпидемии; болезни пищевого происхождения (массовые неинфекционные заболевания + Губчатая энцефалопатия человека, вирус Нипах); случайные эпидемические вспышки из-за нарушений в биобезопасности; преднамеренно вызванные вспышки (акты биотерроризма).

Что касается региональной инфекционной патологии, из которой, кстати, формируются и внешние угрозы, то каждая из стран или их группы с общими границами, сходными социально-экономическими отношениями, природно-климатическими

и ландшафтно-экологическими условиями, связанными трассами перелетных птиц, осуществляющих трансграничные заносы инфекционных болезней, общих для человека и животных, крупными торговыми путями и транспортными коридорами, характеризуются своими условиями реализации заносов и региональными эпидемиологическими особенностями, в том числе эндемичностью (энзоотичностью) по определенным нозологиям, способным:

- вызывать «острые» эпидемии (чума, холера, контагиозные вирусные лихорадки, лихорадка Денге и др.);

- обуславливать длительные, трудно поддающиеся контролю эпидемии, характеризующиеся устойчиво высокой социально-экономической значимостью (ВИЧ/СПИД, туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью, малярия – тропическая форма, эндемичная в странах Африки и Азии);

- обуславливать эпидемические вспышки инфекционных болезней, управляемых средствами специфической иммунопрофилактики, но активизирующихся из-за недостаточных ее объемов (полиомиелит, корь, краснуха и другие инфекции).

Характеризуя региональные особенности, необходимо напомнить, что эндемичными (энзоотичными) по чуме являются более 50 стран мира. В Индии в конце XIX – первой половине XX века отмечено 13 млн случаев чумы из 14 млн, зарегистрированных в мире в тот же период [3]. К числу региональных особенностей относительно чумы можно отнести и то, что в сурочьих очагах чумы Китая и Монголии существует один из самых высоких в мире показателей осложнения бубонной чумы легочной (и септической) формой заболевания (около 50 %), способной к широкому антропонозному распространению [6, 7].

Что касается холеры, то хорошо известно, что Индия является исходным пунктом распространения 6 из 7 ее пандемий. В основном из Индии и Пакистана осуществлялись заносы оспы в страны Европы в 1958–1973 гг. до ее ликвидации.

Азиатский регион, и главным образом Юго-Восточная Азия, является «родиной» целого ряда эпидемических болезней: всех 7 пандемий холеры, 2-й и 3-й пандемий чумы, ряда новых инфекционных болезней, таких как ТОРС, грипп птиц А/Н5N1/(Гонконг), Вирус Нипах (Малайзия). Китай является исходным пунктом пандемий гриппа, передающегося воздушно-капельным путем (1957 г. – «азиатский», 1968 г. – «гонконгский» грипп, 1977 г. эпидемия, вызванная вирусом СССР/1977, занесенного из Китая в СССР). Азия является эндемичной по тропической малярии.

В настоящее время феномен эндемии холеры, имеющий место на Азиатском и Африканском континентах, в большей степени выражен на Африканском [9]. Африка эндемична также по контагиозным вирусным лихорадкам Эбола, Ласса, Марбург, тропической малярии. В Анголе наиболее интенсивные эпидемические проявления геморрагической лихорадки Марбург возникли на фоне гражданской войны в

1975–2002 гг. Кения – эндемична по лихорадке Рифт-Валли. В 1998 г. лихорадка Денге, активизировавшаяся в Африке к югу от Сахары, вызвала пандемию, в ходе которой 56 стран проинформировали ВОЗ о 1,2 млн случаев заболеваний. С тех пор эпидемии лихорадки Денге продолжают, поражая миллионы людей от Латинской Америки до Юго-Восточной Азии. Африка (Мали, Судан, Сенегал, Гвинея, Кот д'Ивуар, Демократическая Республика Конго) и Южная Америка (Колумбия, Перу, Венесуэлла, Бразилия, Боливия, Того) являются эндемичными (энзоотичными) по желтой лихорадке.

Из Нигерии в 2003–2005 гг., по данным ВОЗ [4], получил глобальное распространение полиовирус в результате обострения эпидемической обстановки из-за ранее приостановленной в 2 северных штатах оральной вакцинации против полиомиелита (необоснованные утверждения о стерилизации детей раннего возраста). Возникшая вспышка полиомиелита распространилась на 19 свободных от полиомиелита стран.

Африка является исходной территорией стремительного возникновения и распространения в 1970-е годы в глобальных масштабах СПИДа, впервые зарегистрированного в 1981 г. в США, как ВИЧ-инфекция – в 1983 г. во Франции.

Англия является, по данным ВОЗ [4], исходной территорией распространения варианта болезни Крейтцфельда-Якоба (вБКЯ), или губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота (ГЭКРС) у человека.

О территориальной приуроченности болезней можно судить по их названиям, таким как Аргентинская геморрагическая лихорадка, Боливийская геморрагическая лихорадка, Крымская геморрагическая лихорадка, лихорадка Западного Нила, Астраханская пятнистая лихорадка и целый ряд других. Из них Крымская геморрагическая лихорадка и лихорадка Западного Нила имеют отчетливую тенденцию расширения своего ареала.

Таким образом, региональные особенности инфекционной патологии и, прежде всего, определенная территориальная приуроченность возникновения новых инфекционных болезней с потенциалом глобального распространения, является принципиально важным звеном в деятельности ВОЗ. Это связано с тем, что совершенствование национального эпидемиологического надзора, служащего предметом деятельности региональных международных объединений, является составной частью совершенствования глобального эпидемиологического надзора. Именно координирование мероприятий по упреждающему управлению рисками возникновения и распространения ЧС «у источника», то есть на местном, промежуточном и национальном уровне, до выхода болезни на международную арену, является одним из принципиально важных элементов новизны ММСП (2005 г.) по сравнению с ММСП 1969 г. Координация этой деятельности на уровне ВОЗ представляет собой важную составную часть функционирования данной

международной организации, а характер эпидемиологической обстановки – важный учетный признак для модели формирования международных отношений в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

Итак, приоритеты ВОЗ в контроле инфекционных болезней: целевые инфекции и иммунизация (корь, краснуха, полиомиелит); туберкулез, ВИЧ/СПИД, малярия; ММСП; подготовка к пандемии гриппа, раннее оповещение и надзор за инфекционными болезнями.

#### «Группа восьми»

На уровне «Группы восьми», объединяющей ведущие индустриально развитые страны мира, решаются стратегические задачи, во многом благодаря инициативам Российской Федерации (на встречах глав государств: Россия, 2006, Германия, 2007; Япония, 2008 и др.), по целенаправленному вложению финансовых ресурсов в те сферы борьбы с инфекционными болезнями, в которых предполагается достичь наибольшего эффекта в их контроле со стороны мирового сообщества в отношении реальных и потенциальных эпидемий и пандемий.

Примером может служить Санкт-Петербургский саммит «восьмерки», состоявшийся 15–17 июля 2006 г., в числе приоритетных направлений которого, наряду с энергетической безопасностью, образованием, была борьба с инфекционными болезнями. В Санкт-Петербурге лидеры стран «Группы восьми» впервые приняли отдельное всеобъемлющее заявление по данному вопросу, которое определило основные компоненты глобальной и региональной (для стран Восточной Европы и Центральной Азии) стратегии противодействия эпидемиям, а именно:

- усиление финансирования борьбы с инфекционными болезнями;
- борьба с гриппом птиц и повышение международной готовности к пандемии гриппа; внедрение в практику в 2006 г. принятых Всемирной ассамблеей здравоохранения (WHA 58.3) в 2005 г., но не вступивших на то время в силу ММСП (2005 г.), в части, относящейся к информационному обеспечению проблемы противодействия гриппу птиц и угрозе пандемии гриппа; создание в России Сотрудничающего центра ВОЗ по гриппу для стран Восточной Европы и Центральной Азии;
- борьба с ВИЧ/СПИД, туберкулезом и малярией, повышение доступности для населения их профилактики и лечения; создание регионального координационного центра по разработке вакцины против ВИЧ-инфекции для стран Восточной Европы и Центральной Азии;
- содействие скорейшему искоренению полиомиелита;
- контроль кори и других болезней, управляемых средствами специфической иммунопрофилактики;
- противодействие «забытым» тропическим болезням;
- предотвращение и борьба с эпидемическими

последствиями стихийных бедствий и техногенных катастроф;

- укрепление Глобальной сети по оповещению и реагированию на вспышки инфекционных болезней (GOARN) за счет использования мобильных формирований и технических экспертов, созданных путем модернизации российских специализированных противозидемических бригад.

Из содержания указанных вопросов, впервые представленных в таком актуальном контексте по инициативе Российской Федерации, совершенно определенно выкристаллизовывается существо глобальной стратегии в области борьбы с инфекционными болезнями, а вернее стратегии целенаправленного вложения финансовых средств, что освещено в ряде работ [10, 11]. Моделью для приведения потенциала стран в соответствие с решениями саммита и требованиями ММСП (2005 г.) являются устойчивая тенденция появления новых, вновь возникающих инфекционных болезней и, в частности, угроза новой пандемии высокопатогенного гриппа. Ущерб от него уже в первый год, по данным М.Чен, приведенным на саммите «восьмерки» в Санкт-Петербурге (2006 г.), ожидается в объеме \$800 млрд дол. США. Параллельно с этим необходимо решение ряда значимых в социально-экономическом отношении глобальных медико-биологических проблем, и особенно, ассоциируемых с ВИЧ/СПИД, туберкулезом, малярией.

Важной инициативой указанного саммита было вложение средств в модернизацию российских СПЭБ, в результате чего были созданы системы современных мобильных противозидемических комплексов, предназначенные для оказания помощи территориально закрепленным структурам здравоохранения санитарно-эпидемиологического и лечебно-профилактического профиля при предупреждении и ликвидации ЧС санитарно-эпидемиологического характера, возникающих как на территории Российской Федерации, так и за рубежом [16].

В подготовке материалов к указанному Санкт-Петербургскому саммиту, подготовке и реализации последующего Распоряжения Правительства Российской Федерации № 642-р от 21 мая 2007 г. о финансировании в объеме 1,4 млрд руб. мероприятий по модернизации 10 специализированных противозидемических бригад (СПЭБ) 5 противочумных институтов Роспотребнадзора в 2007–2010 гг. непосредственное участие принимали авторы данной работы.

Таким образом, сбалансированное вложение средств в затянувшиеся глобальные проблемы, в подготовку к новым угрозам глобального масштаба и проведение модернизации сил оперативного реагирования на ЧС санитарно-эпидемиологического характера, возникающих самостоятельно и вследствие стихийных бедствий и антропогенных катастроф, – все это комплекс тактических подходов в рамках современной стратегии борьбы с инфекционными болезнями.

Начиная с Санкт-Петербургского саммита «Группы восьми», Российская Федерация стала выступать как один из эффективных доноров международной помощи в области общественного здравоохранения. Совокупный вклад России в международные программы содействия развитию в сфере здравоохранения: 2006 г. – \$29,85 млн; 2007 г. – \$102,18 млн; 2008 г. – \$110,29 млн. Из программ, в которых Россия принимает активное участие, стоит отметить вклад в программу борьбы с малярией в Африке в 2008–2010 гг. – \$20 млн; вклад в Глобальную инициативу по искоренению полиомиелита в 2006–2009 гг. – \$20 млн, участие в международной инициативе по борьбе с «забытыми» тропическими болезнями 2009–2012 годы – \$23 млн. В 2006–2010 гг. вклад России в национальную программу по борьбе со СПИДом и вирусным гепатитом составил \$1,8 млрд.

### **Содружество Независимых Государств (СНГ)**

На уровне СНГ, т.е. стран Восточной Европы и Центральной Азии, особенности сотрудничества в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения определяются необходимостью его обеспечения в условиях нивелирования целого ряда негативных политических, социально-экономических последствий, ухудшения санитарно-эпидемиологической обстановки, возникших после размежевания СССР.

Существование единого эпидемиологического пространства происходило в условиях: возникшей прозрачности государственных границ; возросшей миграционной активности населения; хлынувшего в страны СНГ потока некачественной пищевой продукции, продовольственного сырья, других санитарно-опасных товаров и грузов; распада единой политической и социально-экономической системы, государственной санитарно-эпидемиологической службы, единой информационно-аналитической системы; ставшей нелегитимной законодательной, нормативно-правовой и методической базы в области санитарно-эпидемиологического благополучия; распада государственной системы оказания лечебно-профилактической помощи населению; резкого ухудшения социально-экономических условий жизни, возникновения криминальной революции и социальных конфликтов с гуманитарными последствиями, усугублявшими эпидемиологическую обстановку. Все это расслоило общество в понимании патриотизма, нравственно-моральных его устоев, безопасности страны, в том числе в отношении к проблеме обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

В указанных условиях сотрудничество стран в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения формировалось при иницирующей роли Российской Федерации, ее государственной санитарно-эпидемиологической службы, явившейся правопреемницей продолжения успешного опыта борьбы с инфекционными болезнями на пространстве СССР, который, как известно, увенчался крупными

успехами, в том числе ликвидацией оспы в мире.

Вопросы санитарно-эпидемиологического благополучия населения организационно решались в рамках созданного 26 июня 1992 г. Совета по сотрудничеству в области здравоохранения Содружества Независимых Государств, его рабочих органов – Межгосударственной комиссии по санитарно-эпидемиологическому нормированию, Координационного совета по проблемам ВИЧ-инфекции государств – участников СНГ, Координационного совета по малярии государств-участников СНГ, Координационного совета по проблемам санитарной охраны территорий государств-участников СНГ от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней и др. его рабочих органов (всего 12).

В рамках СНГ было подготовлено и рекомендовано к практическому применению более 200 нормативно-методических документов по проблемам охраны здоровья и обеспечения санитарно-гигиенического и эпидемиологического благополучия населения в государствах-участниках СНГ.

Сотрудничество государств-участников СНГ в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения осуществляется по направлениям:

- санитарно-эпидемиологическое нормирование, социально-гигиенический мониторинг;
- взаимодействие при гигиенической оценке потенциально опасной продукции;
- санитарная охрана территорий, Международные медико-санитарные правила;
- мониторинг гриппа птиц и подготовка к пандемии гриппа;
- противодействие эпидемии ВИЧ/СПИД, туберкулезу, профилактика паразитарных болезней, в том числе малярии;
- ликвидация кори;
- организация вакцинопрофилактики населения и предупреждение поствакцинальных осложнений;
- предупреждение и ликвидация последствий стихийных бедствий, технология оперативного реагирования на ЧС санитарно-эпидемиологического характера с участием модернизированных российских специализированных противоэпидемических бригад;
- разработка концепции биологической безопасности государств-участников СНГ.

В соответствии с резолюцией X Межгосударственной научно-практической конференции «Актуальные проблемы предупреждения и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций на территории государств-участников СНГ» активизация сотрудничества предусмотрена в следующих направлениях:

- паспортизация и эпидемиологическое районирование национальных территорий по рискам внешних и внутренних угроз биологической безопасности, обусловленных опасными инфекционными бо-

лезнями, а также неинфекционными заболеваниями, возникающими вследствие действия токсических агентов, химических и радиоактивных веществ;

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

- создание и совершенствование систем готовности к ЧС санитарно-эпидемиологического характера на национальном уровне, адекватных требованиям Международных медико-санитарных правил (2005 г.);

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

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

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

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

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

Таким образом, на уровне СНГ совершенно определено просматривается решение практически того же пула аспектов сотрудничества в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения, что и на уровне ВОЗ, «Группы восьми», а именно: сочетание совершенствования мониторинга и контроля острых эпидемических ситуаций в расчете на новые (неизвестные) инфекционные болезни и затянувшихся в решении значимых в социально-экономическом отношении проблем борьбы с ВИЧ/СПИД, туберкулезом, малярией, а также управляемых средствами специфической иммунопрофилактики инфекционных болезней, модернизация сетевых структур и мобильных формирований и совершенствование системных основ оперативного реагирования на ЧС санитарно-эпидемиологического характера.

#### **Евразийское экономическое сообщество (ЕврАзЭС)**

В состав ЕврАзЭС входят Республика Беларусь, Республика Казахстан, Кыргызская Республика,

Российская Федерация, Республика Таджикистан и Республика Узбекистан. С 2002 г. статус наблюдателя имеют Республика Молдова и Украина, с 2003 г. – Республика Армения. Эти страны входят в состав СНГ, аспекты сотрудничества которых в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения уже рассмотрены выше. Особенности данного формата международного сотрудничества в указанной области состоят в образовании и функционировании Таможенного союза (Республика Беларусь, Казахстан, Российская Федерация), санитарная охрана территории которого осуществляется при отсутствии внутренних барьеров на государственных границах, т.е. по единым правилам и по внешней границе Таможенного союза согласно утвержденным решением Межгосударственного совета ЕврАзЭС:

- Соглашения Таможенного союза по санитарным мерам (Межгоссовет ЕврАзЭС от 11 декабря 2009 г. № 28);

- Положения о порядке осуществления государственного санитарно-эпидемиологического надзора (контроля) за лицами и транспортными средствами, пересекающими таможенную границу Таможенного союза, подконтрольными товарами, перемещаемыми через таможенную границу Таможенного союза и на таможенной территории Таможенного союза (Межгоссовет ЕврАзЭС от 21 мая 2010 г. № 39);

- Единого перечня товаров, подлежащих санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) на таможенной границе и таможенной территории Таможенного союза (то же);

- Единых форм документов, подтверждающих безопасность продукции (товаров) (то же);

- Единых санитарно-эпидемиологических и гигиенических требований к товарам, подлежащим санитарно-эпидемиологическому надзору (контролю) (то же).

Таким образом, создан прецедент на пространстве СНГ по созданию режима наибольшего благоприятствования в экономической деятельности путем переноса согласованных видов государственного контроля на внешние контуры Таможенного союза. В рамках ЕврАзЭС Российской стороной разработаны, научно обоснованы и нормативно закреплены принципы санитарной охраны территории Таможенного союза, основанные на применении методологии и алгоритма реализации Международных медико-санитарных правил (2005 г.), разработанные в Российской Федерации [12].

### **Шанхайская организация сотрудничества (ШОС)**

Особенности формирования международного сотрудничества в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения на уровне ШОС, включающей 6 государств-членов (Республика Казахстан, Китайская Народная Республика, Кыргызская Республика, Российская Федерация, Республика Таджикистан, Республика Узбекистан) и страны-наблюдатели ШОС (Индия, Иран, Монгольская

Народная Республика, Пакистан, Афганистан; страна партнер по диалогу – Турция) определяются тем, что географический регион, занимаемый этими странами, находится, как было отмечено выше, в зоне повышенного риска (особенно Юго-Восточная Азия) возникновения и распространения эпидемических инфекционных болезней бактериальной и вирусной этиологии, а также стихийных бедствий.

Основные организационные события, на которых были определены главные аспекты сотрудничества в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения:

- Совещание глав служб государств-членов ШОС, отвечающих за обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия, 26 ноября 2008 г.;

- Круглый стол по вопросам санитарии на уровне старших должностных лиц ШОС, 27 ноября 2008 г.;

- Конференция «Перспективы сотрудничества государств-членов ШОС в противодействии угрозе инфекционных болезней», 2009 г., Новосибирск;

- Совещание глав служб государств-членов ШОС, отвечающих за обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия, 14 октября 2011 г., Москва.

Основные аспекты сотрудничества:

- предупреждение и реагирование на вспышки инфекционных болезней, в том числе вновь возникающих, надзор и борьба с гриппом;

- противодействие заболеваниям, управляемым средствами специфической иммунопрофилактики, противодействие кори и полиомиелиту;

- интенсификация научных исследований в области разработок новых средств профилактики инфекционных болезней, в том числе вакцины против ВИЧ;

- предупреждение и ликвидация эпидемических последствий стихийных бедствий;

- внедрение в практику пересмотренных в 2005 г. Международных медико-санитарных правил;

- концентрация усилий по созданию эффективных и безопасных вакцин;

- создание современной материально-технической базы лабораторных мощностей в соответствии со стандартом GLP;

- модернизация и создание новых мощностей по производству вакцин в соответствии со стандартом GMP;

- подготовка и повышение квалификации специалистов;

- предупреждение и ликвидация эпидемиологических последствий стихийных бедствий с участием мобильных формирований, в т.ч. российских СПЭБ;

- защита здоровья мигрантов.

В совместном заявлении глав служб государств-членов ШОС, отвечающих за обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения (14 октября 2011 г., Москва), принятом 15 июня 2011 г., рекомендовано продолжить реализацию указанных

направлений сотрудничества.

### **БРИКС**

БРИКС (BRICS) – группа из пяти стран с быстрорастущей экономикой: Бразилия, Россия, Индия, Китай, Южно-Африканская Республика.

Регистрируемые инфекционные (паразитарные) болезни в странах БРИКС:

Бразилия – эндемичная (энзоотичная) по чуме, желтой лихорадке, западному и венесуэльскому лошадиному энцефаломиелитам, энцефаломиелиту Сент-Луис, пятнистой лихорадке Скалистых гор, лихорадка денге, лейшманиозу;

Россия – эндемичная (энзоотичная) по чуме, Крымской геморрагической лихорадке, лихорадке Западного Нила, клещевому вирусному энцефалиту, геморрагической лихорадке с почечным синдромом, является единственной страной в данном формате донором международной помощи в области борьбы с инфекционными болезнями;

Индия – эндемичная (энзоотичная) по чуме, холере, тропической малярии, полиомиелиту, лихорадка денге, Японскому энцефалиту.

Китай – эндемичный (энзоотичный) по чуме, гриппу птиц А/Н5N1/, ТОРС, малярии;

Южно-Африканская Республика – эндемичная (энзоотичная) по чуме, малярии (в т.ч. тропическая), Крымской геморрагической лихорадке, лихорадке Западного Нила, лихорадке Рифт-Валли, зарегистрированы случаи контагиозных вирусных геморрагических лихорадок Марбург, Эбола (занос), Ласса (занос), шистосомоза.

О начале сотрудничества стран БРИКС в сфере здравоохранения было заявлено на третьем саммите лидеров стран БРИКС 14 апреля 2011 г. в Китае. В Пекинской декларации на встрече министров здравоохранения стран БРИКС (11 июля 2011 г., Китай) определены приоритетные направления сотрудничества:

- по укреплению систем здравоохранения и преодолению барьеров на пути доступа к недорогим, качественным, эффективным, безопасным лекарственным препаратам, вакцинам и другим медицинским технологиям для лечения ВИЧ/СПИДа, туберкулеза, вирусного гепатита, малярии и других инфекционных и неинфекционных заболеваний;

- в сфере изучения и продвижения эффективной передачи технологий для укрепления инновационного потенциала в интересах общественного здравоохранения в развивающихся странах;

- в сфере поддержки международных организаций, в том числе ВОЗ и ЮНЭЙДС, Глобального фонда по борьбе со СПИДом, туберкулезом и малярией и Глобального альянса по вакцинации и иммунизации (GAVI), для расширения доступа к недорогим, качественным, эффективным и безопасным лекарственным средствам, вакцинам и другой медицинской продукции, которая обслуживает потребности общественного здравоохранения.

В 2012 г. в Нью-Дели состоялся четвертый

саммит БРИКС, по итогам которого обнародована *Делийская декларация* (29 марта 2012 г.). В качестве проблем на уровне общественного здравоохранения БРИКС были обозначены вопросы обеспечения всеобщего доступа к медицинским услугам, технологиям и медикаментам.

### **Сотрудничество Российской Федерации и Республики Казахстан**

Сотрудничество этих 2 стран в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения, на 2-сторонней основе и в рамках СНГ, ЕврАзЭС, ШОС широко представлено, проанализировано и опубликовано в Материалах Круглого стола санитарно-эпидемиологических служб Российской Федерации и Республики Казахстан, проведенного в рамках VIII Форума межрегионального сотрудничества Российской Федерации и Республики Казахстан с участием глав государств (14 сентября 2011 г., Астрахань) [13]. В опубликованной работе изложен максимальный спектр вопросов международного сотрудничества в области борьбы с инфекционными болезнями.

Важность указанного вида международного сотрудничества определяется тем, что согласно декларированию в 2000 г. Совета безопасности ООН в современных условиях область санитарно-эпидемиологического благополучия населения в глобальном масштабе и, в частности, борьба с инфекционными болезнями переросли из проблемы здравоохранения в глобальную политическую проблему [1, 10].

Именно устойчивая тенденция появления новых, ранее не известных человечеству инфекционных болезней, рассматриваемая в литературе как один из глобальных признаков современной эволюции эпидемического процесса, наряду с другими признаками его эволюции и аспектами глобализации – экономическим, миграционным, экологическим, политическим, демографическим, технологическим, террористически [14, 17], послужила одним из главных мотивов переработки ММСП 1969 г. и разработки ММСП (2005 г.).

В опубликованном докладе ВОЗ о ситуации в мире в 2007 г. [4] начиная с 1970-х годов ежегодно в мире регистрируется, по крайней мере, одно новое инфекционное заболевание. В литературе имеются и другие данные о годовом приросте новых инфекционных болезней в зависимости от продолжительности рассматриваемого периода. Так, по данным В.В.Зверева, их число за 40 лет составило 1,8 [5], В.П.Сергиева, Н.Н.Филатова за 32 года – 1,6 [15], Б.Л.Черкасского за 27 лет – 1,3 [18]; К. Holmes за 64 года – 5,2 [20]; В.В.Шкарина, О.В. Ковалишеной за 60 лет – 3,5 [19].

Все эти данные свидетельствуют об актуальности проблемы выявления, верификации, мониторинга и контроля новых инфекционных болезней. Их приоритетная значимость в списке ЧС, в первую очередь, требует совершенствования информационно-аналитического и прогнозно-

моделирующего обеспечения в системе эпидемиологического надзора и санитарной охраны территорий. Востребованность таких исследований реализована нами на примерах Крымской геморрагической лихорадки и лихорадки Западного Нила. Эти данные приведены в докладе и опубликованы в виде тезисов в Материалах X съезда ВНПОЭМП, состоявшемся 12–13 апреля 2012 г. в Москве.

Итак, проведенное исследование структуры и содержания международного сотрудничества в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения в различных его форматах как-то на уровне ООН, ВОЗ, «Группы восьми», СНГ, ЕврАзЭС, ШОС, БРИКС, двухсторонних отношений Российской Федерации и Республики Казахстан позволило разработать модель формирования и развития такого сотрудничества, характеризующуюся функциональными признаками:

#### Методического плана (6 признаков)

1. Оценка особенностей внешних (по отношению к международному формату) и внутренних (по отношению к национальной территории) угроз возникновения ЧС в области общественного здравоохранения, имеющих международное значение.

2. Реализация современной стратегии борьбы с инфекционными болезнями, включающей такие тактические подходы, как минимизация негативного воздействия эпидемических и пандемических проявлений известных нозологических форм, характеризующихся наибольшей глобальной социально-экономической значимостью, и создание возможностей для адекватных ответных мер на острые эпидемические ситуации, в том числе вызываемые новыми (неизвестными) инфекционными болезнями с потенциалом эпидемического и пандемического распространения и высокой социально-экономической значимости.

3. Оценка степени внедрения Международных медико-санитарных правил (2005 г.) и приведение в соответствие с их требованиями методологического, технологического, материально-технического, кадрового, биотехнологического (производство МИБП) ресурсов и нормативно-правовой базы при осуществлении эпидемиологического надзора и санитарной охраны территорий.

4. Модернизация и стандартизация стационарных сетевых структур, осуществляющих мониторинг возбудителей инфекционных (паразитарных) болезней I–IV групп патогенности, и мобильных формирований (СПЭБ), предназначенных для оказания помощи территориально закрепленным структурам здравоохранения санитарно-эпидемиологического и лечебно-профилактического профилей, при предупреждении и ликвидации ЧС санитарно-эпидемиологического характера, возникающих самостоятельно и вследствие стихийных бедствий (землетрясения, наводнения и др.) и антропогенных катастроф (техногенного, конфликтного с гуманитарными последствиями, террористического проис-

хождения).

5. Совершенствование и стандартизация процедуры осуществления информационно-аналитической и прогнозно-моделирующей функций скрининга, мониторинга и контроля ЧС санитарно-эпидемиологического характера на основе разработки и внедрения современных технологий при эпидемиологическом анализе, воздействии на эпидемический процесс с учетом его эволюции и применения современных диагностических, профилактических технологий и лечебных средств.

6. Обеспечение биологической безопасности при получении, хранении, передаче и транспортировке биологически опасных агентов.

#### Организационного плана (2 признака)

1. Создание координирующего экспертного органа на функциональной основе для планирования, организации и реализации модели формирования международных отношений в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

2. Совершенствование организационных, эпидемиолого-диагностических, методических, исполнительских и контрольных направлений эпидемиологического надзора и санитарной охраны территорий.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брико Н.И., Покровский В.И. Глобализация и эпидемический процесс. Росмедпортал.ком. 2010; 1. [http://www.rosmedportal.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=421](http://www.rosmedportal.com/index.php?option=com_content&view=article&id=421)
2. Глобальный план ВОЗ по подготовке к борьбе с гриппом. Роль ВОЗ и рекомендации по проведению национальных мероприятий до начала и в период пандемии. ВОЗ; 2005.
3. Грижебовский Г.М., Топорков В.П., Брюханова Г.Д., Ефременко В.И., Бейер А.П., Мезенцев В.М., Кальной С.М. Эпидемиологическая характеристика вспышки чумы в Индии в 1994 г. Пробл. особо опасн. инф. 2003; (85):28–37.
4. Доклад о состоянии здравоохранения в мире. Более безопасное будущее. Глобальная безопасность в области общественного здравоохранения в XXI веке. ВОЗ; 2007.
5. Зверев В.В. Пресс-конференция в РИА «Новости» 4 февраля 2005 г.
6. Марамович А.С., Косилко С.А., Воронова Г.А., Иннокентьева Т.И., Базанова Л.П., Никитин А.Я., Окунев Л.П. Эпидемиологическое обоснование санитарной охраны территории Сибири от заноса чумы в Монголии. Пробл. особо опасных инф. 2007; 1(93):38–43.
7. 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. микробиол., эидемиол. и иммунобиол. 2008; 1:95–9.
8. Международные медико-санитарные правила (2005 г.). Направления работы по выполнению правил. Июнь 2007. <http://www.who.int/ihr/finalversion9Nov07/pdf>.
9. Москвитина Э.А., Мазрухо А.Б., Адаменко О.Л., Кругликов В.Д. Холера в начале XXI века. Прогноз на глобальном уровне. Пробл. особо опасн. инф. 2012; 1(111):11–6.
10. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Кривуля С.Д., Федоров Ю.М., Топорков В.П. Стратегия борьбы с инфекционными болезнями и санитарная охрана территорий в современных условиях. Пробл. особо опасн. инф. 2006; 2(92):5–9.
11. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Топорков В.П., Чистякова Г.Г., Пакскина Н.Д. Реализация глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями и применение современных технологий в государствах-участниках СНГ. В кн.: Матер IX Межгос. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ. Волгоград; 2008. С. 9–12.
12. Онищенко Г.Г., Пакскина Н.Д., Топорков В.П., Топорков А.В., Шиянова А.Е., Кутырев В.В. Научно-методические и нормативные аспекты реализации Международных медико-санитарных правил (2005 г.) на территории Российской Федерации. Пробл. особо опасных инф. 2010; 3(105):5–12.
13. Онищенко Г.Г., Смоленский В.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Топорков В.П., Кутырев В.В. Актуальные направления сотрудничества Российской Федерации и Республики Казахстан в области обеспечения санитарно-

эпидемиологического благополучия населения в современных условиях. В кн.: Вопросы реагирования на чрезвычайные ситуации санитарно-эпидемиологического характера: Матер. Круглого стола санитарно-эпидемиологических служб Российской Федерации и Республики Казахстан, проводимого в рамках VIII Форума межрегионального сотрудничества Российской Федерации и Республики Казахстан с участием глав государств (14 сентября 2011, Астрахань). Саратов: ООО «Приволжское издательство»; 2011. С. 5–39.

14. *Покровский В.И.*, редактор. Руководство по эпидемиологии инфекционных болезней. М.: Медицина; 1993. Т. 1. 464 с.

15. *Сергиев В.П., Филатов Н.Н.* Инфекционные болезни на рубеже веков. М.: Наука; 2006. 571 с.

16. *Топорков А.В., Кутырев В.В.* Опыт работы и возможности специализированных противоэпидемических бригад (СПЭБ) Роспотребнадзора в ликвидации чрезвычайных ситуаций санитарно-эпидемиологического характера. В кн.: Вопросы реагирования на чрезвычайные ситуации санитарно-эпидемиологического характера: Матер. Круглого стола санитарно-эпидемиологических служб Российской Федерации и Республики Казахстан, проводимого в рамках VIII Форума межрегионального сотрудничества Российской Федерации и Республики Казахстан с участием глав государств (14 сентября 2011 г., Астрахань). Саратов: ООО «Приволжское издательство»; 2011. С. 116–20.

17. *Топорков В.П., Кутырев В.В., Кривуля С.Д., Федоров Ю.М., Шиянова А.Е., Меркулова Т.К.* Глобализационные процессы как факторы, определяющие современную концепцию санитарной охраны территорий. Пробл. особо опасных инф. 2005; 2(90):36–9.

18. *Черкасский Б.Л.* Глобальная эпидемиология. М.: Практическая медицина; 2008. 446 с.

19. *Шкарин В.В., Ковалишена О.В.* Инфекционные болезни: бесконечный процесс обновлений... Эпидемиол. и инф. бол. Акт. вопросы. 2011; 2:70–3.

20. *Holmes King.* Present and Future Challenges in Global Public Health. In: 49<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC); Sept. 12, 2009. Available from: <http://www.slideshare.net/UWGGlobalHealth/king-holmes-icaac-9-12-2009-final-40-min-talk-sans-pp-tminimizer>.

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

1. *Briko N.I., Pokrovsky V.I.* [Globalization and epidemiological process]. Rosmedportal.com, 2010; 1. Available from: [http://www.rosmedportal.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=421](http://www.rosmedportal.com/index.php?option=com_content&view=article&id=421).

2. [WHO global strategy for influenza actions preparedness. WHO role and recommendations on the nationwide arrangements carried out before and during pandemic period]. WHO; 2005.

3. *Grizhebovsky G.M., Toporkov V.P., Brukhanova G.D., Yefremenko V.E., Beyer A.P., Mezentssev V.M., Kalnoy S.M.* [Epidemiologic characterization of the plague outbreak that occurred in India in 1994]. Probl. Osobo. Opasn. Infek. 2003; (85):28–37.

4. [Report on the world health situation. Safer future. Global safety in the sphere of public health care in the XXI century]. WHO; 2007.

5. *Zverev V.V.* [Press-conference of Russian Information Agency "News". February 4, 2005].

6. *Maramovich A.S., Kosilko S.A., Innokent'eva T.I., Voronova G.A., Bazanova L.P., Nikitin A.Ya., Okunev L.P.* [Epidemiologic justification for sanitary protection of the Siberian territory from the importation of plague from Mongolia]. Probl. Osobo. Opasn. Infek. 2007; (93):38–43.

7. *Maramovich A.S., Kosilko S.A., Voronova G.A., Innokent'eva T.I., Bazanova L.P., Nikitin A.Ya., Okunev L.P.* [Plague in China. Risk of importation into the regions of Siberia and Far East]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2008; 1:95–9.

8. [International Health Regulations (2005). Strands of work for their implementation. June, 2007]. Available from: <http://www.who.int/ihr/final-version9Nov07/pdf>.

9. *Moskvitina E.A., Mazrukho A.B., Adamenko O.L., Kruglikov V.D.* [Cholera in the early XXI century: Global prognosis]. Probl. Osobo. Opasn. Infek. 2012; (111):11–6.

10. *Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., Krivulya S.D., Feodorov Yu.M., Toporkov V.P.* [Philosophy of infectious diseases control and sanitary protection of territories under the present-day situation]. Probl. Osobo. Opasn. Infek. 2006; (92):5–9.

11. *Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., Toporkov V.P., Chistyakova G.G., Paksina N.D.* [Realization of the global strategy for infectious diseases control and application of modern technologies in the territory of the member states of the CIS]. In: [Proceedings of the IX international research-and-practice conference of the member states of the CIS]. Volgograd: 2008. P. 9–12.

12. *Onishchenko G.G., Paksina N.D., Toporkov V.P., Toporkov A.V., Shiyanova A.E., Kutyrev V.V.* [Methodological principles of implementation of International Health Regulations (2005) in the territory of the Russian Federation]. Probl. Osobo. Opasn. Infek. 2010; (105):5–12.

13. *Onishchenko G.G., Smolensky V.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Paksina N.D., Toporkov V.P., Kutyrev V.V.* [Current trends of cooperation between the Russian Federation and Republic of Kazakhstan in the sphere of provision for sanitary-and-epidemiological welfare of the population under the modern conditions]. In: [Problems of emergency response to the incidents of the sanitary-and-epidemiological type. Proceedings of the Penal discussion of sanitary-and-epidemiological services of the Russian Federation and Republic of Kazakhstan, carried out within the frames of the VIII Transregional forum on cooperation between the Russian Federation and Republic of Kazakhstan with participation of the heads of states (September 14, 2011; Astrakhan). Saratov; 2011. P. 5–39.

14. *Pokrovsky V.I., editor.* [Guidelines on Epidemiology of Infectious Diseases]. M.: Meditsina; 1993. Vol. 1. 464 p.

15. *Sergiev V.P., Filatov N.N.* [Infectious Diseases at the Turn of the Century]. M.: Nauka; 2006. 571 p.

16. *Toporkov A.V., Kutyrev V.V.* [Experience and capacity of the Rospotrebnadzor specialized anti-epidemic teams (SAET) in emergency situations management]. In: [Problems of emergency response to the incidents of the sanitary-and-epidemiological type. Proceedings of the Penal discussion of sanitary-and-epidemiological services of the Russian Federation and Republic of Kazakhstan, carried out within the frames of the VIII Transregional forum on cooperation between the Russian Federation and Republic of Kazakhstan with participation of the heads of states (September 14, 2011; Astrakhan)]. Saratov; 2011. P. 116–20.

17. *Toporkov V.P., Kutyrev V.V., Krivulya S.D., Feodorov Yu.M., Shiyanova A.E., Merkulova T.K.* [Globalization processes as factors determining the contemporary concept of territorial sanitary protection]. Probl. Osobo. Opasn. Infek. 2005; (90):36–9.

18. *Cherkassky B.L.* [Global Epidemiology]. M.: Prakt. Meditsina; 2008. 446 p.

19. *Shkarin V.V., Kovalishena O.V.* [Infectious diseases: infinite process of renovation]. Epidemiol. Infek. Bol. Aktual. Vopr. 2011; 2:70–3.

#### Authors:

*Smolensky V.Yu.* Federal Service on Surveillance in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare. Moscow, Russia.

*Toporkov V.P., Karnaukhov I.G., Toporkov A.V., Kutyrev V.V.* Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: [rusrap@microbe.ru](mailto:rusrap@microbe.ru)

#### Об авторах:

*Смоленский В.Ю.* Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Москва.

*Топорков В.П., Карнаухов И.Г., Топорков А.В., Кутырев В.В.* Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: [rusrap@microbe.ru](mailto:rusrap@microbe.ru)

Поступила 12.07.12.

УДК 616.981.452(471.631)

А.А.Кузнецов<sup>1</sup>, А.М.Поршаков<sup>1</sup>, А.Н.Матросов<sup>1</sup>, В.К.Синцов<sup>2</sup>, В.П.Осипов<sup>2</sup>, В.Б.-Х.Санджиев<sup>3</sup>,  
А.А.Слудский<sup>1</sup>

## ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПРИКАСПИЙСКОГО ПЕСЧАНОГО ОЧАГА ЧУМЫ ПО КРАТНОСТИ ЭПИЗООТИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ

<sup>1</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов;

<sup>2</sup>ФКУЗ «Астраханская противочумная станция», Астрахань;

<sup>3</sup>ФКУЗ «Элистинская противочумная станция», Элиста

Представлены результаты эпизоотологической дифференциации Прикаспийского песчаного очага чумы в зоне деятельности Астраханской и Элистинской противочумных станций (Волго-Кумское междуречье), необходимой для дальнейшего совершенствования эпизоотологического мониторинга энзоотичных территорий. С помощью метода круговой экстраполяции получена карта многолетнего эпизоотического участка за период последней активизации очага с 1979 по 2010 год. На карте показана дислокация ядер активности очага и зон кратковременной регистрации эпизоотического процесса, определены их количественные характеристики. Установлено, что плотность положительных проб на чуму в ядрах очага на порядок выше, чем в зонах с однократными проявлениями. Картографическая модель дифференциации предназначена для обоснованного планирования мероприятий эпидемиологического надзора и дальнейшего изучения проблем эпизоотологии чумы.

*Ключевые слова:* природный очаг чумы, эпизоотический участок, эпизоотологический мониторинг.

A.A.Kuznetsov<sup>1</sup>, A.M.Porshakov<sup>1</sup>, A.N.Matrosov<sup>1</sup>, V.K.Sintsov<sup>2</sup>, V.P.Osipov<sup>2</sup>, V.B.-Kh.Sandzhiev<sup>3</sup>, A.A.Sludsky<sup>1</sup>

## Differentiation of the Pre-Caspian Sandy Plague Foci on the Basis of the Frequency of Epizootic Manifestations

<sup>1</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov; <sup>2</sup>Astrakhan Plague Control Station, Astrakhan;

<sup>3</sup>Elista Plague Control Station, Elista;

Displayed are the results of epizootiological differentiation of the Pre-Caspian sandy plague focus in the territory supervised by Astrakhan and Elista plague control stations (Volga-Kumsk Interfleuve). This differentiation is significant for further development of epizootiological monitoring practice in the enzootic regions. Using circular extrapolation method, designed is the map of the persistent epizootic region within the last period of the focus activation since 1979 till 2010. Depicted is the dislocation of focus activity nucleuses and areas where short-term epizootic process is registered. Identified are their qualitative characteristics. Determined is the fact that density of plague-positive samples in the nucleuses is much higher, than in the areas with non-recurring manifestations. This cartographic differentiation model can be used for justified and substantiated planning of epidemiological control measures and further investigation of problems related to plague epizootiology.

*Key words:* natural plague foci, epizootic region, epizootiological monitoring.

Одним из приоритетных направлений совершенствования эпизоотологического мониторинга природных очагов чумы является детальная дифференциация их территории по активности эпизоотий. В качестве объективного показателя активности целесообразно использовать продолжительность (кратность) выявления зараженных носителей и переносчиков возбудителя в многолетнем аспекте на том или ином участке очага.

### Материалы и методы

Результаты наблюдения за эпизоотическими проявлениями чумы в Прикаспийском песчаном очаге нами уже рассматривались [1, 2], однако они касались лишь восточной части очага, обследуемой Астраханской противочумной станцией. В данном сообщении использованы материалы обследования Волго-Кумского междуречья как Астраханской, так и

Элистинской противочумными станциями в период 1979–2010 гг.

Наиболее приемлемой с теоретической точки зрения основой для пространственной дифференциации очага является, на наш взгляд, карта распределения территорий с различной продолжительностью эпизоотий чумы, построенная методом круговой экстраполяции [1]. Использование такой карты позволяет существенно снизить уровень формализации, т.к. участки с различным эпизоотологическим статусом оконтуриваются в строгой зависимости от точной дислокации всех мест выявления возбудителя чумы. Формализованным в этом случае остается только радиус эпизоотологической экстраполяции (5 км). Определенное значение для дифференциации имеют градации длительности регистрации эпизоотии. Термин «длительность (продолжительность)» регистрации эпизоотии применен здесь достаточно условно. В контексте традиционно-го эпизоотологического анализа он говорит лишь о

приуроченности фактов обнаружения возбудителя к определенным календарным годам. Реальная продолжительность активных фаз эпизоотического процесса оценивается отдельными месяцами, иногда неделями и даже днями.

Многолетнее наблюдение за активностью Прикаспийского песчаного очага чумы послужило основой его детальной эпизоотологической дифференциации. При использовании метода круговой экстраполяции были получены контуры ежегодных эпизоотических участков за 29 лет, начиная с 1979 по 2010 год (без регистрации возбудителя оказались 1997, 2007 и 2008 гг.). Для этого вокруг всех точек с положительным на чуму результатом исследования полевого материала вычерчивали окружности радиусом 5 км. Если получавшиеся при этом «эпизоотические круги» соприкасались или налегали друг на друга, формировался эпизоотический участок, представлявший собой либо единый массив, либо несколько изолированных фрагментов. Путем последовательного наложения карт эпизоотий за отдельные годы, каждый раз сопровождавшегося прорисовкой совпадавших фрагментов и определением кратности проявлений на них, получено обобщенное изображение эпизоотического участка за указанный период (рис. 1).

В процессе совмещения карт эпизоотических

участков использовали правило, препятствующее образованию избыточного количества мелких фрагментов с завышенной кратностью эпизоотий. Увеличение кратности на 1 год фиксировали лишь в тех случаях, когда эпизоотические круги разных лет совмещались настолько существенно, что в область перекрытия попадали эпизоотические точки, являющиеся центрами этих кругов. В противном случае в области перекрытия оставляли имеющуюся там кратность без изменений.

### Результаты и обсуждение

Морфология многолетнего эпизоотического участка имеет четко выраженную концентрическую структуру с наиболее длительными проявлениями чумы в центральных частях массива. Нет сомнений в том, что выявленные эпизоотические ядра обладают определенными функциональными особенностями, которые еще ждут своей расшифровки. Однако независимо от причин существования таких ядер, места их дислокации однозначно диктуют необходимость особо пристального внимания к ним при проведении эпизоотологического мониторинга.

Устойчивость эпизоотического процесса, выраженная той или иной кратностью (длительностью) проявлений, напрямую связана с его интенсивностью

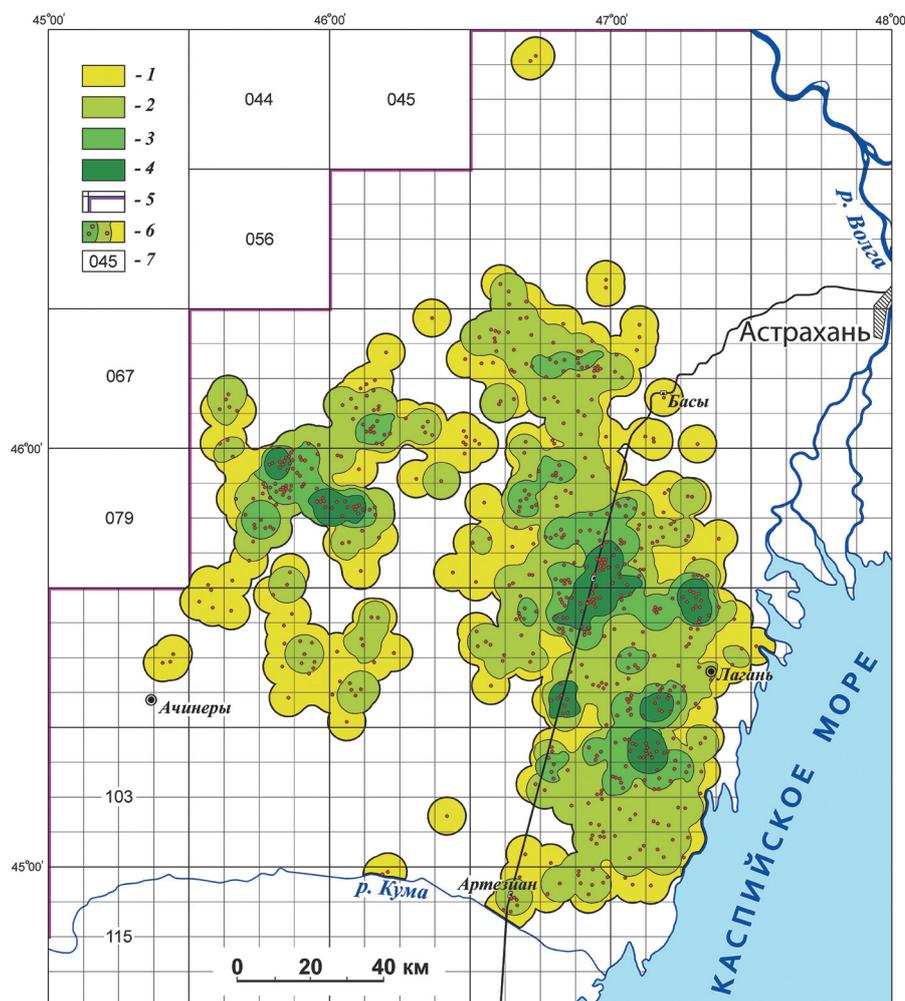


Рис. 1. Участок многолетних эпизоотических проявлений в Прикаспийском песчаном очаге чумы (43) за 1979–2010 гг. и его дифференциация по суммарной продолжительности эпизоотий в поселениях носителей и переносчиков возбудителя:  
 1 – 1 год; 2 – 2–3 года; 3 – 4–5 лет; 4 – 6 и более лет; 5 – формализованная граница очага; 6 – дислокация положительных проб на чуму; 7 – номера листов топографической карты масштаба 1:100000

Характеристика зон эпизоотического участка 1979–2010 гг. в Прикаспийском песчаном очаге, дифференцированных по общей продолжительности проявлений чумы

Длительность проявлений чумы	Общая площадь зоны		Кол-во эпизоотических точек		
	кв. км	%	абс.	%	плотность на 100 кв. км
1 год	5 600	38,4	81	13,5	1,4
2–3 года	6 400	43,8	236	39,2	3,7
4–5 лет	1 750	12,0	172	28,5	9,8
6 и более лет	850	5,8	113	18,8	13,3
<b>Итого:</b>	<b>14 600</b>	<b>100,0</b>	<b>602</b>	<b>100,0</b>	<b>4,1</b>

при каждой активизации. Одним из косвенных показателей интенсивности эпизоотии мы использовали плотность положительных на чуму проб, которая возрастает при многократной регистрации на одной и той же территории. То есть оценка плотности положительных проб является объективной характеристикой интенсивности и устойчивости эпизоотического процесса, которые существенно различались в зонах частого и редкого проявлений чумы (таблица). В ядрах очага плотность пунктов с чумой оказалась почти в 10 раз выше их плотности на территориях с однократными проявлениями. Площадь ядер была соответственно на порядок меньше площади зон с наиболее редкими эпизоотиями, а общая их доля составила лишь около 6 % от площади всего участка. Заметим, что суммарное количество эпизоотических точек, указанное в таблице, несколько меньше официально зарегистрированного. Это связано с тем, что мы принимали за одну точку те случаи, когда возбудитель обнаруживался в разные годы на одном месте. Однако возраставшая кратность проявлений чумы в таких местах, безусловно, учитывалась.

Размеры образовавшихся фрагментов эпизоотического участка обычно были весьма не велики, особенно в зонах частого обнаружения эпизоотий. Оказалось, что суммарная продолжительность регистрации чумы на отдельном фрагменте не превы-

шала 9 лет. Отдельные ядра или зоны с более редкими проявлениями формировались из нескольких фрагментов, характеризующихся разной кратностью эпизоотий, но входивших в одну градацию. Анализ хронологической структуры всех положительных точек, находящихся в конкретном ядре, показал, что суммарная продолжительность эпизоотий в его пределах (по общему списку лет) могла превышать таковую внутри фрагмента с максимальной частотой проявлений.

На рис. 2 приведены изображения двух наиболее устойчивых эпизоотических ядер. В пределах меньшего из них (Б) имеется фрагмент с 9-летними проявлениями чумы. Даты выявления всех положительных точек внутри всего этого ядра также охватывают 9 лет. На территории большего ядра (А) есть фрагмент с 8-летними проявлениями. Однако на всей территории ядра возбудитель чумы обнаруживался в течение 13 лет. Аналогичная особенность хронологической структуры отмечена и для зоны с однолетней регистрацией эпизоотии чумы. При анализе дат обнаружения возбудителя чумы (по годам) в различных точках любого крупного фрагмента этой зоны, образовывался список из нескольких лет. Тем не менее, в целях объективной дифференциации эпизоотического участка такую территорию нельзя отнести к участкам с многократными проявлениями чумы. Каждая ее

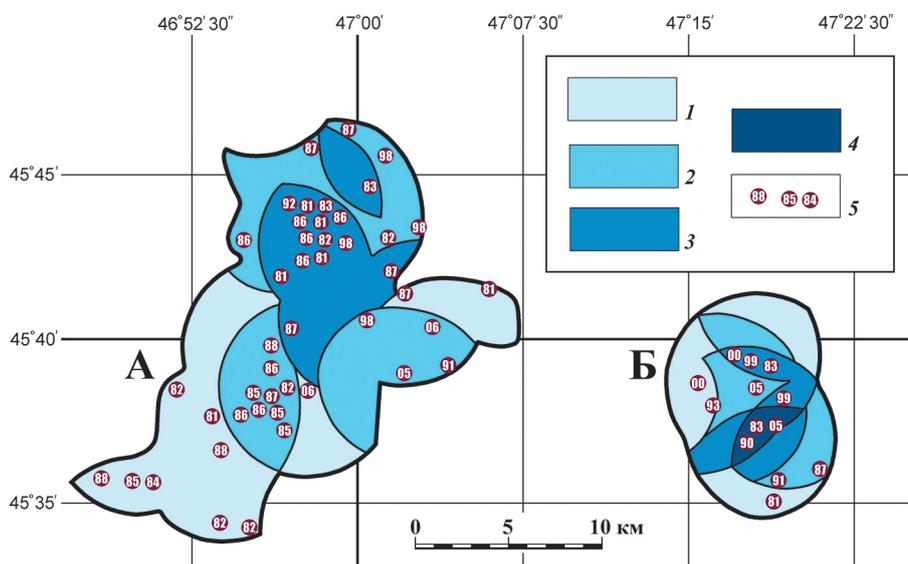


Рис. 2. Фрагментация эпизоотических ядер (А, Б) в Прикаспийском песчаном очаге чумы в период его активизации в 1979–2010 гг.

Суммарная продолжительность регистрации возбудителя чумы в течение: 1 – 6 лет; 2 – 7 лет; 3 – 8 лет; 4 – 9 лет. 5 – места и годы обнаружения зараженных чумой животных (грызунов, блох)

часть, соответствующая элементарному участку эпизоотологической экстраполяции с радиусом 5 км, содержала зараженных животных в течение всего лишь одного года. В последующие годы происходил рост зоны за счет примыкания к ней новых эпизоотических участков, которые при этом практически не налегали друг на друга. Конкретная конфигурация эпизоотических ядер и других зон многолетнего эпизоотического участка в определенной степени зависит от радиуса эпизоотологической экстраполяции и от выбранной шкалы кратности проявлений чумы. Несмотря на достаточную условность границ ядра, его общая дислокация является мощным наводящим признаком при поиске зараженных чумой животных. Предполагается, что такая наводка может оказаться наиболее эффективной в период выхода природного очага из продолжительного межэпизоотического периода.

Для утилитарных целей эпидемиологического надзора за чумой и организации профилактических мероприятий оправданным является формально-территориальное районирование территории природного очага [3]. Одним из критериев районирования, помимо учета данных о численности населения, выступает ретроспективная оценка уровня эпизоотической активности на территории того или иного сектора. Единственным надежным и объективным

показателем активности служит хронологическая структура фактов обнаружения возбудителя чумы за время последней активизации Прикаспийского песчаного очага, учитывая, что этот период длился там более 30 лет.

На рис. 3 приведена схема распределения формально-территориальных единиц (секторов) по общей продолжительности эпизоотий чумы на их территориях. Здесь мы использовали такие же градации, как и на рис. 1. Сравнение рисунков 1 и 3 показывает наличие видимых, но не принципиальных различий результатов двух использованных нами способов выявления пространственной структуры эпизоотии. При этом следует подчеркнуть, что лишь результаты круговой экстраполяции могут обеспечить детальный научный анализ условий развития чумного эпизоотического процесса. Такой анализ позволяет учесть достаточно тонкие ландшафтные и биоценоотические особенности местности на крупномасштабной картографической основе, что должно привести к более глубокому пониманию закономерностей природной очаговости чумы. С другой стороны, результаты более простого районирования по формально-территориальному принципу пригодны для обоснованного планирования любых мероприятий по обеспечению эпидемиологического благопо-

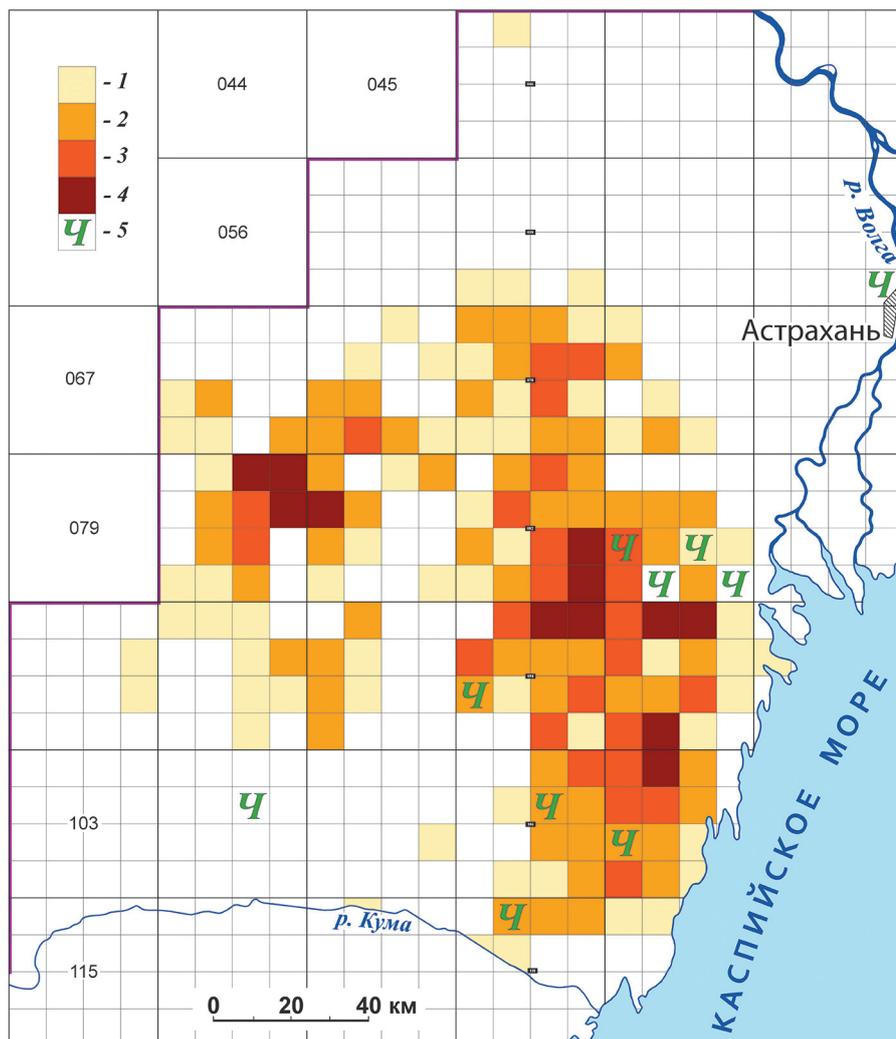


Рис. 3. Формально-территориальная дифференциация Прикаспийского песчаного очага чумы по общей продолжительности эпизоотий на территории отдельных секторов в 1979–2010 гг. Регистрация возбудителя чумы в течение: 1 – 1 года; 2 – 2–3 лет; 3 – 4–5 лет; 4 – 6 и более лет. 5 – сектора, где в XX столетии регистрировались заболевания человека чумой

лучия населения на необходимом уровне.

Мы полагаем, что при оценке эпидемической опасности той или иной территории нет необходимости принимать в расчет заболевания чумой человека, имевшие место 70 и более лет назад. На рис. 3 видно, что прошлая заболеваемость лишь приблизительно приурочена к местам последних наиболее интенсивных эпизоотических проявлений, а в некоторых случаях связь отсутствует полностью. Причины этого могут заключаться в следующем. Во-первых, указанные места заболеваний людей являются, как правило, местами их проживания, но не заражения (зачносные случаи). Во-вторых, за многие десятилетия, прошедшие со времени массовых эпидемических проявлений, произошла определенная трансформация ландшафтов природного очага чумы, в результате чего поселения носителей и переносчиков возбудителя, способные поддерживать эпизоотический процесс, изменили свою дислокацию. Не исключено, что расположение таких поселений будет меняться и в будущем. Поэтому основным критерием оценки эпидемиологического статуса стандартных участков должна служить самая последняя оценка эпизоотической активности на их территории с учетом плотности, характера деятельности и постоянства проживания населения.

Таким образом, анализ продолжительности (кратности) эпизоотий чумы на небольших участках местности позволил выявить территории, в различной степени поддерживающие эпизоотический процесс среди носителей и переносчиков возбудителя. Картографическая интерпретация результатов анализа, представленная в статье, является удобной основой при планировании эпизоотологического мониторинга в Прикаспийском песчаном очаге чумы. Эта же основа может быть использована как подготовленный ретроспективный материал при планировании научных исследований по изучению причин устойчивости энзоотии чумы. Кроме того, выполненная нами эпизоотологическая дифференциация

данного очага должна быть включена в его электронный паспорт как в описательную часть, так и в виде специального картографического слоя.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузнецов А.А., Кутырев В.В., Матросов А.Н., Топорков В.П. Совершенствование мониторинга за природными очагами чумы на основе анализа эколого-эпизоотологических закономерностей их функционирования. Пробл. особо опасных инф. 2004; 2(88):12–16.
2. Кузнецов А.А., Рогаткин А.К., Кабин В.В., Кологоров А.И., Матросов А.Н., Козлова Т.А., Илюхин А.А. Характеристика пространственно-территориальных особенностей эпизоотии чумы в Прикаспийском песчаном очаге. В кн.: Природно-очаговые особо опасные инфекции на юге России, их профилактика и лабораторная диагностика. Астрахань; 2001. С. 37–40.
3. 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. Алматы, 2001; 3:178–181.

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

1. Kuznetsov A.A., Kutyrev V.V., Matrosov A.N., Toporkov V.P. [Improvement of monitoring of natural plague foci based on the analysis of ecologic and epizootologic regularities of their functioning]. Probl. Osobno Opasn. Infek. 2004; (88):12–6.
2. Kuznetsov A.A., Rogatkin A.K., Kabin V.V., Kologorov A.I., Matrosov A.N., Kozlova T.A., Ilyukhin A.A. [Characteristics of spatial peculiarities attributed to the plague epizooties in the Pre-Caspian sandy foci]. In: [Natural Foci Particularly Dangerous Infectious Diseases in the South of Russia, Their Prophylaxis and Laboratory Diagnostics]. Astrakhan, 2001. P. 37–40.
3. Matrosov A.N., Kuznetsov A.A., 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]. Karantin. Zoonoz. Infek. v Kazakhstane. 2001; 3:178–81.

#### Authors:

Kuznetsov A.A., Porshakov A.M., Matrosov A.N., Sludsky A.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrap@microbe.ru  
Sintsov V.K., Osipov V.P. Astrakhan Plague Control Station. Astrakhan.  
Sandzhiev V.B.-Kh. Elista Plague Control Station. Elista.

#### Об авторах:

Кузнецов А.А., Поршаков А.М., Матросов А.Н., Слудский А.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru  
Синцов В.К., Осипов В.П. Астраханская противочумная станция. Астрахань.  
Санджиев В.Б.-Х. Элистинская противочумная станция. Элиста

Поступила 21.11.12.

А.И.Логачев<sup>1</sup>, В.М.Корзун<sup>1</sup>, Е.П.Михайлов<sup>2</sup>, Е.Н.Рождественский<sup>2</sup>, С.В.Балахонов<sup>1</sup>

## РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ТРИПТОФАНЗАВИСИМЫХ ВАРИАНТОВ *YERSINIA PESTIS* НА ТЕРРИТОРИИ АЛТАЙСКОГО ГОРНОГО ПРИРОДНОГО ОЧАГА ЧУМЫ

<sup>1</sup>ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»;

<sup>2</sup>ФКУЗ «Алтайская противочумная станция», Горно-Алтайск

Проведен анализ пространственной приуроченности триптофанзависимых вариантов микроба чумы на территории Алтайского горного природного очага. Штаммы чумного микроба, имеющие дополнительную потребность в триптофане, впервые выделены в очаге в 1990 г. С тех пор их изолируют здесь практически ежегодно. С 1990 по 2010 год по питательным потребностям изучено 1166 штаммов (95,2 % от всех выделенных за этот период культур) при этом 140 из них (12,0 %) оказались триптофанзависимыми. Наибольшая частота встречаемости ауксотрофов по триптофану регистрируется на двух территориях Уландрыкского участка очаговости – Большие и Малые Сары-Гобо (93,0 %) и Низ Уландрыка (58,4 %). В целом на Уландрыкском участке очаговости за этот период доля триптофанзависимых изолятов составила 21,6 %. На Тархатинском участке очаговости относительное количество обнаруженных триптофанзависимых штаммов существенно меньше (2,3 %). На Курайском участке очаговости ауксотрофы по триптофану у циркулирующего здесь чумного микроба не зарегистрированы. Полученные данные свидетельствуют, что на каждом из трех участков очаговости Алтайского горного природного очага сформировалась специфическая структура возбудителя чумы по расматриваемому признаку. Это позволяет предположить наличие пространственной неоднородности *Y. pestis* subsp. *altaica* в очаге.

**Ключевые слова:** Алтайский горный природный очаг чумы, *Yersinia pestis*, потребность в триптофане.

A.I.Logachev<sup>1</sup>, V.M.Korzun<sup>1</sup>, E.P.Mikhailov<sup>2</sup>, E.N.Rozhdestvensky<sup>2</sup>, S.V.Balakhonov<sup>1</sup>

## Distribution of Tryptophan-Dependent *Yersinia pestis* Variants in the Altai Mountain Natural Plague Focus

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

Carried out is the analysis of spatial location of tryptophan-dependent variants of plague microbe in the territory of Altai mountain plague natural focus. 1166 *Y. pestis* strains isolated in 1990–2010, were studied as regards nutrient requirements. 140 of them (12 %) were determined as tryptophan-dependent. The highest occurrence of such strains was registered in Ulandryk focal region (21.6 % in average). Among strains isolated in Tarkhatin focal region only 2.3 % were tryptophan-dependent, and in Kuray region they were absent. Thus, the data obtained suggest that spatial heterogeneity of *Y. pestis* subsp. *altaica* in the focus takes place.

**Key words:** Altai mountain natural plague focus, *Yersinia pestis*, tryptophan-dependence.

Известно, что в различных природных очагах чумы возбудитель этой болезни характеризуется своеобразием по питательным потребностям в определенных аминокислотах. В то же время в некоторых очагах распространены варианты чумного микроба как нуждающиеся, так и не нуждающиеся для роста на питательных средах в одной и той же аминокислоте [9, 11].

В Алтайском горном природном очаге чумы циркулирует *Yersinia pestis* subsp. *altaica*, одной из особенностей которого является потребность в определенных аминокислотах (фенилаланине, цистеине, лейцине и аргинине), необходимых для выращивания на синтетических питательных средах. В 1990 г. впервые в Горном Алтае обнаружены штаммы чумного микроба, имеющие дополнительную потребность в триптофане [7]. После этого, триптофанзависимые штаммы (Trp<sup>-</sup>) изолируют здесь практически ежегодно (за исключением 1996 г.). Зависимость от триптофана является стойким признаком и сохраняется при хранении штаммов в лабораторных условиях (срок наблюдения от 5 до 7 лет). Отдельные Trp<sup>-</sup> штаммы алтайского подвида содержали типичные

клоны с низкой частотой [6]. Накопившиеся данные по изучению питательных потребностей возбудителя чумы позволяют проанализировать пространственную приуроченность триптофанзависимых изолятов *Y. pestis* subsp. *altaica* в Алтайском горном природном очаге.

В настоящее время в Алтайском горном природном очаге чумы определены три относительно независимых участка очаговости: Уландрыкский (зараженных зверьков и блох ежегодно обнаруживают с 1961 г.), Тархатинский (культуры возбудителя чумы выделяют с 1972 г.), Курайский (впервые возбудитель изолирован в 1999 г.) [2]. В поддержании эпизоотического процесса в очаге основная роль принадлежит монгольской пищухе (*Ochotona pallasi*) [10]. Территорию каждого из участков очаговости занимает отдельная популяция этого зверька (рис. 1). Границы этих группировок на абсолютно большей части своего протяжения не соприкасаются.

Цель работы – оценка пространственной приуроченности выделения триптофанзависимых изолятов микроба чумы в Алтайском горном природном очаге.

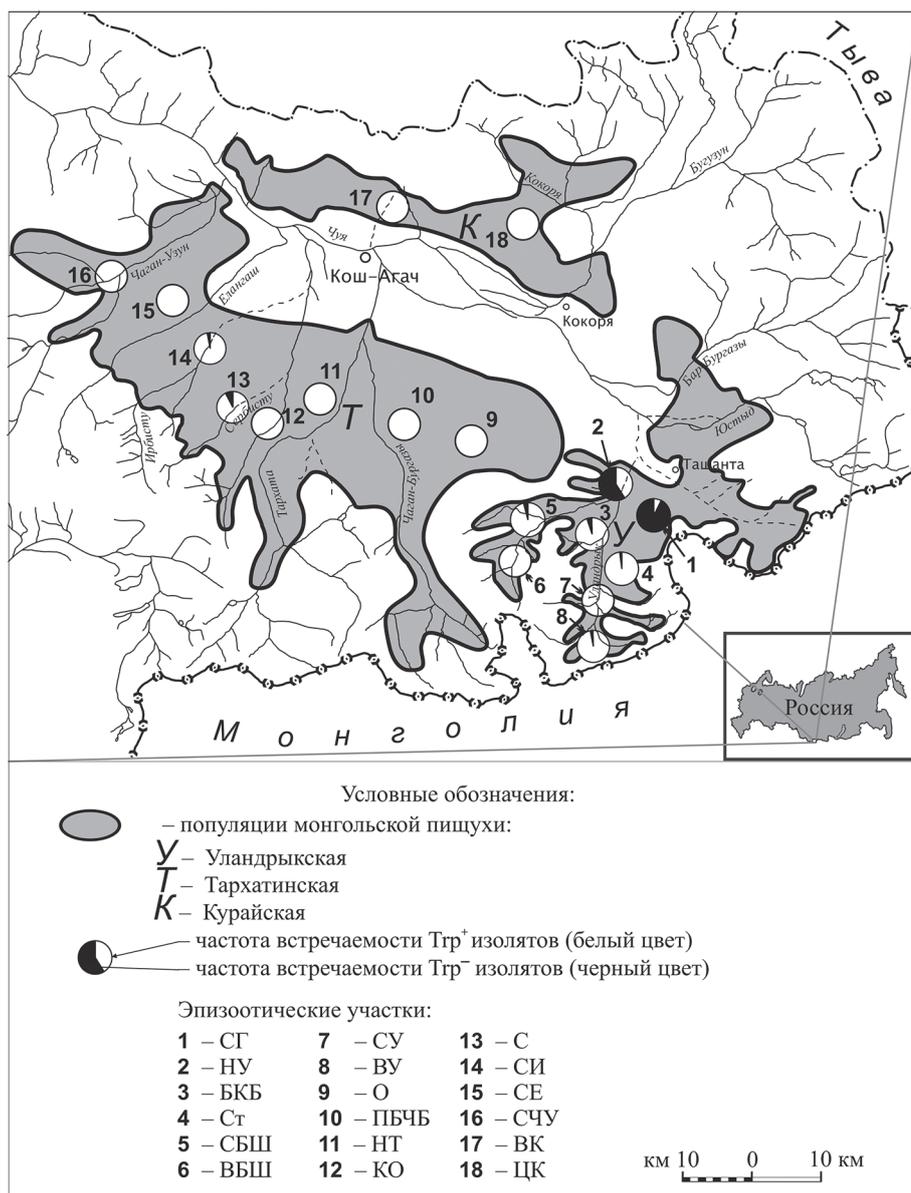


Рис. 1. Частота встречаемости Tgr<sup>+</sup> и Tgr<sup>-</sup> изолятов *Y. pestis subsp. altaica* на отдельных участках эпизоотологического обследования в Алтайском горном природном очаге чумы в 1990–2010 гг. Наименования эпизоотических участков приведены в примечании к таблице

### Материалы и методы

Штаммы *Y. pestis subsp. altaica*, изученные по питательным потребностям, изолированы при эпизоотологическом обследовании Алтайского горного природного очага чумы, проводимом Алтайской противочумной станцией с 1961 по 2010 год. Всего по рассматриваемому показателю исследовано 1410 штаммов.

Изучение штаммов по потребностям в триптофане и отбор мутантов по этому признаку проводили на минимальном агаре Берроуза-Бэйкона [12] с добавлением глюкозы, метабисульфита натрия, фенилаланина, цистеина, лейцина и аргинина. При выращивании Tgr<sup>-</sup> штаммов в среду добавляли триптофан. Посевная доза составляла 5 · 10<sup>2</sup> м.к. Результаты роста культур начинали учитывать с 3–4-х суток, в дальнейшем – в течение 20 сут.

Территория Алтайского горного природного очага чумы разделена на 43 участка эпизоотологического обследования, площадь которых сильно разли-

чается. За все время обследования очага на 23 из них обнаружены проявления эпизоотий. С 1990 г. эпизоотии регистрируют на 18 участках. Используемые в статье наименования эпизоотических участков соответствуют названию рек или урочищ, в районе которых они расположены.

Статистическая обработка результатов проведена стандартными непараметрическими методами [10].

### Результаты и обсуждение

С 1961 по 1989 год в Алтайском горном природном очаге чумы по потребностям в аминокислотах было изучено 244 штамма чумного микроба (22,6 % от всех выделенных культур), из них 120 – с Уландрыкского участка очаговости и 122 – с Тархатинского. При этом все изоляты были типичными для очага, ауксотрофов по триптофану не выявлено.

В 1990 г. впервые на территории очага на двух участках (Низ Уландрыка и Сербисту) обнаружены

Количество изолятов *Y. pestis subsp. alataica*, изученных по питательным потребностям, и число среди них ауксотрофов по триптофану (в скобках) на отдельных эпизоотических участках Алтайского горного природного очага чумы в 1990–2010 гг.

Год	Эпизоотические участки																	
	СГ	НУ	БКБ	Ст	СБШ	ВБШ	СУ	ВУ	О	ПБЧБ	НТ	КО	С	СИ	СЕ	СЧУ	ВК	ЦК
1990	–	9 (5)	10 (0)	–	11 (0)	–	–	2 (0)	–	–	–	2 (0)	3 (3)	39 (0)	–	–	–	–
1991	–	17 (13)	27 (2)	29 (0)	–	–	1 (0)	6 (1)	–	–	3 (0)	–	–	63 (0)	–	–	–	–
1992	–	9 (2)	8 (0)	16 (1)	12 (0)	–	–	1 (0)	–	–	–	–	–	9 (1)	–	–	–	–
1993	–	1 (1)	4 (0)	5 (0)	14 (0)	–	3 (0)	–	–	–	–	–	–	7 (0)	–	–	–	–
1994	–	2 (1)	13 (2)	30 (0)	2 (0)	–	2 (0)	+	–	–	–	–	–	2 (0)	–	–	–	–
1995	–	–	1 (0)	4 (1)	–	–	1 (0)	–	–	2 (0)	–	–	–	1 (0)	–	–	–	–
1996	–	–	–	–	–	–	6 (0)	3 (0)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1997	–	7 (3)	–	–	–	–	10 (0)	3 (0)	–	–	–	–	–	9 (1)	–	–	–	–
1998	3 (3)	17 (10)	–	–	10 (0)	–	–	–	–	1 (0)	–	–	–	7 (0)	–	–	–	–
1999	16 (15)	12 (6)	–	1 (0)	2 (0)	–	2 (0)	–	–	–	–	–	–	1 (1)	–	–	+	–
2000	2 (2)	4 (2)	–	1 (0)	6 (0)	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	6 (0)	1 (0)
2001	5 (5)	12 (6)	–	–	10 (4)	–	–	3 (0)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
2002	3 (3)	2 (2)	12 (0)	25 (0)	10 (0)	–	–	7 (0)	–	5 (0)	–	–	–	10 (0)	1 (0)	–	7 (0)	1 (0)
2003	6 (6)	10 (6)	–	2 (0)	–	–	6 (0)	–	–	1 (0)	–	–	–	3 (0)	1 (0)	10 (0)	4 (0)	–
2004	2 (1)	3 (2)	–	1 (0)	2 (0)	–	–	1 (0)	–	–	–	–	–	20 (0)	–	7 (0)	35 (0)	5 (0)
2005	–	5 (1)	–	1 (0)	1 (0)	–	4 (0)	2 (0)	1 (0)	1 (0)	10 (0)	22 (0)	5 (0)	12 (0)	–	3 (0)	7 (0)	3 (0)
2006	1 (1)	–	–	2 (0)	2 (0)	–	–	3 (0)	–	–	–	31 (0)	25 (0)	12 (0)	–	6 (0)	1 (0)	25 (0)
2007	–	11 (8)	–	1 (0)	–	–	–	5 (0)	–	–	1 (0)	1 (0)	5 (0)	3 (0)	1 (0)	2 (0)	7 (0)	29 (0)
2008	1 (0)	15 (12)	–	–	21 (0)	+	–	–	–	–	2 (0)	–	2 (0)	5 (0)	–	15 (0)	6 (0)	3 (0)
2009	1 (1)	–	6 (0)	2 (0)	9 (0)	–	+	–	–	1 (0)	1 (0)	–	–	6 (3)	–	1 (0)	10 (0)	4 (0)
2010	3 (3)	1 (0)	–	2 (0)	2 (0)	38 (0)	2 (0)	–	–	–	–	1 (0)	4 (0)	3 (0)	–	6 (0)	5 (0)	4 (0)
Всего	43 (40)	137 (80)	81 (4)	122 (2)	114 (4)	38 (0)	37 (0)	36 (1)	1 (0)	11 (0)	17 (0)	57 (0)	44 (3)	212 (6)	3 (0)	50 (0)	88 (0)	75 (0)
% Тр <sup>+</sup>	93,0	58,4	4,9	1,6	3,5	0	0	2,8	0	0	0	0	6,8	2,8	0	0	0	0

Примечания: СГ – Большие и Малые Сары Гобо, НУ – Низ Уландрыка, БКБ – Большой Кочкор-Бас, Ст – Стационар, СБШ – Середина Больших Шибет, ВБШ – Вершина Больших Шибет, СУ – Середина Уландрыка, ВУ – Вершина Уландрыка, О – Оюм, ПБЧБ – Правый берег Чаган-Бургазы, НТ – Низ Тархаты, КО – Кок-Озек, С – Сербисту, СИ – Середина Ирбисту, СЕ – Середина Елангаша, СЧУ – Середина Чаган-Узуна, ВК – Восточная часть Курайского хребта, ЦК – Центральная часть Курайского хребта; «–» – эпизоотия не зарегистрирована; «+» – культуры микроба чумы выделены, но по питательным потребностям не изучены.

ауксотрофы по триптофану (таблица). С 1990 по 2010 год в очаге изолировано 1225 культур, из них по питательным потребностям изучено 1166 штаммов (95,2 % от всех выделенных за этот период культур) при этом 140 из них (12,0 %) оказались триптофан-зависимыми. С Уландрыцкого участка очаговости изучено 608 штаммов, с Тархатинского – 395, с Курайского – 163. Оказалось, что распространение триптофанзависимых вариантов чумного микроба по территории очага крайне неравномерно (таблица, рис. 1).

Анализ частоты встречаемости Тр<sup>+</sup> и Тр<sup>–</sup> изолятов *Y. pestis subsp. alataica* по всему массиву данных, полученных на Уландрыцком участке очаговости, показал, что она колеблется в широких пределах (таблица, рис. 1). Сравнение распределений частот, рассчитанных по объединенным с 1990 по 2010 год выборкам с отдельных эпизоотических участков на этой территории, по критерию хи-квадрат выявило высокую степень их неоднородности. Значение  $\chi^2$  составило 331,87 ( $df = 7; P < 0,001$ ).

Наибольшая частота встречаемости ауксотрофов по триптофану регистрируется на двух эпизоотических участках – Низ Уландрыка, Большие и Малые Сары-Гобо (таблица, рис. 1). За рассматриваемый период на первом из них Тр<sup>–</sup> изоляты обнаруживали в 16 из 17 случаев регистрации здесь эпизоотий (в 2010 г. выделена только одна Тр<sup>+</sup> культура). Более половины культур, изолируемых на участке

Низ Уландрыка, является триптофанзависимыми. Следует подчеркнуть, что эпизоотии в поселениях монгольской пищухи на данном участке стали выявлять после длительного перерыва, связанного с влиянием обширных мероприятий по неспецифической профилактике чумы, с 1990 г. (до этого эпизоотии здесь проявлялись в 1961–1968 гг.).

На участке Большие и Малые Сары-Гобо возбудитель чумы стали выделять с 1998 г. после двадцативосьмилетнего перерыва, связанного с теми же причинами (ранее эпизоотии обнаруживали в 1961–1969 гг.). Здесь с этого времени практически при каждой зарегистрированной эпизоотии выявляются ауксотрофы по триптофану (10 из 11 лет, в 2008 г. выделена всего одна культура, оказавшаяся Тр<sup>+</sup>). Абсолютное большинство изолятов чумного микроба оказались триптофанзависимыми.

В поселениях носителей на четырех эпизоотических участках, находящихся на территории Уландрыцкого участка очаговости, Тр<sup>–</sup> варианты обнаруживаются с малой частотой, на двух участках – Середина Уландрыка и Вершина Больших Шибет – они не выявлены. Эпизоотия на последнем из них впервые зарегистрирована только в 2008 г.

На Тархатинском участке очаговости ауксотрофы по триптофану зарегистрированы на двух из восьми эпизоотических участков. Частота их встречаемости невысокая. По всей этой территории статистически значимых различий между отдельными эпизоотиче-

скими участками по рассматриваемому показателю не выявлено ( $\chi^2 = 7,60$ ;  $df = 7$ ;  $P > 0,05$ ). Обращает на себя внимание тот факт, что после обнаружения Trp<sup>-</sup> изолятов *Y. pestis subsp. altaica* на участке Сербисту в 1990 г. эпизоотии здесь не регистрировали продолжительное время (14 лет), а в последующие годы ауксотрофов по триптофану не выявляли. До 1990 г. эпизоотии на участке были отмечены только в 1972 и 1973 гг. Вместе с этим на соседнем участке Середина Ирбисту данные варианты возбудителя чумы с 1990 г. выделяли четыре года из 18 лет, в которые были зарегистрированы эпизоотии (в последний раз в 2009 г.). При этом только с этого времени на участке Середина Ирбисту стали проявляться регулярные эпизоотии. В целом, можно констатировать, что Trp<sup>-</sup> варианты в небольшом количестве присутствуют в поселениях зверьков в центральной части Тархатинского участка очаговости.

В поселениях носителей на Курайском участке очаговости ауксотрофы по триптофану у циркулирующего здесь чумного микроба не зарегистрированы.

Остановимся на сравнительном анализе частот встречаемости Trp<sup>+</sup> и Trp<sup>-</sup> изолятов *Y. pestis subsp. altaica* на трех участках очаговости. Для этого данные, полученные по эпизоотическим участкам, находящимся в границах отдельного участка очаговости, были объединены (рис. 2). Доля ауксотрофов по триптофану на Уландрыкском участке очаговости составила 21,55 %, на Тархатинском – 2,28 %, на Курайском она равна нулю. Сопоставление распределений частот на этих территориях показало высокую степень неоднородности последних по рассматриваемому показателю. Значение хи-квадрат составило 109,99 ( $df = 2$ ;  $P < 0,001$ ). При этом высокозначимые различия получены между Уландрыкским и Тархатинским участками очаговости ( $\chi^2 = 74,01$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0,001$ ), и при сравнении первого с Курайским ( $\chi^2 = 42,31$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0,001$ ). Различия между Тархатинским и Курайским участками очаговости не достоверны ( $\chi^2 = 3,77$ ;  $df = 1$ ;  $P > 0,05$ ), хотя полученная величина хи-квадрат очень близка к пороговому значению ( $\chi^2_{\text{табл. } 0,05} = 3,84$ ), что позволяет говорить об их некоторой неоднородности.

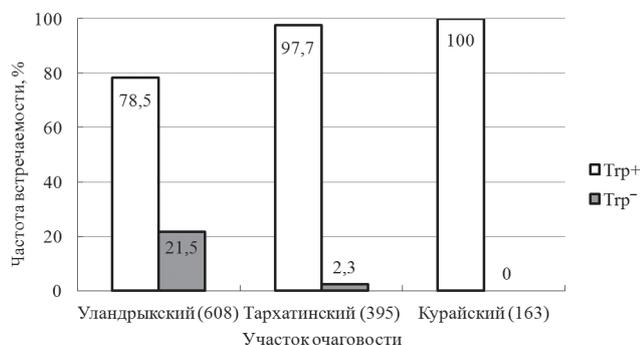


Рис. 2. Встречаемость Trp<sup>+</sup> и Trp<sup>-</sup> изолятов *Y. pestis subsp. altaica* на трех участках очаговости Алтайского горного природного очага чумы в 1990–2010 гг. В скобках – число изученных штаммов

Для обоснованного решения вопроса о вероятности циркуляции Trp<sup>-</sup> вариантов *Y. pestis subsp. altaica* в очаге до 1990 г. проведем сравнительную статистическую оценку фенотипической структуры чумного микроба по рассматриваемому признаку между двумя временными периодами (с 1961 по 1989 и с 1990 по 2010 год) на Уландрыкском участке очаговости. На участках Большие и Малые Сары-Гобо, и Низ Уландрыка до начала регистрации Trp<sup>-</sup> вариантов по потребностям в аминокислотах соответственно изучено 13 и 11 штаммов. На этих двух участках различия в фенотипической структуре чумного микроба по потребности в триптофане между двумя временными отрезками высокозначимы. По первому из них  $\chi^2 = 42,32$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0,001$ , по второму –  $\chi^2 = 13,98$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0,001$ . Также существенна неоднородность во времени и в целом для Уландрыкского участка очаговости ( $\chi^2 = 31,53$ ;  $df = 1$ ;  $P < 0,001$ ). Исходя из этого, можно заключить, что вероятность циркуляции на этой территории триптофанзависимых вариантов до 1990 г. ничтожно мала, и они получили здесь широкое распространение именно с этого времени.

Представленные данные показывают, что в Алтайском горном природном очаге чумы в 1990 г. произошло появление, а в дальнейшем на некоторых территориях распространение триптофанзависимых вариантов *Y. pestis subsp. altaica*.

Появление Trp<sup>-</sup> вариантов чумного микроба наблюдалось одновременно в двух поселениях носителей, расположенных на разных участках очаговости (Уландрыкском и Тархатинском), находящихся примерно на расстоянии 50 км друг от друга. Это свидетельствует о независимом происхождении ауксотрофов по триптофану на данных территориях. Интересно, что выявление новой фенотипической вариации во времени совпало с началом роста эпизоотической активности очага, для которого характерны циклические колебания этого процесса [4], а увеличение внутривидовой фенотипической и генотипической разнообразия как раз характерно для фазы роста численности у многих организмов [3].

Само обнаружение именно Trp<sup>-</sup> вариантов чумного микроба не является неожиданностью. Ауксотрофы по триптофану выявлены и в других природных очагах чумы, характеризующихся кардинально отличающейся биоценотической структурой [8]. Каковы возможные причины появления и распространения ауксотрофов по триптофану в поселениях монгольской пищухи на определенных участках в очаге, а также популяционно-биологические следствия этого феномена?

Появление триптофанзависимых вариантов чумного микроба в очаге могло быть обусловлено двумя причинами: мутационным процессом (в данном случае спонтанными мутациями в локусе, кодирующем синтез триптофана) и «эффектом основателя» (в данном случае попаданием ауксотрофов по триптофану с другой энзоотичной по чуме территории). Если относительно первой можно только констатировать

вероятность этого события, то относительно второй можно провести обоснованный ретроспективный анализ. Как известно, Алтайский горный природный очаг чумы является частью Сайлюгемского очага, расположенного и на территории Монголии. Поселения монгольской пищухи Уландрыкской популяции этого зверька, а также поселения мелких млекопитающих других видов не изолированы от таковых, находящихся в Монголии. Следовательно, нельзя исключить возможность попадания  $\text{Trp}^-$  вариантов чумного микроба из этого района очага. Другой вопрос – были ли до 1990 г. на энзоотичной по чуме территории, находящейся в Монголии, триптофанзависимые фенотипы *Y. pestis subsp. altaica*? К сожалению, мы такими данными не располагаем. Вместе с этим такого заключения нельзя сделать относительно одновременного появления ауксотрофов по триптофану на Тархатинском участке очаговости. Поселения носителей на этой территории изолированы от таковых, расположенных в Монголии, обширными пространствами горной тундры, где отсутствуют условия для жизнедеятельности зверьков. Распространение возбудителя чумы на Тархатинском участке очаговости имело постепенный и закономерный характер, а на участки Сербисту и Середина Ирбисту произошло с находящейся восточнее эпизоотической территории [5]. Стойкое укоренение возбудителя чумы в этом районе очага произошло в период, когда здесь были впервые обнаружены  $\text{Trp}^-$  варианты чумного микроба.

Широкое распространение ауксотрофов по триптофану в поселениях зверьков на определенных частях территории Уландрыкского участка очаговости свидетельствует, что в них сложились благоприятные условия для жизнедеятельности данных вариантов чумного микроба. Преобладание здесь  $\text{Trp}^-$  фенотипов можно объяснить только их адаптивным преимуществом по сравнению с  $\text{Trp}^+$  фенотипами, поскольку последние присутствуют, но замещения ими первых не происходит. На других территориях Уландрыкского участка очаговости селективного преимущества триптофанзависимых вариантов не наблюдается, они циркулируют в небольшом количестве и не получают широкого распространения. Это же характерно и для небольшой части Тархатинского участка очаговости, тогда как на остальной обширной территории ауксотрофы по триптофану отсутствуют. На Курайском участке очаговости таких фенотипов не обнаружено. С одной стороны, они могли сюда не попасть при распространении чумного микроба, скорее всего, с Уландрыкского участка очаговости [5], или же не образоваться в результате мутационного процесса, а с другой – при отсутствии здесь благоприятных условий не получить возможности для жизнедеятельности.

Следствием описанных популяционно-генетических процессов явилось формирование специфической структуры чумного микроба по питательным потребностям в триптофане на каждом из трех участков очаговости.

Для более полной характеристики пространственной неоднородности *Y. pestis subsp. altaica* в Алтайском горном природном очаге чумы, на наш взгляд, здесь уместно привести статистическую оценку данных, опубликованных в работе [1], в которой представлены результаты VNTR-генотипирования штаммов чумного микроба по локусу (5'-СААА-3')<sub>n</sub>. Всего изучено 73 изолята, из них с Уландрыкского участка очаговости 32, Тархатинского – 36 и Курайского – 5. При этом показано, что штаммы с каждого из трех участков очаговости формируют отдельные аллельные варианты, отличающиеся по количеству повторов тетрауклеотида СААА, что выражается в величине образуемого ПЦР-продукта. Нами размеры ампликонов по всей совокупности данных были разделены на три градации: 250–259, 260–269 и 270–279 пар нуклеотидов. Процентное соотношение количества штаммов по этим группам составило для Уландрыкского участка очаговости 66, 34, 0, для Тархатинского – 50, 50, 0, для Курайского – 0, 0, 100. При общем сравнении распределений  $\chi^2 = 74,8$ ;  $df = 4$ ;  $P < 0,001$ . Это свидетельствует о пространственной неоднородности возбудителя в очаге по этому показателю. Различия между Уландрыкским и Тархатинским участками очаговости оказались недостоверны ( $\chi^2 = 1,69$ ;  $df = 1$ ;  $P > 0,05$ ). Курайский же участок очаговости высокозначимо отличался от Уландрыкского ( $\chi^2 = 37,00$ ;  $df = 2$ ;  $P < 0,001$ ) и Тархатинского ( $\chi^2 = 41,00$ ;  $df = 2$ ;  $P < 0,001$ ). Результаты этого анализа показывают, что генотипическая структура по локусу СААА у чумного микроба, циркулирующего на Курайском участке очаговости, явно не схожа с таковой на двух других участках очаговости, которые, в свою очередь, по рассматриваемому показателю довольно близки.

Представленные данные свидетельствуют, что в отдельных популяциях монгольской пищухи и, соответственно, на каждом участке очаговости распространен возбудитель, обладающий отличиями в частоте встречаемости ауксотрофов по триптофану и генотипическими особенностями по одному из локусов. Это позволяет предположить наличие пространственной неоднородности *Y. pestis subsp. altaica* в Алтайском горном природном очаге чумы, которая заключается в том, что на различных территориях циркулируют относительно независимые совокупности возбудителя чумы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балахонов С.В., Шестопалов М.Ю., Романова И.Ф. Результаты VNTR-анализа по локусу (5'-СААА-3')<sub>n</sub> штаммов *Yersinia pestis* из активных природных очагов чумы Сибири. Мол. генет. 2009; 3:14–7.
2. Балахонов С.В., Вержуцкий Д.Б., Корзун В.М., Вершинин Е.А., Немченко Л.С., Чипанин Е.В. и др. Современное состояние природных очагов чумы Сибири. Журн. инф. патол. 2009; 16(3):16–20.
3. Корзун В.М., Гречаный Г.В. Селекционно-генетический контроль динамики численности популяций животных. Байкальский зоол. журн. 2009; 3:110–26.
4. Корзун В.М., Чипанин Е.В., Иннокентьева Т.И., Михайлов Е.П., Денисов А.В. Динамика эпизоотической активности и численности населения монгольской пищухи в Горно-Алтайском природном очаге чумы. Пробл. особо опасных инф. 2010;

4(106):13–8.

5. Корзун В.М., Чипанин Е.В., Иннокентьева Т.И., Михайлов Е.П., Фомина Л.А., Сотникова Т.В. и др. Расселение блохи *Ctenophyllus hirtiscrus* и распространение эпизоотий чумы в Горном Алтае. *Паразитология*. 2007; 41(3):206–17.

6. Логачев А.И., Балахонов С.В., Белькова С.А., Шестопалов М.Ю., Михайлов Е.П., Асташин Ю.М. Биологические свойства триптофанзависимых штаммов чумного микроба, изолированных в Горном Алтае. *Бюл. ВСНЦ СО РАМН*. 2004; 2(1):107–11.

7. Логачев А.И., Балахонов С.В., Ивженко Н.И., Асташин Ю.М., Вершинина Т.И., Хабаров А.В. и др. Особенности штаммов чумного микроба, выделенных в Горном Алтае в 1990–1992 годах, на фоне обострения эпизоотического процесса. В кн.: *Проблемы природно-очаговых и зоонозных инфекций в Сибири и на ДВ*. Чита; 1993. С. 97–9.

8. Мартиневский И.Л., Степанов В.М. О штаммах чумного микроба, зависящих от триптофана, и их обратных мутантах. *Пробл. особо опасных инф.* 1972; 3(25):104–8.

9. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. *Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири*. М.; 2004. 192 с.

10. Рокитский П.Ф. *Биологическая статистика*. Минск; 1973. 320 с.

11. Чумакова И.В., Козлов М.П. Возбудитель чумы как элемент системы эпизоотического процесса. Ставрополь; 2008. 248 с.

12. Burrows T.G., Bacon G. The effects of lose of different virulence determinants on the virulence and immunogenicity of strains of *Pasteurella pestis*. *Brit. J. Exp. Patol.* 1960; 41:38–44.

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

1. Balakhonov S.V., Shestopalov M.Yu., Romanova I.F. [Results of the VNTR-analysis in a locus (5'-NAAA-3')n of strains *Yersinia pestis* from the active natural foci of plague of Siberia]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2009; 3:14–7.

2. Balakhonov S.V., Verzhutsky D.B., Korzun V.M., Vershinin E.A., Nemchenko L.S., Chipanin E.V. et al. [Current state of natural plague foci in Siberia]. *Zh. Inf. Patol.* 2009; 16(3):16–20.

3. Korzun V.M., Grechany G.V. [Selective genetic control over animals abundance dynamics]. *Baikal'sky Zool. Zh.* 2009; 3:110–26.

4. Korzun V.M., Chipanin E.V., Innokent'eva T.I., Mikhailov E.P., Denisov A.V. [Dynamics of epizootic activity and abundance of Mongolian pika in the Altai mountain natural plague focus]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2010; (106):13–8.

5. Korzun V.M., Chipanin E.V., Innokent'eva T.I., Mikhailov E.P., Fomina L.A., Sotnikova T.V. et al. [Dispersal of the flea *Ctenophyllus hirtiscrus* and spreading of plague epizooties in Gorny Altai]. *Parazitologia*. 2007; 41(3):206–17.

6. Logachev A.I., Balakhonov S.V., Bel'kova S.A., Shestopalov M.Yu., Mikhailov E.P., Astashin Yu.M. [Biological properties of tryptophan-dependent strains of plague microbe isolated in Gorny Altai]. *Byul. RAMN* 2004; 2(1):107–11.

7. Logachev A.I., Balakhonov S.V., Ivzhenko N.I., Astashin Yu.M., Vershinin T.I., Khabarov A.V. et al. [Properties of plague microbe strains isolated in Gorny Altai in 1990–1992, in acute epizootic process]. In: [Problems of Natural Focal and Zoonotic Infections in Siberia and Far East]. Chita; 1993. P. 97–9.

8. Martinevsky I.L., Stepanov V.M. [About tryptophan-dependent plague microbe strains, and their reverse mutants]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1972; (25):104–8.

9. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Natural Plague Foci in the Caucasus, Caspian Sea Region, Middle Asia and Siberia]. M.; 2004. 192 p.

10. Rokitsky P.F. [Biological Statistics]. Minsk; 1973. 320 p.

11. Chumakova I.V., Kozlov M.P. [Plague Agent as an Element of Epizootic Process System]. Stavropol; 2008. 248 p.

#### Authors:

Logachev A.I., Korzun V.M., Balakhonov S.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russia. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Mikhailov E.P., Rozhdestvensky E.N. Altai Plague Control Station. Gorno-Altai, Russia.

#### Об авторах:

Логачев А.И., Корзун В.М., Балахонов С.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Михайлов Е.П., Рождественский Е.Н. Алтайская противочумная станция. Горно-Алтайск.

Поступила 30.11.11.

А.А.Лопатин, Е.В.Куклев, В.А.Сафронов, А.С.Раздорский, Л.В.Самойлова, В.П.Топорков

## ВЕРИФИКАЦИЯ МАТЕМАТИЧЕСКИХ МОДЕЛЕЙ ПРИ ЧУМЕ

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

Математическое моделирование и прогнозирование эпидемического процесса при инфекционных болезнях является одним из перспективных направлений эпидемиологических исследований. В этих целях в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» совместно с лабораторией эпидемиологической кибернетики ФБГУ НИИЭМ имени Н.Ф.Гамалеи разработан комплекс математических моделей эпидемического процесса при чуме типа SEIRF. Для проверки работоспособности созданных математических моделей развития эпидемического процесса при чуме были выбраны данные из описания вспышки чумы в поселке Авань Аральского района Кызыл-Ординской области Казахской ССР 1945 г. Анализ данных позволил получить начальные и граничные условия для моделирования эпидемического процесса. В ходе моделирования использовались математические модели эпидемического процесса при чуме с различными механизмами передачи для каждого эпидемического очага соответственно ретроспективным данным. Полученные данные проанализированы при помощи аналитической платформы Deductor 5.1. Анализ выявил наличие сильной положительной корреляционной связи между ними –  $r = +0,71$ . Полученные результаты свидетельствуют о работоспособности созданных математических моделей с высокой достоверностью, что позволяет рекомендовать их использование для получения количественных характеристик прогноза развития эпидемического процесса при чуме с различными механизмами передачи инфекции с учетом проведения основных противоэпидемических мероприятий.

*Ключевые слова:* вспышка чумы, математическая модель, эпидемический процесс.

A.A.Lopatin, E.V.Kuklev, V.A.Safronov, A.S.Razdorsky, L.V.Samoilova, V.P.Toporkov

### Verification of Mathematical Models of Plague

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Mathematic modeling and prognostication of infectious diseases epidemic process is a promising trend of epidemiologic investigations. The complex of mathematic models (SEIRF type) of plague epidemic process was developed for this purpose by the Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" and laboratory of epidemiologic cybernetics of N.F.Gamaleya Institute for Epidemiology and Microbiology. The data on the plague outbreak in 1945 in the rural settlement Avan' (Aral region of Kzyl-Orda district of Kazakh SSR) were used to test working efficiency of this complex. The data analysis permitted to obtain the starting and boundary conditions for epidemic process modeling. In the process of modeling the mathematical models of epidemic process of plague with various ways of infection transmission for each epidemic focus in regard with historical data were used. The data were processed by the analytical platform Deductor 5.1. Identified was strong positive correlation between estimated and historical data –  $r = +0,71$ . The results received testify that mathematic models are effective and give high degree of confidence. They can be used to receive quantitative characteristics of prognosis for plague epidemic process development with different transmission routes considering that anti-epidemic measures have been taken.

*Key words:* plague outbreak, mathematic model, epidemic process.

Математическое моделирование и прогнозирование эпидемического процесса при инфекционных болезнях является одним из перспективных направлений эпидемиологических исследований, поскольку позволяет получать результаты, которые невозможно выявить при использовании других методов, минимизировать затраты на изучение эпидемического процесса, а также заблаговременно выявить общие закономерности роста заболеваемости и наметить пути их эффективной профилактики.

В этих целях в РосНИПЧИ «Микроб» совместно с лабораторией эпидемиологической кибернетики ФБГУ НИИЭМ имени Н.Ф.Гамалеи разработан комплекс математических моделей эпидемического процесса при чуме типа SEIRF. Математические модели имеют вид системы интего-дифференциальных

уравнений в частных производных с начальными и граничными условиями.

Целью работы является проверка работоспособности созданных математических моделей развития эпидемического процесса при чуме.

### Материалы и методы

В работе использованы архивные материалы описания вспышки чумы в поселке Авань Аральского района Кызыл-Ординской области Казахской ССР в 1945 г. Ретроспективный эпидемиологический анализ данной вспышки чумы показал следующее.

Общее население Аваньского аулсовета – 1465 чел. Всего заболело чумой 175 чел., из них погибло от чумы или осложнений 127. Первые боль-

Таблица 1

Характеристика отдельных эпидемических очагов чумы в Аванском аулсовете 1945 г.

Название эпидемического очага	Общее число заболевших	Не госпитализированные					Госпитализированные					% госпитализации
		Всего больных	Умерло		Выздоровление		Всего больных	Умерло		Выздоровление		
			абс. число	%	абс. число	%		абс. число	%	абс. число	%	
Акбасты *	106	86	68	79,1	18	20,9	20	6	30,0	14	70,0	18,9
Авань	48	18	17	94,4	1	5,6	30	17	56,7	13	43,3	62,5
Ак-Кудук	15	11	11	100,0	0	0,0	4	3	75,0	1	25,0	26,7
Бюургунды	6	1	1	100,0	0	0,0	5	4	80,0	1	20,0	83,3
<i>Всего</i>	175	116	97	83,6	19	16,4	59	30	50,8	29	49,2	33,7

\* Заболеваемость в ауле Улькункуль включена в данные по аулу Акбасты.

ные зарегистрированы: 2 августа 1945 г. в поселке Акбасты, 8 августа – Улькункуль, 10 августа – Ак-Кудук. Летальный исход наступал в среднем на 3–4-е сутки заболевания. На основе поименного списка больных была вычислена средняя продолжительность жизни заболевшего чумой (максимально – 13, минимально – 1 день, средняя арифметическая – 4 дня, мода и медиана – 3 дня, стандартное отклонение – 2,3, дисперсия – 5,39). В течение эпидемического процесса отмечено 2 пика, связанных с резким подъемом числа заболевших и умерших при легочной форме чумы. Эффективность мероприятий по изоляции больных и контактных составила 34%. Было госпитализировано 59 из 175 заболевших человек. Точные сроки начала госпитализации больных и контактных не везде установлены. Есть данные, что массовые противоэпидемические мероприятия были начаты с 29 сентября 1945 г. Общая смертность при чуме составила 72,5%. Среди не госпитализированных – 84%, госпитализированных – 51%. Вспышка чумы была зарегистрирована в 5 аулах: Акбасты, Авань, Ак-Кудук, Бюургунды, Улькункуль.

Характеристики по отдельным эпидемическим очагам приведены в табл. 1. Отмечено большое количество тяжелых форм заболевания, которые расценивались как септические формы чумы.

Особенностью данной вспышки чумы были причины ее развития, связанные с различными механизмами передачи инфекции. Контактный – при заражении в результате прирезки и разделки туши верблюда в поселке Акбасты с последующим развитием событий в поселке Ак-Кудук, затем – в поселке

Авань. Аспирационный механизм передачи отмечен только для острова Бюургунды. Трансмиссивный – через блох в природном очаге (зарегистрированы эпизоотические проявления чумы на территории Аванского аулсовета) и через блох жилья человека (блохи зафиксированы практически во всех домах).

Моделирование проводили с использованием методологии, разработанной доктором технических наук Б.В.Боевым на основании данных, собранных в РосНИПЧИ «Микроб». В работе использовали разработанную нами математическую модель типа  $SE_2I_3RF$ , где S – стадия восприимчивости к чуме;  $E_1$  – инкубационный период (незаразный);  $E_2$  – инкубационный период (заразный);  $I_1$  – легкая клиническая форма чумы;  $I_2$  – клиническая форма чумы средней тяжести;  $I_3$  – тяжелая клиническая форма чумы; R – стадия постинфекционного иммунитета чумы; F – стадия погибших от чумы, как наиболее точно описывающая эпидемический процесс при чуме.

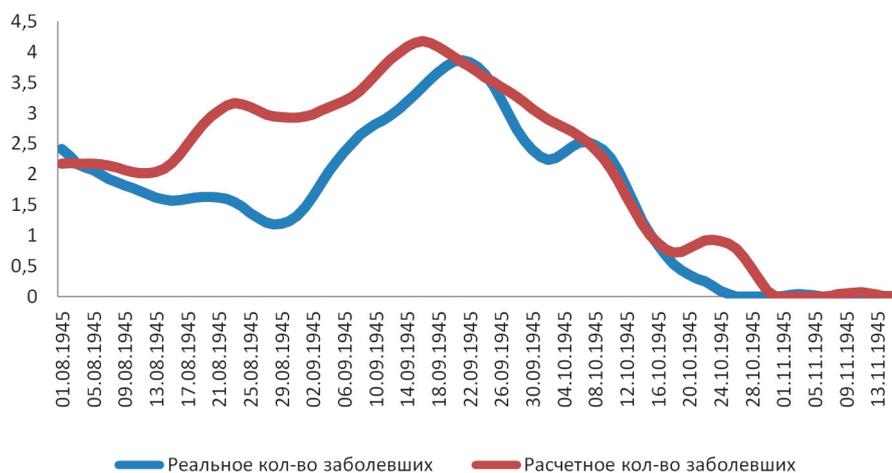
Начальными условиями моделирования были: число восприимчивых лиц в группе риска после момента заражения; число лиц в инкубационном периоде (незаразная и заразная стадия); число новых случаев заболевания чумой (после заразной стадии инкубационного периода); число больных с различными (три) клиническими формами чумы; число людей, переболевших чумой; число больных, погибших от чумы или ее осложнений.

При моделировании отдельных эпидемических очагов чумы использовали установленные из описания вспышки начальные и граничные условия, отдельно – для моделирования распространения по

Таблица 2

Соотношение фактических и расчетных данных по отдельным эпидемическим очагам чумы

Эпидемический очаг	Расчетные значения		Фактические данные	
	Заболело	Умерло	Заболело	Умерло
Акбасты	128	70	97	68
Авань	63	34	48	34
Ак-Кудук	26	21	15	14
Бюургунды	10	6	6	5
Улькункуль	16	10	9	6
<i>Всего</i>	243	141	175	127



Сравнение результатов общего числа заболевших чумой по расчетным и фактическим данным

типу бубонной и легочной чумы. Для каждого очага отдельно определены условия: численность населения, интенсивность выхода и выноса возбудителя из очага, начальное число лиц в инкубации, летальность, доля восприимчивых, время моделирования эпидемического процесса, процент, интенсивность и задержка изоляции. Варьирование для отдельных очагов производилось только в показателе интенсивности контактов.

Полученные результаты подвергнуты обработке при помощи аналитической платформы Deductor 5.1 [2], а также общепринятых статистических методов [3].

### Результаты и обсуждение

Как следует из анализа табл. 2, составленной только по итоговым показателям в отдельных эпидемических очагах чумы, совпадение результатов по общему числу заболевших равняется 72,0 %, по смертности – 90,1 %.

Проведенный полный корреляционный анализ данных [1, 3] выявил наличие сильной положительной корреляционной связи –  $r^2 = 0,5$ ,  $r = +0,71 \pm 0,045$ , что наглядно демонстрирует рисунок.

Анализ результатов с помощью метода сглаживания рядов Вайвлет, преобразования (глубина разложения 3, порядок вайвлета б) и понедельной агрегации данных также показал наличие сильной положительной корреляционной связи –  $r = +0,71$ .

Таким образом, проведена верификация комплекса математических моделей эпидемического процесса при чуме на примере вспышки чумы в поселке Авань Аральского района Кызыл-Ординской области Казахской ССР в 1945 г., отличавшейся наличием различных механизмов передачи инфекции.

В результате моделирования эпидемического процесса при чуме с учетом особенностей по отдельным эпидемическим очагам был получен ряд расчетных данных динамики заболеваний чумой.

Полученные расчетные данные были проанализированы в сравнении с фактическими, что выявило наличие сильной положительной корреляционной связи между ними –  $r = +0,71 \pm 0,045$ .

Полученные результаты свидетельствуют о работоспособности созданных математических моделей эпидемического процесса при чуме с высокой достоверностью, что позволяет рекомендовать их использование для получения количественных характеристик прогноза развития эпидемического процесса при чуме с различными механизмами передачи инфекции с учетом проведения основных противоэпидемических мероприятий.

Работа выполнена по государственному контракту № 74-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. Бессмертный Б.С., Ткачева М.Н. Статистические методы в эпидемиологии. М.: Медгиз; 1961. 203 с.
2. Кацко И.А., Паклин Н.Б. Практикум по анализу данных на компьютере. М.: КолосС; 2009. 278 с.
3. Плохинский Н.А. Биометрия. М.: Изд-во Моск. ун-та; 1970. 336 с.

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

1. Bessmertny B.S., Tkacheva M.N. [Statistical Methods in Epidemiology]. M.; 1961. 203 p.
2. Katsko I.A., Paklin N.B. [Training Workshop for Data Analysis on Computer]. M.; 2009. 278 p.
3. Plokhinsky N.A. [Biometry]. M.; 1970. 336 p.

### Authors:

Lopatin A.A., Kouklev E.V., Safronov V.A., Razdorsky A.S., Samoiloва L.V., Toporkov V.P. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrap@microbe.ru

### Об авторах:

Лопатин А.А., Куклев Е.В., Сафронов В.А., Раздорский А.С., Самойлова Л.В., Топорков В.П. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Поступила 28.12.11.

Л.Ф.Низоленко, А.Г.Бачинский

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ФАКТОРА ИЗОЛЯЦИИ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ РАЗВИТИЯ ЭПИДЕМИИ НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ В МЕГАПОЛИСЕ***ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово*

В последние годы вновь признан актуальным такой фактор риска, как целенаправленное инфицирование больших групп людей возбудителями особо опасных инфекций в результате биотеррористических актов. В связи с этим важным моментом является создание математических моделей для прогнозирования последствий таких событий. С использованием разработанной в ГНЦ ВБ «Вектор» модели сравниваются сценарии развития и последствия эпидемии натуральной оспы в большом городе при наличии разного числа мест в изоляторах высокого уровня защиты для разного числа лиц, инфицированных в результате террористического акта.

Результаты моделирования позволяют сделать вывод, что недостаток какого-то одного, даже столь важного ресурса, может быть частично скомпенсирован комплексом других противоэпидемических мероприятий (массовая вакцинация, выявление контактных лиц и их наблюдение). Таким образом, при планировании противоэпидемических мероприятий ресурсные ограничения должны учитываться в комплексе.

*Ключевые слова:* эпидемия, математическая модель, оспа.

L.F.Nizolenko, A.G.Bachinsky

**Evaluation of the Effect of Isolation in the Modeling of Smallpox Epidemic Development in Megacity***State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo*

Deliberate infecting of large groups of people with particularly dangerous infectious diseases agents as a result of bioterrorist attacks is still considered as an actual risk factor. Scenarios of development and aftermaths of smallpox epidemic in a large city are compared using mathematical model developed in SRC VB "Vector". These scenarios provide that different number of people have become infected with smallpox and capacities of isolation wards with high level of protection vary. The results of the modeling suggest that lack of the one, even very important resource, can be partially compensated by implementing other counter-epidemic measures (large-scale vaccination, detection of the contacts and their monitoring). Thus when planning counter-epidemic measures one must take into consideration the resource limitations as a whole.

*Key words:* epidemic, mathematical model, smallpox.

Современная политическая ситуация в мире не позволяет исключить такой фактор риска, как целенаправленное инфицирование больших групп людей возбудителями особо опасных инфекций, в частности натуральной оспы, в результате биотеррористических актов. В связи с этим важным моментом является разработка математических моделей для прогнозирования последствий таких событий и оценка эффективности возможных противоэпидемических мероприятий [4]. Особенно актуальна эта задача для крупных городов с многомиллионным населением, таких как Москва и Санкт-Петербург.

Эффективность противоэпидемических мер сильно зависит от доступности ресурсов для их осуществления. В Санкт-Петербурге, например, больница им.С.П. Боткина является единственным инфекционным стационаром, обеспечивающим эпидемиологическое благополучие города [5]. Общее число мест – 1200, из них только 400 боксированных [2]. Помимо нее, имеется 20 противотуберкулезных диспансеров. Таким образом, в случае вспышки натуральной оспы в городе, по самым оптимистическим предположениям, будет доступно не более 500–600 мест в изоляторах высокой степени защиты, поскольку возникновение эпидемии столь опасного заболевания, как натуральная оспа, не отменяет суще-

ствование других инфекций. В данном исследовании оценивается, будет ли этого достаточно в случае массового заражения и показано влияние дефицита мест на развитие эпидемии.

**Материалы и методы**

В ГНЦ ВБ «Вектор» разработана математическая модель типа SEIRF, названная так по обозначению подклассов, на которые разделяется популяция во время эпидемии: чувствительные неинфицированные (Susceptible), инфицированные в инкубационном периоде (Exposed), инфекционные больные (Infectious), выздоровевшие (Recovered) и умершие (Fatal). Модель описывает динамику эпидемии натуральной оспы с учетом комплекса мер противодействия. Она представляет собой описание состояний популяции в момент времени  $t$  и правила перехода к состоянию в момент времени  $t+1$ . Основной отличительной особенностью модели является то, что она в явном виде использует данные о характере течения заболевания: сведения об изменении вероятности передачи инфекции, постановки правильного диагноза, вероятности госпитализации и смертности по мере развития заболевания. Учитывается также ряд дополнительных особенностей заболевания и чув-

ствительных популяций [1].

Для противодействия распространению болезни предусматриваются три уровня противоэпидемических мероприятий (ПЭМ), вступающих в силу поочередно и заключающихся в следующем:

- ПЭМ-1 (мягкий режим) – изоляция больных, госпитализированных ранее с неправильным диагнозом, а также самостоятельно обратившихся за медицинской помощью;

- ПЭМ-2 (умеренный режим) – изоляция лиц, контактировавших с выявленными больными;

- ПЭМ-3 (жесткий режим) – активный поиск и изоляция больных и контактных лиц.

Также осуществляется вакцинация группы риска (медработники, участвующие в ликвидации эпидемии) и массовая вакцинация населения.

В модели предусмотрен учет разнообразных ограничений по ресурсам, таким как число медицинских бригад, проводящих поиск и изоляцию/наблюдение больных и контактных лиц, число пунктов вакцинации, запас доз вакцины для массовой вакцинации, число мест в провизорных госпиталях, запасы доз лекарства и т.д.

### Результаты и обсуждение

Ранее с использованием разработанной модели анализировалось влияние на развитие эпидемии сроков применения и интенсивности мер противодействия [1]. В данном исследовании мы перешли к оценке уязвимости населения, вызванной недостатком ресурсов для осуществления этих мер.

Проведены расчеты динамики вспышки натуральной оспы и сравнения ее развития и последствий при полном отсутствии дефицита каких-либо ресурсов и при наличии от 0 до 1500 мест в изоляторах высокого уровня защиты для разного числа лиц, инфицированных одновременно (например, в результате террористического акта). При моделировании были заданы следующие условия:

1. Численность населения 6,5 млн человек.

2. Коллективный иммунитет к заболеванию – 10 %, то есть на уровне врожденной невосприимчивости. Столь низкий уровень иммунитета задан потому, что прививочный иммунитет против оспы, по некоторым сообщениям в литературе, не является пожизненным. Спустя 1 год после успешной вакцинации заболевает оспой 1 на 1000 привитых, спустя 3 года – 1 на 200, 10 лет – 1 на 8, 20 лет – может заболеть до 50 % привитых. Летальные исходы наблюдаются только среди привитых более 5 лет назад [3]. На сайте Центра по контролю и профилактике заболеваний США высказывается мнение, что высокий уровень иммунитета обеспечивается вакцинацией не более 3–5 лет [8]. По самым оптимистическим оценкам, иммунитет сохраняется до 20–30, иногда до 50 лет [4, 6]. Учитывая, что массовая вакцинация не проводилась с 1980 г., то есть более 30 лет, мы вынуждены были ориентироваться на самый низкий

уровень коллективного иммунитета.

3. Среднее число инфицированных от одного больного  $R_0 = 8$ . Это несколько больше оценок, полученных при описании вспышек оспы в середине прошлого века в европейских городах ( $R_0 \approx 5$ ) [1, 7]. Предполагается, что с того времени увеличилась плотность населения, а также интенсивность контактов людей друг с другом.

4. Продолжительность расчетов – 100 дней.

5. Противоэпидемические мероприятия начинаются через 2 дня после того, как число больных в стадии сыпи достигает 30 человек.

6. Поскольку в данном исследовании оценивалось влияние недостатка мест для изоляции больных, остальные ресурсы считались неограниченными.

Проведены расчеты для нескольких сценариев развития событий. Основные результаты представлены в таблице.

**Сценарий 1.** Изначально инфицировано от 100 до 500 чел. Мягкий режим ПЭМ вступает в силу на 14–18-й день после террористического акта, в зависимости от исходного числа инфицированных при выполнении условия 5 (30 больных в стадии сыпи). На этом этапе велика вероятность постановки неправильного диагноза. Поэтому умеренный режим и вакцинация групп риска начинаются достаточно поздно – на 21–25-й день, массовая вакцинация – на 23–28-й, а жесткий режим ПЭМ – на 26–30-й. В случае 500 первично инфицированных на 23-й день рас-

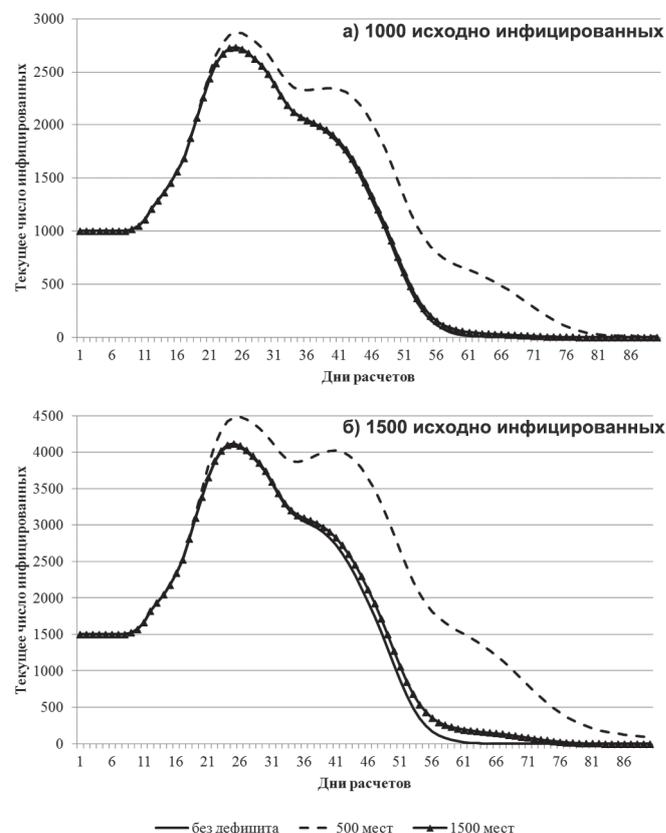


Рис. 1. Сценарии развития вспышки натуральной оспы при 1000 (а) и 1500 (б) первично инфицированных и разным количестве доступных мест в изоляторе высокой степени защиты

Влияние числа мест в изоляторе на состояние вспышки натуральной оспы к 100-му дню расчетов при разном количестве первично инфицированных

Условия расчетов	Число первично инфицированных					
	500 чел.		1000 чел.		1500 чел.	
	инфицированы	умерли	инфицированы	умерли	инфицированы	умерли
Без дефицита ресурсов	1963	418	3067	619	4598	928
Мест в изоляторе						
1500	1963	418	3104	624	4797	962
500	2225	461	3869	752	6911	1319
0	4775	1045	6609	1322	9896	1980

четов 500 мест в изоляторе становится недостаточно, но дефицит не оказывает существенного влияния на развитие эпидемии.

**Сценарий 2.** Изначально инфицировано 1000 чел. Мягкий режим ПЭМ вступает в силу на 14-й день после террористического акта. Умеренный режим и вакцинация групп риска начинаются на 16-й день, массовая вакцинация – на 18-й, а жесткий режим ПЭМ – на 20-й, то есть развертывание противоэпидемических мероприятий происходит очень оперативно. Дефицит 1500 мест в изоляторе начинает ощущаться на 22-й день расчетов, 500 – на 17-й. И если в первом случае это практически не влияет на развитие эпидемии, то во втором различия становятся заметны (таблица, рис. 1,а).

**Сценарий 3.** Изначально инфицировано 1500 чел. Противоэпидемические мероприятия осуществляются в том же режиме, что в сценарии 2, поскольку более оперативное развертывание ПЭМ возможно лишь в том случае, если о факте инфицирования стало известно сразу, а такое предположение не выдвигалось. Недостаток 1500 мест в изоляторе начинает ощущаться на 20-й день расчетов. Если же мест всего 500, дефицит возникает на 16-й день, и в этом случае его влияние на сценарий развития и последствия эпидемии очевидны (таблица, рис. 1, б).

Из данных таблицы видно также, что полное отсутствие мест изоляции существенно увеличивает социальные потери от вспышки: число инфицированных возрастает более чем в 2 раза по сравнению со сценарием, где дефицита ресурсов нет.

Чтобы более наглядно оценить влияние дефицита мест для изоляции на развитие эпидемии, введено понятие «уязвимости»  $P_x$ :

$$P_x = (N_x - N_0)/N_0,$$

где  $N_0$  – значение некоторой величины (например, число инфицированных, число умерших и пр.) к моменту окончания расчета в отсутствие дефицита ресурса,  $N_x$  – значение той же величины при ограниченном ресурсе «X».

На рис. 2 отображена зависимость этого параметра от числа доступных мест в изоляторе. Видно, что при массовом заражении для успешного противодействия эпидемии достаточно, чтобы число мест в изоляторе было сравнимо с числом первично инфицированных.

Однако, когда оно становится заметно меньше (приблизительно на 200), уязвимость резко возрастает.

Многочисленные расчеты сценариев вспышек натуральной оспы, проведенные ранее [1], показывают, что именно своевременное выявление и изоляция больных является основным фактором, обеспечивающим эффективность мер противодействия. С учетом этих данных, влияние дефицита мест изоляции на уязвимость населения выглядит неожиданно слабым. Однако стоит напомнить, что все остальные ресурсы в рамках данного исследования считались неограниченными. Беспрепятственно осуществлялась своевременная массовая вакцинация, а также выявление контактных лиц, их наблюдение и лечение в случае проявления болезни, что существенно

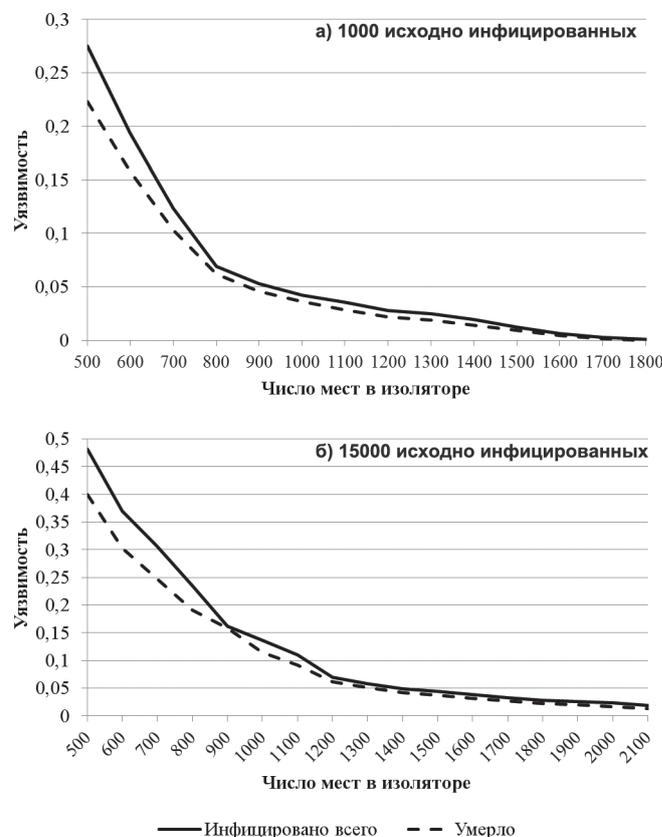


Рис. 2. Зависимость «уязвимости» населения при вспышке натуральной оспы от числа доступных мест в изоляторах высокого уровня защиты при 1000 (а) и 1500 (б) первично инфицированных

сокращает скорость распространения инфекции и частично компенсирует недостаток мест изоляции.

Результаты моделирования различных сценариев развития эпидемии натуральной оспы в случае массового заражения и в условиях дефицита мест строгой изоляции позволяют сделать вывод, что недостаток какого-то одного ресурса может быть частично скомпенсирован другими противоэпидемическими мероприятиями (массовая вакцинация, выявление контактных лиц и их наблюдение). Таким образом, анализ влияния на развитие эпидемии степени доступности необходимых для этого ресурсов по отдельности полезен только для анализа модели. При планировании же противоэпидемических мероприятий ресурсные ограничения должны учитываться в комплексе.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Бачинский А.Г.* Математическая модель локальной эпидемии натуральной оспы с учетом мер противодействия и ресурсных ограничений. В кн.: 30 лет после ликвидации оспы: исследования продолжаются. Кольцово: Информ-Экспресс; 2010. С. 253–80.
2. *Грекова Т.И., Голиков Ю.П.* Медицинский Петербург. Очерки, адресованные врачам и их пациентам. СПб: Фолио-Пресс; 2001. 416 с.
3. *Ладный И.Д.* Ликвидация оспы и предупреждение ее возврата. М.: Медицина; 1985. 221 с.
4. *Cohen J.* Bioterrorism. Smallpox vaccinations: how much

protection remains? *Science*. 2001; 294:985.

5. *Ferguson N.M., Keeling M.J., Edmunds W.J., Gani R., Grenfell B.T., Anderson R.M. et al.* Planning for smallpox outbreaks. *Nature*. 2003; 425:681–5.

6. *Hsieh S.M., Pan S.C., Chen S.Y., Huang P.F., Chang S.C.* Age distribution for T cell reactivity to vaccinia virus in a healthy population. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 38:86–9.

7. *Gani R., Leach S.* Transmission potential of smallpox in contemporary populations. *Nature*. 2001; 414:748–51.

8. Questions and Answers About Post-event Smallpox Vaccination [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention [updated 13 Mar 2009; cited 22 Jun 2011]. Available from: [http://emergency.cdc.gov/agent/smallpox/faq/post\\_event.asp](http://emergency.cdc.gov/agent/smallpox/faq/post_event.asp).

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

1. *Bachinsky A.G.* [Mathematical model of the local smallpox epidemic, taking into consideration countermeasures and resource limitations]. In: [30 Years after Smallpox Eradication: Investigations are in Progress]. Koltsovo; 2010. P. 253–80.

2. *Grekova T.I., Golikov Yu.P.* [Outlines for Doctors and Their Patients]. In: [Medical Petersburg]. SPb.; 2001. 416 p.

3. *Ladny I.D.* [Elimination of Smallpox and Prevention of Its Return]. M.; 1985. 221 p.

#### Authors:

*Nizolenko L.F., Bachinsky A.G.* State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector”. Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia. E-mail: [vector@vector.nsc.ru](mailto:vector@vector.nsc.ru)

#### Об авторах:

*Низоленко Л.Ф., Бачинский А.Г.* Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл, п. Кольцово. E-mail: [vector@vector.nsc.ru](mailto:vector@vector.nsc.ru)

Поступила 25.08.11.

Ю.В.Рыжков, М.Ю.Соловьев

**УПРАВЛЕНИЕ РИСКАМИ В САНИТАРНО-КАРАНТИННОМ КОНТРОЛЕ***Управление Роспотребнадзора по Ростовской области, Ростов-на-Дону*

Глобализация мировой экономики и изменения в политико-экономической сфере России являются предпосылками к формированию новой методики санитарно-карантинного контроля, основанного на выявлении риска для санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Проведен анализ каждого из возможных рисков с оценкой вероятности событий, представляющих опасность для санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

*Ключевые слова:* санитарно-карантинный контроль, риски для санитарно-эпидемиологического благополучия, оценка риска.

Yu.V.Ryzhkov, M.Yu.Solov'ev

**Framework of the Risk Management System in the Sphere of Sanitary-Quarantine Control***Rospotrebnadzor Administration in the Rostov Region, Rostov-on-Don*

Globalization of world economy and politico-economical changes in Russia are the preconditions for the formation of new sanitary-quarantine control methodology based on the identification of risks for sanitary-epidemiological welfare of the population. Considered this, conducted is the analysis of every possible risk with a view to estimation of probability of the events that pose a hazard to sanitary-epidemiological welfare of the population.

*Key words:* sanitary-quarantine control, risks for sanitary-epidemiological welfare, risk assessment.

Изменения в мировой и российской политико-экономической сфере (глобализация мировой экономической системы, расширение транснациональной миграции, образование Таможенного союза, вступление в действие Международных медико-санитарных правил (2005 г.), далее ММСП (2005 г.), либерализация пограничной политики Российской Федерации и другие) не могли не сказаться на методах и средствах контроля в пунктах пропуска через государственную границу, применяемыми государственными контрольными органами, в том числе и органами санитарно-карантинного контроля. Неуклонная тенденция к увеличению пассажиропотока, внешнеторгового оборота Российской Федерации и вместе с тем ограниченные кадровые возможности органов санитарно-карантинного контроля, связанные с оптимизацией штатной структуры федеральных органов исполнительной власти, требуют совершенствования методов и средств осуществления контрольных операций, заставляют искать оптимальные формы и механизмы осуществления своих функций. Целесообразность тотального государственного контроля уходит в прошлое, уступая место выборочным, но значительно более эффективным надзорным мероприятиям.

Назначение ММСП (2005) – предотвращать международное распространение болезней, защищать от них, контролировать и обеспечивать реакцию здравоохранения на них такими способами, которые соразмерны рискам для общественного здоровья и ограничиваются ими, избегают ненужного вмешательства в международные перевозки и торговлю (ст. 2), обуславливают необходимость формирова-

ния принципиально новых подходов к санитарно-карантинному контролю с методами и средствами, адекватными имеющимся рискам для санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

Исходя из продекларированной цели ММСП (2005 г.), основанием проведения санитарно-карантинного контроля на границе должны являться риски для общественного здоровья (для санитарно-эпидемиологического благополучия). Степень имеющихся рисков, в свою очередь, будет определять необходимость, формы и методы проведения санитарно-карантинного контроля. Для адекватности оценки рисков назрела необходимость разработки системы управления рисками санитарно-карантинного контроля.

Риски в любой системе управления рисками, прежде всего, должны быть идентифицированы. Основное требование – полнота перечня возможных рисков. В ст. 7 «Положения о порядке осуществления государственного санитарно-эпидемиологического надзора (контроля) за лицами и транспортными средствами, пересекающими таможенную границу Таможенного союза, подконтрольными товарами, перемещаемыми через таможенную границу Таможенного союза и на таможенной территории Таможенного союза» (утв. Решением Комиссии Таможенного союза от 28 мая 2010 г. № 299) исчерпывающе определены риски возникновения чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения, являющиеся основаниями для проведения санитарно-карантинного контроля. По нашему мнению, идентифицировав и проанализировав каждый из определенных Положением рисков, при

помощи системы управления рисками в санитарно-карантинном контроле можно оценить возможность и тяжесть вероятного происшествия<sup>1</sup> в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия населения и определить адекватность применения тех или иных медико-санитарных мер для их ликвидации или минимизации.

Рассматриваемые риски можно разделить на следующие виды: выявленный – фактический, то есть уже имеющая место угроза санитарно-эпидемиологическому благополучию; потенциальный – не проявивший пока себя для санитарно-эпидемиологического благополучия при наличии объективных условий для его возникновения.

В соответствии с ММСП (2005 г.), по характеру представляемой угрозы, риски санитарно-эпидемиологического благополучия целесообразно разделить на риски биологического, химического, радиационного и смешанного характера.

Оценка риска подразумевает наличие шкалы и критериев, по которым можно измерить, дать оценку вероятности событий и технологию измерения риска. Из существующих подходов к измерению рисков при их оценке для санитарно-эпидемиологического благополучия в рамках осуществления санитарно-карантинного контроля оптимальным, на наш взгляд, является рассмотренный С.Петренко и С.Симоновым [IT Manager. 2004; 3(15)] наиболее распространенный подход – оценка рисков по двум факторам: вероятность происшествия (события) и тяжесть возможных последствий – с использованием качественных величин. Чем больше вероятность происшествия и тяжесть последствий, тем больше риск. При таком подходе определены шкалы.

**Пятиуровневая субъективная шкала вероятностей события:**

- A – событие практически никогда не происходит;
- B – событие случается редко;
- C – вероятность события за определенный промежуток времени – около 50 %;
- D – скорее всего, событие произойдет;
- E – событие почти обязательно произойдет.

**Пятиуровневая субъективная шкала тяжести последствий при совершении события:**

- I – ничтожное происшествие (воздействием события можно пренебречь);
- II – незначительное происшествие (последствия легко устранимы, затраты на ликвидацию последствий невелики, воздействие на санитарно-эпидемиологическое благополучие незначительно);
- III – *неправимое* происшествие с умеренными результатами (ликвидация последствий не связана

<sup>1</sup>В данной статье происшествием или событием, в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими правилами СП 3.4.2318-08 «Санитарная охрана территории Российской Федерации», является завоз и распространение на территории Российской Федерации инфекционных заболеваний, представляющих опасность для населения, а также ввоз на территорию Российской Федерации товаров, химических, биологических и радиоактивных веществ, отходов и иных грузов, представляющих опасность для человека.

Таблица 1

Определение уровня риска					
Вероятность события	Тяжесть последствий				
	I	II	III	IV	V
A	Низкий риск	Низкий риск	Низкий риск	Средний риск	Средний риск
B	Низкий риск	Низкий риск	Средний риск	Средний риск	Высокий риск
C	Низкий риск	Средний риск	Средний риск	Средний риск	Высокий риск
D	Средний риск	Средний риск	Средний риск	Средний риск	Высокий риск
E	Средний риск	Высокий риск	Высокий риск	Высокий риск	Высокий риск

с крупными затратами, воздействие на санитарно-эпидемиологическое благополучие невелико);

IV – происшествие с *серьезными* последствиями (ликвидация последствий связана со значительными затратами, воздействие на санитарно-эпидемиологическое благополучие ощутимо).

V – происшествие с *критическими* последствиями, имеющими социальные и экономические корни. Максимально возможное воздействие на санитарно-эпидемиологическое благополучие населения.

Для оценки определена трехзначная шкала рисков: низкий, средний, высокий.

Определение двухфакторного риска по пятиуровневым субъективным шкалам по вероятности и тяжести события представлено в табл. 1.

Согласно данной общепринятой трехзначной шкале можно определить методы, рекомендуемые к применению (табл. 2).

Идентифицировав имеющиеся риски для санитарно-эпидемиологического благополучия населения и определив их уровни, специалист, осуществляющий санитарно-карантинный контроль, получает возможность не только установить необходимость санитарно-карантинного контроля на транспортном средстве, но и определить адекватные и в то же время наиболее эффективные методы его проведения.

Таблица 2

Проведение санитарно-карантинного контроля			
Методы	Уровень риска		
	низкий	средний	высокий
Устный опрос	-/+	+	+
Проверка документов	-/+	+	+
Осмотр транспортного средства, грузов и товаров	-/+	+	+
Анкетирование лиц		+	+
Медицинский осмотр лиц		+	+
Термометрия		+	+
Реализация оперативного плана мероприятий при подозрении на события, которые могут привести к возникновению чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения		+/-	+

*Риск № 1. Прибытие (убытие) транспортного средства из стран (в страну), имеющих зараженные болезнями районы, и из стран, имеющих районы химических и радиационных аварий (в соответствии с перечнями стран по информации Всемирной Организации Здравоохранения)*

Данный риск требует отдельного анализа по признакам «прибытие-убытие» и в соответствии с конкретным характером риска.

В случае получения предварительной информации о прибытии транспортного средства из страны, имеющей зараженные болезнями районы, возникший риск однозначно следует оценить как потенциальный риск биологического характера. Вероятность события будет напрямую зависеть от удаленности конкретного места дислокации транспортного средства в «пораженной» стране от зараженных районов и этиологии биологической угрозы, степени контактов экипажа с местным населением, противоэпидемической готовности экипажа, уровня санитарного состояния транспортного средства (возможность реализации эпидпроцесса). Тяжесть последствий будет зависеть, безусловно, от характеристики возбудителя (этиология, механизмы передачи, вирулентность, патогенность)

Анализ данных может позволить отнести имеющийся потенциальный риск ко всем трем категориям.

Несмотря на то, что оценка Риска № 1 при убытии транспортного средства, вероятнее всего, квалифицирует его как низкий риск, при его анализе необходимо, прежде всего, учитывать, что санитарно-карантинный контроль на убытие является мероприятием профилактическим, которое может решить следующие задачи:

- оценить санитарное состояние транспортного средства (для использования полученных данных при возвращении транспортного средства);

- повысить противоэпидемическую готовность транспортного средства и настороженность экипажа.

При следовании транспортного средства из районов химических и радиационных аварий оценка данного риска должна производиться аналогичным образом, но с учетом характера риска.

*Риск № 2. Несообщение в установленном порядке предварительной информации об отсутствии на борту воздушного или морского (речного) судна лиц с подозрением на болезнь, требующей проведения мероприятий по санитарной охране территории*

Данный риск, безусловно, никогда не будет высоким. Однако учитывая, что это потенциальный риск, следует признать, что реагирование на проявление его, даже при действительном отсутствии на транспортном средстве лиц с подозрением на болезнь, дает значительный профилактический эффект, повышает настороженность экипажей и администрации судов к любому возможному проявлению инфекционного процесса. Принимая во внимание данные обстоятельства, в морских и воздушных пунктах пропуска специалистами санитарно-карантинных пунктов управ-

ления Роспотребнадзора по Ростовской области за 2008–2010 гг. возбуждено 11 административных дел в отношении операторов перевозки и командирского состава судов.

*Риск № 3. Наличие на транспортном средстве лиц, прибывших международным рейсом из стран, имеющих зараженные болезнями районы, или прибывших из таких стран в пределах инкубационного периода*

Данный риск следует оценить как потенциальный риск биологического характера. Вероятность события будет зависеть от таких факторов, как удаленность конкретного места пребывания лица от зараженного района, характеристики возбудителя, количества лиц, прибывших из зараженных районов на транспортном средстве и т.д. Наибольшая вероятность события при проявлении данного риска – в воздушных пунктах пропуска. Короткий временной интервал межгосударственных сообщений в условиях большой скученности пассажиров как в аэропортах, так и непосредственно в воздушном судне, действующая глобальная система трансферных перелетов – это основные факторы, повышающие вероятность события. Оценить вероятность события возможно только при наличии предварительной информации. В Ростовской области при угрозе завоза опасных болезней предварительно изучаются трансферные пассажирские манифесты авиакомпаний, которые позволяют проследить маршрут следования большинства пассажиров, выявить таким образом лиц, следующих из стран, имеющих зараженные районы, с последующим санитарно-карантинным контролем данного транспортного средства и непосредственно данных лиц.

*Риск № 4. Выявление в ходе ранее осуществленного санитарно-карантинного контроля нарушений законодательства в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения на транспортном средстве, осуществляющем международные перевозки*

Наличие на транспортном средстве причин и условий для реализации эпидемического процесса является потенциальным риском для санитарно-эпидемиологического благополучия. Особенно актуальным это является на морских судах, которые имеют сложные системы жизнеобеспечения (система питьевого водоснабжения, кондиционирования и вентиляции, сбора, обработки и удаления отходов), коллективное питание, относительно постоянные экипажи и, как правило, постоянный регион эксплуатации. Накопление данных по результатам санитарно-карантинного контроля и их постоянное обновление позволит всесторонне проанализировать данный риск. В Ростовской области по результатам санитарно-карантинного контроля, а также с учетом результатов осмотра водных транспортных средств, с целью выдачи судового санитарного свидетельства, производится ранжирование судов по группам санитарно-эпидемиологического благополучия.

Группа может изменяться в сторону повышения или понижения по результатам последующих контрольных мероприятий. Таким образом, при получении предварительной информации о подходе определенного судна специалист санитарно-карантинного пункта уже имеет предварительную информацию о его санитарно-эпидемиологическом благополучии.

*Риск № 5. Международные почтовые отправления с нарушенной целостностью, содержащие белье, одежду, постельные принадлежности или иные предметы хозяйственного обихода, посуду, игрушки, бывшие в употреблении, и которые поступили из стран, имеющих зараженные районы, или из зон эпидемий*

Данный риск является потенциальным риском биологического характера. Предметы обихода являются одним из основных факторов передачи инфекций. Кроме того, не следует забывать о возможности вторичного инфицирования при нарушении целостности международных почтовых отправлений во время транспортировки, в том числе и посредством переносчиков болезни.

Риск № 5 можно квалифицировать не просто как потенциальный риск биологического характера, но и как риск возможного проявления биотерроризма. Принимая во внимание политическую, социальную и экономическую значимость биотеррористической угрозы, учитывая высокую вероятность реализации события (D-E уровень), с оценкой возможного происшествия как происшествия с серьезными и критическими последствиями, следует отнести этот риск в соответствии с таблицей оценки рисков на 75 % к высоким рискам, при которых целесообразен 100 % санитарно-карантинный контроль.

*Риск № 6. Поступление информации о наличии на транспортном средстве лиц с подозрением на болезнь*

Данный риск, в отличие от рисков, рассматриваемых ранее, является фактическим (выявленным), то есть это уже имеющая место угроза санитарно-эпидемиологическому благополучию. С учетом того, что подозрение, как таковое, не является абсолютной вероятностью реализации события, целесообразно оценить вероятность события на D-E уровень с IV-V степенью тяжести последствий. Таким образом, в соответствии с таблицей оценки рисков, риск № 6 относится на 75 % к высоким рискам, при которых целесообразен 100 % санитарно-карантинный контроль. Учитывая то обстоятельство, что риск является фактическим, необходимо немедленное введение в действие оперативного плана противоэпидемических мероприятий при выявлении больного, подозрительного на заболевание.

*Риск № 7. Наличие грызунов или следов их пребывания в транспортном средстве*

Данный риск актуален в морских и воздушных пунктах пропуска. При анализе риска № 7 необходимо учитывать маршрут следования транспортного средства с целью возможности проникновения

на него инфицированных грызунов. При этом риск является потенциальным, биологического характера. Маршрут движения транспортного средства, пребывание его в зонах, эндемичных по болезням, передаваемых грызунами, поможет отнести вероятность события на уровень A-B при I-IV тяжести возможного происшествия, что, согласно таблице оценки рисков, является низким или средним риском. При этом независимо от принятого решения о проведении санитарно-карантинного контроля необходима дератизация транспортного средства по эпидемиологическим показаниям, учитывая, что в соответствии с п. 2.4. Санитарно-эпидемиологических правил СП 3.5.3.1129-02 «Дератизация. Санитарно-эпидемиологические требования к проведению дератизации» суда морские, речные, воздушные, предназначенные для перевозки пассажиров и грузов, являются объектами, имеющими особое эпидемиологическое значение.

*Риск № 8. Наличие насекомых в транспортном средстве, которое прибыло из стран, имеющих зараженные районы, или из зон эпидемий*

Риск является потенциальным риском биологического характера, при этом в отличие от предыдущего данные о нахождении транспортного средства в странах имеющих зараженные районы, или в зонах эпидемий, делают анализ маршрута движения транспортного средства нецелесообразным.

Вероятность события по сравнению с предыдущим риском возрастает до уровня B-C-D при II-IV тяжести возможного происшествия, с учетом этиологии предполагаемого возбудителя, что согласно таблице оценки рисков, является средним или высоким риском. Проведение санитарно-карантинного контроля целесообразно со специалистами лечебно-профиля для оценки состояния здоровья экипажа и пассажиров. Проведение комплекса дезинсекционных мероприятий является обязательным условием.

*РИСК № 9. Установление факта перемещения транспортного средства, подконтрольных товаров с повышенным радиационным фоном*

Данный риск является фактическим риском радиационного характера, что уже максимально увеличивает вероятность свершения события, в данном случае – ввоз на территорию Российской Федерации радиоактивных веществ, представляющих опасность для человека. Тяжесть последствий может варьировать от незначительной (II) до критической степени (V), в зависимости от характера источника и уровня превышения радиационного фона. Уровень риска, по таблице оценки риска, на 100 % является высоким. Необходим обязательный санитарно-карантинный контроль со средствами радиационного контроля и защиты, при немедленном введении в действие схемы оповещения при ЧС. В пунктах пропуска Ростовской области при вступлении в силу ММСП (2005 г.) внедрены оперативные планы мероприятий на случай подозрения на события, которые могут привести к возникновению чрезвычайных ситуаций в области

санитарно-эпидемиологического благополучия населения в пункте пропуска через Государственную границу Российской Федерации. Особенностью этих планов является:

- определение действий при выявлении чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия трех видов: биологического, химического, радиационного характера;

- взаимодействие и согласованность действий государственных контрольных органов в пунктах пропуска при выявлении, локализации, минимизации последствий и ликвидации чрезвычайной ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия;

- возможность введения плана в действие каждым из представителей государственных контрольных органов при выявлении чрезвычайной ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия (наличие алгоритма действий).

План разрабатывается специалистами санитарно-карантинного пункта с учетом специфики пункта пропуска и подлежит ежегодной корректировке. План утверждается Главным государственным санитарным врачом или его заместителем и подлежит согласованию с ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии», пограничной, таможенной службой, транспорт-

ным предприятием пункта пропуска и медицинской службой, обеспечивающей эвакуацию больных или пораженных лиц. Согласование плана выносится на координационное совещание в пункте пропуска.

Естественно, необходимо учитывать, что существуют еще множественные риски для санитарно-эпидемиологического благополучия, когда на одном транспортном средстве имеются два и более из рассмотренных рисков, а также смешанные риски: два и более риска различных по своему характеру. Однако и в этих случаях предложенная элементарная система управления рисками будет эффективна, позволит оценить данный риск, принять решение о необходимости проведения санитарно-карантинного контроля, а в случае положительного решения: определить средства и методы контроля.

**Authors:**

*Ryzhikov Yu.V., Solov'ev M.Yu.* Rospotrebnadzor Administration in the Rostov Region. 17, 18-liniya St., Rostov-on-Don, 344019, Russia. E-mail: master@61.rospotrebnadzor.ru

**Об авторах:**

*Рыжков Ю.В., Соловьев М.Ю.* Управление Роспотребнадзора по Ростовской области. 344019, Ростов-на-Дону, 18-я линия, 17. E-mail: master@61.rospotrebnadzor.ru

Поступила 12.10.11.

А.М.Титенко, Е.И.Андаев

## НАУЧНО-МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМУ АНАЛИЗУ И ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ БОЛЕЗНЕЙ, ВЫЗВАННЫХ ВИРУСАМИ МАРБУРГ И ЭБОЛА

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

Анализ современной эпидемиологической ситуации показал, что за последние годы происходят существенные изменения эпидемических проявлений болезней, вызываемых вирусами Марбург и Эбола. Очевидна глобализация эпидемического процесса – масштабность вспышек, расширение нозоареала, рост заболеваемости, сокращение интервалов между эпидемическими вспышками, увеличение вероятности выноса инфекции из очагов эндемичных территорий. Отсутствуют нормативно-методические документы, регламентирующие проведение диагностических исследований по обнаружению возбудителей этих болезней. Намечен научно-методологический подход к эпидемиологическому анализу и лабораторной диагностике болезней, вызванных вирусами Марбург и Эбола.

*Ключевые слова:* геморрагические лихорадки Марбург и Эбола, санитарная охрана территории, эпидемиология, лабораторная диагностика.

А.М.Титенко, Е.И.Андаев

### Scientific-Methodological Approach to the Epidemiological Analysis and Laboratory Diagnostics of the Diseases Caused by Marburg and Ebola Viruses

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

Analysis of the current epidemiological situation has revealed that epidemic manifestations of infectious diseases, caused by Marburg and Ebola viruses, have been undergoing significant changes over the recent years. Globalization of epidemic process seems obvious due to the scale of the outbreaks, extension of nosoarea, increase in the morbidity rate, short-cut of the intervals between epidemic outbreaks, and increase of the probability of infection export outside the foci of endemic territories. Normative documents regulating the process of diagnostic investigations aimed at detection of Marburg/ Ebola virus agents are missing. In this connection, put forward is the scientific-methodological approach to epidemiological analysis and laboratory diagnostics of the diseases caused by these viruses.

*Key words:* Marburg and Ebola hemorrhagic fevers, sanitary protection of the territory, epidemiology, laboratory diagnostics.

В рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы) разрабатываются методические указания «Алгоритм эпидемиологической и лабораторной диагностики особо опасных, «новых» и «возвращающихся» инфекционных болезней».

Болезни, вызванные вирусами I группы патогенности, Марбург (ГЛМ) и Эбола (ГЛЭ) – экзотические особо опасные контагиозные инфекции, включенные в перечень болезней, на которые распространяются правила по санитарной охране территории (СОТ) [6, 8, 22, 23, 24]. В последние годы происходят существенные изменения их эпидемических проявлений. Контагиозность инфекций создает реальную опасность их заноса из природного очага на неэндемичные территории, что может привести к серьезным эпидемическим осложнениям. В связи с этим очевидна актуальность применения научно-методологического подхода к эпидемиологическому анализу и комплексной лабораторной диагностике ГЛМ и ГЛЭ в современных условиях для совершенствования СОТ [8, 10, 37] с разработкой алгоритма

стандарта лабораторной диагностики этих болезней.

В работе использовали электронную базу данных, составленную по результатам информационного поиска в сети Интернет. Часть информации заимствована из монографий и справочников [3, 4, 26, 27]. По опубликованным материалам проведен ретроспективный анализ эпидемических проявлений ГЛМ и ГЛЭ в эндемичных странах и случаев их заноса на неэндемичные территории. Проанализирован порядок организации работ и порядок взаимодействия учреждений Роспотребнадзора с другими учреждениями при проведении лабораторных исследований на наличие возбудителей особо опасных инфекций. Проведен анализ методов лабораторной диагностики возбудителей ГЛМ и ГЛЭ как собственных, так и по данным литературы. Законодательную и нормативно-методическую базу анализировали с использованием национальных документов и документов ВОЗ

На основании анализа законодательной, нормативно-методической базы данных [1, 5, 11, 12, 13, 14, 15, 33] можно сделать следующие выводы:

- в случае завоза болезни необходимо проведение мероприятий по СОТ Российской Федерации в

соответствии с комплексными планами противоэпидемических мероприятий по санитарной охране территорий от федерального до муниципального уровня в рамках соответствующих межведомственных Комиссий по чрезвычайным ситуациям и пожарной безопасности (КЧС и ПБ);

- определены действия медицинского персонала при выявлении больного (трупа): дана клинико-эпидемиологическая характеристика болезней ГЛМ и ГЛЭ; приведены схемы информации и оповещения, лечения и экстренной профилактики, комплектования укладок; правила забора и транспортировки материала; применения средств индивидуальной защиты; режимы обеззараживания различных объектов, зараженных вирусами Марбург и Эбола;

- организация и обеспечение лабораторной диагностики болезней ГЛМ и ГЛЭ осуществляется в соответствии с требованиями биологической безопасности в учреждениях, определенных Приказом Роспотребнадзора от 17 марта 2008 № 88 «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней»;

- определены: Референс-центр по мониторингу за вирусными геморрагическими лихорадками Марбург и Эбола с функциями в рамках ММСП (2005), Национальный центр верификации диагностической деятельности и Национальный центр, осуществляющий функцию государственной коллекции – ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Отмечено:

- не ясно в чем заключается мониторинг в отношении к ГЛМ и ГЛЭ, кто его должен проводить, каковы его периодичность и результаты, списки рас-сылки;

- отсутствие нормативно-методических документов, регламентирующих методы лабораторной диагностики возбудителей – вирусов Марбург и Эбола;

- проведение диагностических исследований методами экспресс-диагностики (в случае выявления подозрительных лиц на ГЛМ и ГЛЭ) в Региональных центрах по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней и Центрах индикации и диагностики возбудителей опасных инфекционных болезней (как это регламентировано Приказом Роспотребнадзора № 88 от 17.03. 2008 г.) в настоящее время не представляется возможным по двум причинам: отсутствие коммерческих сертифицированных (или экспериментальных) диагностических тест-систем и отсутствие у Центров санитарно-эпидемиологических заключений, разрешающих проводить диагностические исследования на вирусы Марбург и Эбола.

**Анализ эпидемиологической ситуации по ГЛМ и ГЛЭ.** Контагиозные ГЛМ и ГЛЭ характеризуются самым высоким уровнем летальности, достигающей при отдельных вспышках 88–89 %. Хронология заболеваемости ГЛМ в мире за всю историю приведена в табл. 1.

Заболевание, вызванное вирусом Марбург,

впервые отмечено в 1967 г. в Германии (Марбург, Франкфурт) и Югославии (Белград) при заражении людей от африканских мартышек-верветов *Cercopithecus aethiops*, завезенных из Уганды [35]. Первый случай заражения человека вирусом Марбург в природных условиях описан в 1975 г. в ЮАР [16]. В 1980–1987 гг. зарегистрированы спорадические случаи заболеваний в Кении и Зимбабве [16]. В 1999 г. впервые болезнь зарегистрирована на территории Демократической Республики Конго (ДРК) в двух деревнях, находящихся в разных частях страны, в основном среди персонала золотодобывающих шахт. Вспышка продолжалась до 2000 г. и характеризовалась следующими эпидемиологическими особенностями: чаще болели молодые мужчины и дети (среди заболевших 12 (8 %) – дети до 5 лет), отмечена внутрисемейная заболеваемость. Из 154 зарегистрированных случаев 128 (83 %) закончились летальным исходом [39]. По результатам изучения популяционного иммунитета местного населения установлена группа риска – рабочие горняки [29]. Ретроспективно установлено, что вспышка среди рабочих золотодобывающих рудников началась с 1994 г. [39].

В начале нового столетия наблюдается расширение нозоареала. Впервые в 2005 г. зафиксирована вспышка ГЛМ в Анголе – выявлено 374 случая заболеваний, из них 329 (88 %) закончились летально [39]. Последние два случая болезни зарегистрированы в 2008 г. у туристов из США и Нидерландов, по-

Таблица 1

Хронология заболеваемости геморрагической лихорадкой Марбург		
Год	Страна	Заболеваемость / летальность (%)
1967	Германия*, Марбург	23 / 5 (21,7)
1967	Германия*, Франкфурт	6 / 2 (33,3)
1967	Югославия*, Белград	2 / 0 (0)
1975	ЮАР*	3 / 1 (33,3)
1980	Кения	2 / 1 (50)
1982	Зимбабве	1 / 0 (0)
1987	Кения	1 / 1 (100)
1994	Россия**	1 / 1 (100)
1994	Демократическая Республика Конго	Нет данных
1998–2000	Демократическая Республика Конго	154 / 128 (83)
2005	Ангола	374 / 329 (88)
2007(июнь-август)	Уганда	2 / 1 (50)
2008 (январь)	США* (Заражение произошло в Уганде)	1 / 0
2008 (июль)	Нидерланды* (Заражение произошло в Уганде)	1 / 1 (100)
<i>Всего</i>		571 / 470 (82,3)

\*Завоз на неэндемичные территории.

\*\* Лабораторное заражение.

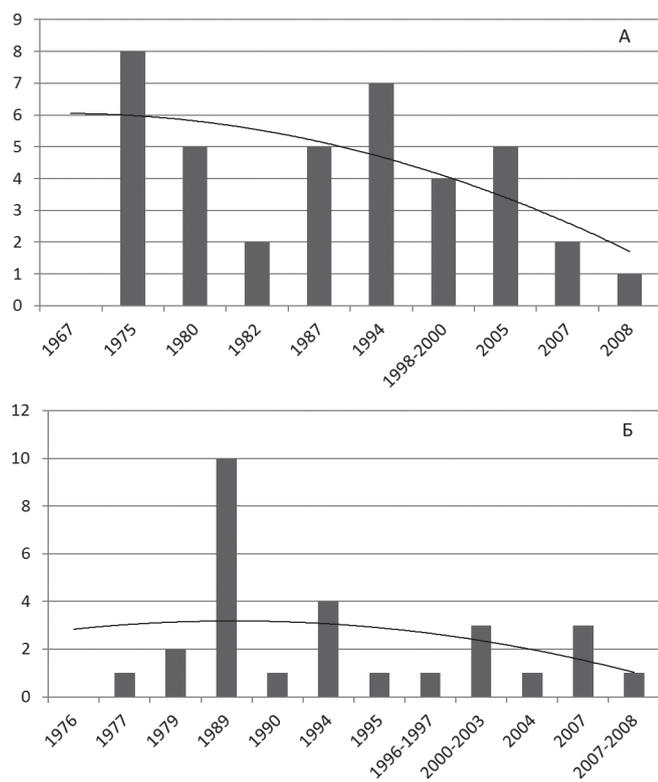


Рис. 1. Временные интервалы спорадической и вспышечной заболеваемости ГЛМ (А) и ГЛЭ (Б) в разных странах (1967–2008 гг.). По оси ординат – интервалы между предыдущей и последующей вспышками в годах, по оси абсцисс годы регистрации спорадических случаев и вспышек

сетивших Уганду [39].

Таким образом, эпидемиологическими особенностями ГЛМ являются: продолжающееся расширение ареала, регистрация заболеваний в природном очаге на протяжении ряда лет (ДРК), усиление тяжести болезни, появление случаев завоза болезни в Европу и США. Средняя летальность при всех известных вспышках составила 82,3 %. Отмечается тенденция сокращения интервалов между эпидемическими вспышками болезни с 8 лет (1967–1975 гг.) до 1 года (рис. 1). Значительно возросла масштабность вспышек: если раньше с 1975 по 1994 год зарегистрированы единичные случаи, то в 1998–2005 гг. выявлены сотни случаев. Наиболее масштабная вспышка отмечена в Анголе в 2005 г.

**Болезнь, вызванная вирусом Эбола.** Хронология заболеваемости и летальности в мире отображена в табл. 2. Впервые ГЛЭ выявлена в 1976 г. в Судане и Заире (сейчас ДРК). В июне–октябре 1976 г. в Судане зарегистрирована вспышка неизвестного ранее заболевания, привлекавшая внимание мировой общественности. Заболело 284 человека, из них 151 (53 %) умер. В ДРК в сентябре–октябре зафиксирована более крупная вспышка – 318 случаев, из которых 280 (88 %) закончились с летальным исходом [18]. В 1989 г. в США от обезьян *Macaca fascicularis* выделен вирус Эбола штамм Reston [39]. Инфицированы четыре лабораторных служителя, у которых обнаружены антитела, а заболевание протекало без клини-

ческих проявлений.

Наиболее масштабная вспышка (заболевших – 425, летальность – 52,7 %) произошла в Уганде в 2000–2001 гг. В феврале–марте 2009 г. на Филиппинах отмечена эпизоотия среди свиней, произведен убой 6000 голов. Изолирован вирус Эбола (штамм Reston) [38], а среди работников, контактировавших с животными, выявлены сероположительные лица. По мнению группы экспертов ВОЗ, вирус Эбола штамм Reston потенциально опасен для человека [38].

В настоящее время известно пять подтипов, или геновариантов вируса Эбола: суданский, заирский, филиппинский (Reston), кот-д’ивуарский [30, 39]. Изолированный в 2008 г. в Уганде вирус Эбола выделен в пятый новый подтип – Bundibugyo, отличающийся от четырех известных [39]. Заболеваемость ГЛЭ регистрируется в ряде стран Африканского континента, расположенных в зоне дождевых лесов в Центральной и Западной Африке [39]. Наряду с тяжелыми формами болезни, отмечены легкие или бессимптомные [18]. Наличие антител к вирусу Эбола в сыворотках крови у населения и животных в Либерии, Камеруне, Габоне, Гвинее, Зимбабве, Уганде, Сьерра-Леоне, Сенегале, Центрально-Африканской Республике, Чаде, ДРК, Мадагаскаре и Филиппинах свидетельствует о существовании в этих районах скрытых очагов, в которых циркулирует возбудитель [18, 22, 31, 32, 34].

В последние годы ГЛЭ имеет следующие эпидемиологические особенности: расширение ареала (Габон, Уганда), одновременное протекание вспышек в трех странах (ДРК, Габон и Уганда, 2001 г.), регистрация заболеваний в природном очаге на протяжении ряда лет (ДРК, Судан, Габон, Уганда), формирование природного очага в Габоне и Уганде, существование скрытых природных очагов. Средняя летальность при всех известных случаях составила 66,9 %. Отмечается тенденция сокращения интервалов между эпидемическими вспышками болезни (рис. 1, Б). Все это свидетельствует о возрастании эпидемического потенциала ГЛЭ.

Конкретные сведения в отношении возможных резервуаров или переносчиков возбудителей ГЛМ и ГЛЭ отсутствуют. Многочисленные попытки выделить вирус (за исключением непатогенного для человека вируса Эбола штамм Reston) от животных различных видов не дали положительного результата [18, 39]. Имеются косвенные данные, указывающие на возможность инфицирования в природных условиях обезьян, морских свинок, грызунов, птиц и собак [30]. Обсуждается гипотеза, что летучие мыши, особенно рукокрылые подотряда *Microchiroptera* могут быть резервуаром вируса Марбург [36, 39].

Анализ последствий завоза ГЛМ и ГЛЭ на неэндемичные территории показал, что обезьяны послужили источником вспышки лихорадки Марбург в Германии и Югославии, приведшей к чрезвычайной ситуации с тяжелыми последствиями [35]. Хотя случаи завоза ГЛЭ на неэндемичные территории боль-

Хронология заболеваемости геморрагической лихорадкой Эбола

Год	Страна	Заболеваемость / летальность (%)
1961–1962	Эфиопия	0 / 0 (0) ретроспективные серологические данные
1972	Заир (ДРК)	0 / 0 (0) ретроспективные серологические данные
1976	Судан	284 / 151 (53,1)
1976	Заир	318 / 280 (88,0)
1976	Англия**	1 / 0 (0)
1977	Заир (ДРК)	1 / 1 (100)
1979	Судан	34 / 22 (64,7)
1989–1990	США*	0 / 0 (0)
1992	Италия*	0 / 0 (0)
1994	Габон	52 / 31 (59,6)
1994	Кот-д'Ивуар	1 / 0 (0)
1994	Швейцария*	1 / 0 (0)
1995	ДРК	315 / 254 (80,6)
1996	ЮАР***	2 / 1 (50)
1996	США*	0 / 0 (0)
1996	Россия**	1 / 1 (50)
1996–1997	Габон	103 / 66 (64)
2000–2001	Уганда	425 / 224 (52,7)
2001–2002	Габон	65 / 53 (81,5)
2001–2002 (октябрь–март)	ДРК	57 / 43 (75,4)
2002–2003 (декабрь–март)	ДРК	143 / 129 (90,2)
2003 (ноябрь–декабрь)	ДРК	35 / 29 (82,8)
2004	Судан	17 / 7 (41,7)
2004	Россия**	1 / 1 (50)
2007	ДРК	264 / 187 (70,8)
2007–2008	Уганда	149 / 37 (24,8)
2009	Германия**	1 / 0 (0)
2009	Филиппины	0 / 0 (0)
2008–2009 (декабрь–февраль)	ДРК	32 / 15 (46,8)
<i>Всего</i>		2302 / 1532 (66,6)

\* Занос на неэндемичные территории (изолирован вирус подтипа Reston).

\*\* Лабораторное заражение.

\*\*\*Занос на неэндемичные территории.

Примечание. ДРК – Демократическая Республика Конго.

ными людьми или обезьянами [39] регистрировались неоднократно, они не привели к распространению инфекции. Анализ случаев лабораторного заражения вирусами Марбург (ГНЦ ВБ «Вектор», 1990 г.), Эбола (Великобритания, 1977 г.; ВЦ НИИМ Минобороны РФ, 1996 г.; ГНЦ ВБ «Вектор», 2004 г.; Гамбургский институт тропической медицины, Германия, 2009 г.) показал, что при соблюдении правил противоэпидемической безопасности содержания больных, учете контактных и использовании средств экстренной профилактики, распространение инфекции можно предотвратить [2, 39].

Были не подтвержденные впоследствии подозрения завозов ГЛМ в Корсаков и ГЛЭ в Старый Оскол. Тем не менее, существует риск возникновения чрезвычайных ситуаций при несвоевременной изоляции больных.

*Диагностика ГЛМ и ГЛЭ на основе эпидемиологического, клинического и лабораторного критериев.* В случае завоза болезни, постановка диагноза у больного (подозрительного) осуществляется на

основании клинического, эпидемиологического и лабораторного критериев. Любой случай лихорадки с полиморфной тяжелой клинической картиной в пределах трех недель после убытия из эндемичной местности, общения с больными особо опасной вирусной болезнью или контакта с заразным материалом должен оцениваться с эпидемиологической и клинической точки зрения и квалифицироваться как подозрительный, вероятный или подтвержденный.

Подозрительный случай – имеются некоторые клинические признаки и совпадают критерии эпидемиологического анамнеза. Вероятный случай – имеются некоторые клинические признаки заболевания, совпадения с критериями эпидемиологического анамнеза, подтверждение одним или двумя методами экспресс-диагностики (ОТ-ПЦР, ИФА, МФА). Подтвержденный случай – имеются клинические признаки заболевания, совпадения с критериями эпидемиологического анамнеза, подтверждение методами лабораторной диагностики: обнаружение антител класса Jg M, четырехкратное нарастание титра

антител класса JgG, выделение вируса из материала от больного вирусологическими методами.

Анализ клинических проявлений показал, что течение болезней ГЛМ и ГЛЭ имеет много общего: острое начало с повышением температуры до 39 °С, появление общей слабости, недомогания, сильной головной боли в лобной и височной областях, боли в мышцах спины, суставах [3, 4, 16, 18]. В случае заноса болезни на территорию России ее диагностика по клиническим признакам в первые дни крайне затруднительна, так как дифференциальная симптоматика еще не проявляется. Болезни ГЛМ и ГЛЭ дифференцируют с малярией, брюшным тифом, стрептококковыми и другими септицемиями, при наличии геморрагий – с лихорадками желтой, денге и Крымской геморрагической, с состоянием иммунодефицита, который широко распространен среди населения африканских стран [25].

**Эпидемиологический анамнез.** Так как нозоарел ГЛМ и ГЛЭ ограничен странами Африки, возможен занос инфекции либо больным (или находящимся в инкубационном периоде) человеком, либо обезьянами (зеленые мартышки, шимпанзе, гориллы). Вероятен завоз инфекции с летучими мышами, находящимися в контейнерах с фруктами. При сборе эпидемиологического анамнеза в случае выявления подозрительного больного обращают внимание на следующее: пребывание (туристические, деловые поездки, работа специалистов по контрактам) в течение 21 сут, предшествующих заболеванию, в эндемичных по болезням странах – ЮАР, Кения, Зимбабве, ДРК, Ангола, Уганда – ГЛМ; Судан, ДРК, Габон, Кот-д’Ивуар, Уганда – ГЛЭ; контакт с заболевшим ГЛМ или ГЛЭ; контакт с обезьянами, завезенными из Африки (включая Мадагаскар), с Филиппин; работа с заразным материалом в научно-исследовательских лабораториях.

Экспертами ВОЗ предложено оценивать лиц,

пребывающих из эндемичной зоны с невыясненной лихорадкой или дающих картину лихорадки в инкубационном периоде с эпидемиологической и клинической точки зрения и относить их к трем категориям со всеми вытекающими последствиями: минимальное подозрение (слабый риск), умеренное подозрение (умеренный риск) и сильное подозрение (высокий риск) [3].

**Лабораторная диагностика ГЛМ и ГЛЭ.** Для ГЛМ и ГЛЭ нет нормативно-методических документов, регламентирующих проведение диагностических исследований по обнаружению возбудителей этих болезней. В соответствии с действующими документами ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» выполняет функции Референс-центра по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней (в том числе вирусных геморрагических лихорадок Эбола, Ласса и Марбург) с функциями в рамках ММСП (2005) [8].

Предполагаемый порядок организации работ при проведении лабораторных исследований на наличие возбудителей ГЛМ и ГЛЭ в материале от больного (подозрительного) в соответствии с действующими документами показан на рис. 2.

Подозрительный больной выявляется на муниципальном уровне. В соответствии с комплексным планом у такого больного врачом лечебного учреждения в присутствии консультанта (вирусолога, специалиста по ООИ) забирают следующий материал: кровь, смывы и мазки из носоглотки, мочу. В отдаленный период заболевания берут вторую пробу крови для получения парной сыворотки. Упаковку и транспортировку проб для исследования осуществляют в соответствии с СП 1.2.036-95 [14]. Пробы до исследования сохраняют на холоду, не замораживая. Материал доставляют в Региональный центр по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней и (или) в Центр индикации,



Рис. 2. Предполагаемый порядок организации работ при проведении лабораторных исследований на наличие возбудителей геморрагических лихорадок Марбург и Эбола

где осуществляется экспресс-диагностика. В случае положительного результата для его лабораторного подтверждения и изоляции возбудителя материал направляется в Референс-центр по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней с функциями в рамках ММСП (2005), Национальный Центр верификации диагностической деятельности в ГНЦ ВБ «Вектор».

Лабораторная диагностика включает в себя комплекс исследований по индикации, экспресс-диагностике, выделению и идентификации вируса, а также по выявлению вирусспецифических антигенов и антител [3, 4, 7, 17, 19, 20, 21]. Индикация возбудителей Марбург и Эбола осуществляется методами экспресс-диагностики: ИФА, МФА, ОТ-ПЦР, электронная микроскопия. Изоляцию вируса обычно проводят на клеточных культурах Vero, VeroE-6, BGM или на животных – морских свинках или обезьянах. Вместе с тем, существуют популяции вирусов, различающиеся по способности инфицировать животных или клеточные культуры. Считается, что в природных очагах, помимо вирулентных, циркулируют также слабовирулентные и авирулентные варианты этих вирусов [16]. Наши данные, полученные при пассажах вирусов Эбола и Марбург на морских свинках, показывают, что для адаптации выделенного в культуре клеток вируса к животным необходимо проведение нескольких серийных пассажей. Чтобы максимально исключить возможность ложноотрицательных результатов при лабораторно-диагностических исследованиях необходимо проведение анализа, основанного на параллельном использовании биопробных животных и клеточных культур в комплексе с методами выявления специфических антигенов и антител [17, 19].

Анализ современной эпидемиологической ситуации показал, что за последние годы происходят существенные изменения эпидемических проявлений болезней, вызываемых вирусами Марбург и Эбола. Очевидна глобализация эпидемического процесса – масштабность, расширение нозоареала, рост заболеваемости, сокращение интервалов между эпидемическими вспышками, увеличение вероятности выноса инфекции из очагов эндемичных территорий. Отмечено также наличие стертых и хронических форм этих инфекций. Кроме того, во всех странах растет доля популяции с иммунодефицитами. В связи с возрастанием эпидемического потенциала сохраняется угроза завоза этих инфекций на территорию страны.

В современных условиях с учетом трехуровневой организационной структуры учреждений Роспотребнадзора представляется целесообразным:

- организация эффективного ежедневного мониторинга эпидситуации по ГЛМ и ГЛЭ в мире с оперативным представлением информации практическим учреждениям санэпидслужбы и здравоохранения; создание группы аналитиков;

- применение ГИС-технологий для визуализации и анализа эпидемиологических проявлений болезней, вызываемых вирусами Марбург и Эбола;

- проведение регулярных тренировочных учений специалистов санэпидслужбы в рамках КЧСиПБ совместно с соответствующими подразделениями инфекционных стационаров (и других служб, играющих вспомогательную роль) на случай выявления подозрительного (больного);

- решение вопросов получения современных сертифицированных тест-систем;

- проведение диагностических исследований в региональных Центрах индикации и диагностики возбудителей опасных инфекционных болезней и Региональных центрах по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней I–II групп патогенности в соответствии с Приказом Роспотребнадзора № 88;

- разработка документов, регламентирующих алгоритм диагностики ГЛМ и ГЛЭ на основе клинических, эпидемиологических и лабораторных критериев.

Работа выполнена по государственному контракту № 54-Д от 23.08.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности) СП 1.3.1285-03. М.; 2003.
2. Борисевич И.В., Маркин В.А., Фирсова И.В., Евсеев А.А., Хамитов Р.А., Максимов В.А. Эпидемиология, профилактика, клиника и лечение геморрагических лихорадок (Марбург, Эбола, Ласса и Боливийской). *Вопр. вирусол.* 2006; 5:8–16.
3. Вирусные геморрагические лихорадки. Доклад комитета экспертов ВОЗ. Женева; 1986. 119 с.
4. Дроздов С.Г., Сергеев В.П. Защита эндемичных территорий от тропических вирусных геморрагических лихорадок. М.: Медицина; 1984. 288 с.
5. Международные медико-санитарные правила. Женева; 2005. 73 с.
6. Онищенко Г.Г., Титенко А.М. Актуальные направления совершенствования санитарно-эпидемиологической охраны территории от завоза и распространения особо опасных вирусных инфекций. *Бюл. ВСНЦ СО РАМН. Иркутск*, 2004; 4(1):110–6.
7. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Сборник нормативно-методических документов по организации работы специализированных противоэпидемических бригад Роспотребнадзора. Саратов: ОАО «Приволжское издательство»; 2008. 216 с.
8. Онищенко Г.Г., Кузькин Б.П., Кутырев В.В., Щербакова С.А., Пакскина Н.Д., Топорков А.В. Актуальные направления совершенствования лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней. *Пробл. особо опасных инф.* 2009; 1(99):5–10.
9. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: Медицина; 2009. 470 с.
10. Онищенко Г.Г., Пакскина Н.Д., Топорков В.П., Топорков А.В., Шиянова А.Е., Кутырев В.В. Научно-методические основы реализации Международных медико-санитарных правил (2005 г.) на территории Российской Федерации. *Пробл. особо опасных инф.* 2010; 3(105):5–12.
11. Организация и проведение первичных мероприятий в случае выявления больного (трупа), подозрительного на заболевание инфекционными болезнями, вызываемыми чрезвычайными ситуациями в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения: Методические указания МУ 3.4.2552-09. М.; 2009. 112 с.
12. Организация, обеспечение и оценка противоэпиде-

мической готовности медицинских учреждений к проведению мероприятий в случае заноса особо опасных инфекций, контагиозных вирусных геморрагических лихорадок, инфекционных болезней неясной этиологии, представляющих опасность для населения Российской Федерации и международного сообщения: Методические указания МУ 3.4.1030-01. М.; 2001. 64 с.

13. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности: Методические указания МУ 1.3. 2569-09. М.; 2009. 80 с.

14. Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности: Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.2.036-95. М.; 1996. 80 с.

15. Санитарная охрана территории Российской Федерации: Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.4.2318-08. М.; 2008. 36 с.

16. Титенко А.М. Геморрагическая лихорадка Марбург. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1991; 5:67–71.

17. Титенко А.М., Новожилов С.С., Андаев Е.И., Борисова Т.И., Куликова Е.В. Репродукция вируса Эбола в клеточных культурах. Вопр. вирусол. 1992; 2:110–3.

18. Титенко А.М. Геморрагическая лихорадка Эбола. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1993; 3:99–105.

19. Титенко А.М., Андаев Е.И., Куликова Е.В., Борисова Т.И. Вирусы Марбург и Эбола: биологические свойства и разработка методов лабораторной диагностики. Журн. инф. патол. Иркутск, 1998; 5(4):75–9.

20. Титенко А.М., Андаев Е.И., Борисова Т.И. Динамика экспрессии антигенов вирусов Марбург и Эбола в инфицированных клетках Vero. Вопр. вирусол. 2001; 46(6):43–5.

21. Титенко А.М., Андаев Е.И., Борисова Т.И. Определение специфических антител к вирусам Эбола и Марбург методом клеточного иммуноферментного анализа. Биотехнология. 2002; 2:5–8.

22. Титенко А.М. Санитарная охрана территорий от завоза и распространения вирусных инфекций. Сообщение 1. Современные подходы. Probl. особо опасных инф. 2002; 2(84):144–50.

23. Титенко А.М., Ботвинкин А.Д., Андаев Е.И. Санитарная охрана территорий от завоза и распространения вирусных инфекций. Сообщение 2. Критерии для анализа нозологических форм. Probl. особо опасных инф. 2003; 85:41–9.

24. Титенко А.М. Санитарная охрана территорий от завоза и распространения вирусных инфекций. Сообщение 3. Дифференциация инфекций по категориям значимости. Probl. особо опасных инф. 2004; 86:48–53.

25. Титенко А.М. Факторы, способствующие появлению и обнаружению новых вирусных инфекций. Эпидемиол. и инф. бол. 2004; 1:51–5.

26. Черкасский Б.Л. Особо опасные инфекции. М.: Медицина; 1996. 160 с.

27. Черкасский Б.Л. Руководство по общей эпидемиологии. М.: Медицина; 2001. 560 с.

28. Allela L., Boury O., Pouillot R., Delicat A., Yaba P., Kumulungui B. et al. Ebola virus antibody prevalence in dogs and human risk. Emerg. Infect. Dis. 2005; 11(3):385–90.

29. Bausch D.G., Borchert M., Grein T., Roth C., Swanepoel R. Risk Factors for Marburg Hemorrhagic Fever, Democratic Republic of the Congo. Emerg. Infect. Dis. 2003; 9(12):531–7.

30. Fieldman H. Emerging and reemerging of filoviruses. Arch. Virol. 1996; 11:77–100.

31. Gonzalez J.P., Nacoune E., Slenczka W., Vidal P, Morvan J.M. Ebola and Marburg virus antibody prevalence in selected population of the Central African Republic. Microbes Infect. 2000; 2(1):39–44.

32. Heffernan R.T., Pambo B., Hatchett R.J., Leman P.A., Swanepoel R., Ryder R.W. Low seroprevalence of IgG antibodies to Ebola virus in an epidemic zone: Ogooue-Ivindo region, Northeastern Gabon, 1997. J. Infect. Dis. 2005; 191(6):964–8.

33. Laboratory biosafety manual. World Health Organization: Geneva; 2003. 99 p.

34. Leroy E.M., Telfer P., Kumulungui B., Yaba P., Rouquet P., Roques P. et al. A serological survey of Ebola virus infection in central African nonhuman primates. J. Infect. Dis. 2004; 190(11):1895–9.

35. Martini G.A., Sitgert R., editors. Marburg virus disease. New York: Springer-Verlag; 1971. 231 p.

36. Swanepoel R., Smit S.B., Rollin P.E., Formenty P., Leman P.A. Studies of reservoir hosts for Marburg virus. Emerg. Infect. Dis. 2007; 13(12):1847–51.

37. Titenko A.M. Probable Role of Especially Dangerous Viral Infections in Occurrence of Extreme Situations. Scientific journal: Ulaanbaatar, 2003; 11:200–7.

38. WHO experts consultation on Ebola Reston pathogenicity in humans. Geneva: Switzerland; 2009. P. 7–22.

39. Wkly. Epidemiol. Rec. World Health Organization. Geneva: Switzerland. 1975–2010.

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

1. “Safety of work with microorganisms of the I–II groups of pathogenicity” SR 1.3.1285-03. М.; 2003.

2. Borisevich I.V., Markin V.A., Firsova I.V., Eyseev A.A., Khamitov R.A., Maksimov V.A. [Epidemiology, prophylaxis, clinical picture and treatment of Marburg, Ebola, Lassa and Bolivian hemorrhagic fevers]. Vopr. Virusol. 2006; 5:8–16.

3. Viral Hemorrhagic Fevers. Report of the WHO Committee of Experts. Geneva; 1986. 119 p.

4. Drozdov S.G., Sergiev V.P. [Protection of Non-Endemic Territories from Tropical Viral Hemorrhagic Fevers]. М.; 1984. 288 p.

5. International Health Regulations. Geneva; 2005. 73 p.

6. Onishchenko G.G., Titenko A.M. [Current trends in the development of sanitary-epidemiological protection of the territories from importation and dissemination of particularly dangerous viral infections]. Bull. Sibirsk. Otd. RAMS. 2004; 4(1):110–6.

7. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Corpus of the Normative Documents Regulating Organization of Work of the Rosпотребнадзор Specialized Anti-Epidemic Teams]. Saratov; 2008. 216 p.

8. Onishchenko G.G., Kouckin B.P., Kutyrev V.V., Scherbakova S.A., Paksina N.D., Toporkov A.V. [Current trends of perfection of laboratory diagnostics of particularly dangerous infectious diseases]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2009; (99):5–10.

9. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. М.; 2009. 470 p.

10. Onishchenko G.G., Paksina N.D., Toporkov V.P., Toporkov A.V., Shiyanova A.E., Kutyrev V.V. [Methodological principles of implementation of International Health Regulations (2005) in the Territory of the Russian Federation]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; (105):5–12.

11. [Organization and carrying-out of essential measures in case of detection of a suspect (a corps) with infectious disease resulting in emergency situation in the sphere of sanitary-epidemiological welfare of the population: MR 3.4.2552-09]. М.; 2009. 112 p.

12. [Organization, implementation and evaluation of anti-epidemic preparedness program in health care institutions, consisting in carrying-out the measures in case of importing particularly dangerous infectious disease, or contagious viral hemorrhagic fevers, or infectious diseases of unknown etiology that are of a serious hazard to the population of both the Russian Federation and world community: MR 3.4.1030-01]. М.; 2001. 64 p.

13. [Organization of the activities in the laboratories practicing with amplification of nucleic acids when working with the materials containing microorganisms that fall into I–II groups of pathogenicity: MR 11.3.2569-09]. М.; 2009. 42 p.

14. [Method of registration, storage, transfer, and transportation of microorganism that fall into I–II groups of pathogenicity: SR 1.2.036-95]. М.; 1996. 80 p.

15. [Sanitary Protection of the Russian Federation Territories: SR 3.4.2318-08]. М.; 36 p.

16. Titenko A.M. [Marburg hemorrhagic fever]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1991; 5:67–71.

17. Titenko A.M., Novozhilov S.S., Andaev E.I., Borisova T.I., Kulikova E.V. [Reproduction of Ebola virus in cell cultures]. Vopr. Virusol. 1992; 2:110–3.

18. Titenko A.M. [Ebola hemorrhagic fever]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1993; 3:99–105.

19. Titenko A.M., Andaev E.I., Kulikova E.V., Borisova T.I. [Marburg and Ebola viruses: biological properties and development of the methods of laboratory diagnostics]. Zh. Infek. Patol. 1998; 5(4):75–9.

20. Titenko A.M., Andaev E.I., Borisova T.I. [Dynamics of antigen expression of Marburg and Ebola viruses within infected Vero cells]. Vopr. Virusol. 2001; 46(6):43–5.

21. Titenko A.M., Andaev E.I., Borisova T.I. [Detection of specific antibodies to Ebola and Marburg viruses using cell-bond enzyme-linked immunoassay]. Biotechnologiya. 2002; 2:5–8.

22. Titenko A.M. [Sanitary protection of territories from importation and spread of viral infections. Communication 1. Present-day approaches]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2002; (84):144–50.

23. Titenko A.M., Botvinkin A.D., Andaev E.I. [Sanitary and epidemiologic protection of territories from import and dissemination of viral infections. Communication 2. Criteria for the analysis of nosologic forms]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2003; (85):41–9.

24. Titenko A.M. [Sanitary and Epidemiologic Protection of Territories from Import and Dissemination of Viral Infections. Communication 3. Differentiation of Infections According to Their Importance]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2004; (86):48–53.

25. Titenko A.M. [Factors contributing to the emergence and discovering of new viral infections]. Epidemiol. Infek. Bol. 2004; 1:51–5.

26. Cherkassky B.L. [Particularly Dangerous Infectious Diseases]. М.; 1996. 160 p.

27. Cherkassky B.L. [Guidelines on General Epidemiology]. М.; 2001. 560 p.

### Authors:

Titenko A.M., Andaev E.I. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russia. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

### Об авторах:

Титенко А.М., Андаев Е.И. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Поступила 19.04.12

Г.А.Ерошенко, Н.А.Видяева, Л.М.Куклева, Е.И.Кошель, Г.Н.Одинок, Н.Ю.Шавина, Т.В.Князева, Т.В.Мокроусова, Я.М.Краснов, Л.В.Анисимова, Л.А.Новичкова, П.С.Ерохин, А.В.Бойко, В.В.Кутырев

**ИЗУЧЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЕНКИ  
У БЕСПИГМЕНТНЫХ И БЕСПЛАЗМИДНЫХ МУТАНТОВ ШТАММА *YERSINIA PESTIS*  
НА БИОТИЧЕСКИХ ПОВЕРХНОСТЯХ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* И *IN VIVO***

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

У беспиgmentных и бесплазмидных мутантов – изогенных вариантов высоковирулентного штамма *Yersinia pestis* 231 – проведено изучение образования биопленки на биотических поверхностях в условиях *in vitro* (на лабораторной модели нематоды *Caenorhabditis elegans*) и *in vivo* (в пищеварительном тракте блохи *Nosopsyllus laeviceps*). Установлено, что причиной спонтанной потери способности к формированию биопленки и образованию пигментированных колоний может быть не только делеция всей хромосомной области пигментации, но и точечная мутация в структурном *hms* опероне. Показано, что отсутствие плазмид *pCad*, *pFra* или *pPst* не влияет на способность бесплазмидных мутантов формировать биопленку на кутикуле нематоды *C. elegans*.

*Ключевые слова:* возбудитель чумы, мутанты, биопленка, биотическая поверхность

G.A.Eroshenko, N.A.Vidyaeva, L.M.Kukleva, E.I.Koshel', G.N.Odinokov, N.Yu.Shavina, T.V.Knyazeva, T.V.Mokrousova, Ya.M.Krasnov, L.V.Anisimova, L.A.Novichkova, P.S.Erokhin, A.V.Boiko, V.V.Kutyrev

**Studies of Biofilm Formation in Non-Pigmented and Plasmid-Deprived Mutants of *Yersinia pestis* on Biotic Surfaces, *in vivo* and *in vitro* Conditions**

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

In non-pigmented and plasmid-deprived mutants – isogenic variants of highly virulent *Yersinia pestis* 231 strain – studied is the mechanism of biofilm formation on biotic surfaces, both *in vitro* (on the laboratory model of nematode *Caenorhabditis elegans*) and *in vivo* (inside the alimentary tract of *Nosopsyllus laeviceps* flea). It is determined that spontaneous loss of ability to form biofilms and generate pigmented colonies in the mutants is probably caused not only by the deletion of the whole chromosome pigmentation fragment, but also by a point(single base) mutation in structural *hms* operon. It is demonstrated that the absence of *pCad*, *pFra* or *pPst* plasmids does not have an impact on the ability of plasmid-deprived mutants to form biofilm on the cuticle of nematode *C. elegans*.

*Key words:* plague agent, mutants, biofilm, biotic surface.

Возбудитель чумы *Yersinia pestis* имеет сложный жизненный цикл, включающий пребывание в теплокровном хозяине (37 °С, богатая питательная среда, воздействие иммунной системы) и пищеварительном тракте переносчика – блохи (28 °С, ограниченные питательные ресурсы, действие пищеварительных ферментов насекомого). Смена фазы жизненного цикла, связанная с переходом из теплокровного организма в переносчика – блоху, приводит к перестройке метаболических процессов возбудителя и прекращению образования факторов патогенности, необходимых для выживания и размножения в условиях организма млекопитающих. Под действием сигналов (в том числе и снижения температуры до 28 °С), поступающих из внешней среды, возбудитель чумы переходит в состояние биопленки – многослойного скопления клеток, погруженных в экзополисахаридный матрикс. В пищеварительном тракте блохи, куда возбудитель попадает с кровью, на акантах преджелудка он образует массивную биопленку – «чумной блок», наличие которого повышает эффективность трансмиссии *Y. pestis* [6, 8].

За биосинтез биопленки у *Y. pestis* отвечает целый

ряд генов, в том числе и гены, расположенные в хромосомной области пигментации [7, 13]. Хромосомная *pgm* область имеет размер 102 т.п.н. и фланкирована двумя копиями *IS100* элементов, гомологичная рекомбинация по которым может явиться причиной спонтанной потери (с частотой 10<sup>-5</sup>) всей этой области [11]. Такая мутация вызывает утрату способности клеток *Y. pestis* образовывать пигментированные колонии на среде с гемином или Конго красным и приводит к авирулентности штаммов [11, 12, 14]. За образование пигментированных колоний (вследствие адсорбции красителя на поверхности клеток) и формирование биопленки отвечает один и тот же locus хромосомной области пигментации – оперон *hmsHFRS* [7, 8]. Другой участок *pgm* области – остров высокой патогенности НПИ – включает *ybt* регион с генами иерсиниабактин-сидерофорзависимой системы транспорта железа и геном *psn*, кодирующим рецептор комплекса *Ybt-Fe*, а также чувствительность к видоспецифическому бактериоцину – пестицину. Наличие острова патогенности НПИ, наряду с плазмидой кальцийзависимости *pCad*, кодирующей систему секреции III типа, является обязательным для

проявления вирулентности возбудителем чумы [14].  
 К настоящему времени установлено, что для формирования биопленки *Y. pestis* необходимы также гены биосинтеза гептозы *gmhA*, полиаминов *speA*, *speC*, сенсорной регуляторной двухкомпонентной системы PhoP/PhoQ и др. [9, 15, 16]. Однако несмотря на интенсивное исследование феномена образования биопленки у возбудителя чумы, генетические основы механизмов ее формирования остаются исследованными далеко недостаточно.

Целью нашей работы было изучение влияния различных мутаций в геноме штаммов возбудителя чумы на образование ими биопленки на биотических поверхностях в условиях *in vitro* – на модели круглого червя нематоды *C. elegans* и *in vivo* – в блохах *Nosopsyllus laeviceps*.

### Материалы и методы

В работе использован набор беспигментных и бесплазмидных спонтанных мутантов, полученных из высоковирулентного штамма *Y. pestis* 231 [14], а также вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ (табл. 1). Штаммы культивировали на 1,5 % агаре и в бульоне LB (рН 7,2) при 28 °С в течение 18–24 ч. Выделение ДНК штаммов проводили общепринятым способом [5]. Определение способности штаммов образовывать пигментированные колонии осуществляли выращиванием культур в течение 4 дней при 28 °С на твердой синтетической среде с Конго красным для изучения признака пигментации (производство РосНИПЧИ «Микроб»).

Изучение образования биопленки на биотической поверхности *in vitro* проводили на лабораторной модели – нематоды *Caenorhabditis elegans* (штамм N2 Bristol). Штамм получен из *Caenorhabditis Genetics Center* (Университет Миннесоты, США). На газон бактериальной культуры, выращенной на NGM агаре при комнатной температуре, наносили 20 взрослых особей для откладывания яиц, которых потом удаляли [8, 10]. Чашки инкубировали при 20 °С в течение 48 ч. О наличии у штамма способности к формированию биопленки судили по образованию этим штаммом массивного скопления клеток на головной и других частях тела нематод.

Исследование способности к формированию

биопленки на биотической поверхности *in vivo* осуществляли с использованием блох *Nosopsyllus laeviceps*. Инфицирование блох проводили на биомембране с заражающей взвесью бактерий 10<sup>9</sup> КОЕ/мл [2]. С интервалом в 2 сут блох, зараженных *Y. pestis*, подкармливали на белых мышах, а часть зараженных блох (по 10 шт. на каждый штамм) растирали с физраствором, взвесь наносили на покровные стекла, обрабатывали 2,5 % глутаральдегидом и затем просматривали на атомно-силовом микроскопе Solver P47-Pro (NT-MDT, Россия).

Для детекции генов использованы рассчитанные нами специфические праймеры на гены *hmsHFRS*, *irp-2*, *psn*:

*hmsS-L* CGCCCCTGATTTTACGG и *hmsS-R* CATCCCTGGCGTAAATGG;  
*hmsR-As* ACTCATCCTATGTCTGGTG и *hmsR-As* GACCAGATATTCAGTGG;  
*hmsF-SAAGACAGCACAGGGCGGAC* и *hmsF-R* TCCGTGGCCACAGGTA;  
*hmsH-S* CTTCTGCCTATATTGACCG и *hmsH-As* GATGCCATTCTTGTAGCG;  
*Irp2-S* ATGATTTCTGGCGCACCA и *Irp2-As* AGGCGATATGCAGCATTG;  
*Psn-S* ACACAATATCACGGCAGC и *Psn-AS* ACCAGATTAACCGCCAGTC.

Аmplифицированные фрагменты генов у штаммов *Y. pestis* секвенировали на генетическом анализаторе модели «CEQ 8000» (Beckman Coulter). Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей генов осуществляли с использованием алгоритма BLAST (NCBI) и программного обеспечения MEGA 5.0.

### Результаты и обсуждение

Изучение влияния различных мутаций на образование биопленки на биотической поверхности проводили с использованием коллекции изогенных мутантов, полученных из вирулентного штамма *Y. pestis* 231. Из этого штамма ранее были изолированы два спонтанных беспигментных мутанта [14]. Один из них *Y. pestis* 231/3 был получен селекцией на синтетической среде с красителем Конго красным путем отбора беспигментных колоний. Отобранный мутант *Y. pestis* 231/3, кроме потери способности об-

Таблица 1

Использованные в работе штаммы *Y. pestis*

Штамм <i>Y. pestis</i>	Происхождение	Характеристика	Образование биопленки/ пигментсорбция
231	Природный штамм, выделен в 1947 г. в Аксайском высокогорном очаге чумы	Вирулентный	+/+
231/3	Производный штамма 231	Авирулентный, Pst <sup>+</sup>	-/-
KM130	«	Вирулентный, Pst <sup>+</sup>	-/-
231 pCad <sup>-</sup>	«	Авирулентный, Pst <sup>+</sup>	+/+
231 pFra <sup>-</sup>	«	Вирулентный, Pst <sup>+</sup>	+/+
231 pPst <sup>-</sup>	«	Вирулентный, Pst <sup>+</sup>	+/+
EVНИИЭГ	Выделен от трупа человека в 1926 г. на о. Мадагаскар	Авирулентный, Pst <sup>+</sup>	-/-

разовывать пигментированные колонии, также полностью утратил вирулентность и чувствительность к видоспецифическому бактериоцину – пестицину (Pst<sup>r</sup> фенотип). Другой беспигментный мутант *Y. pestis* 130 был отобран путем высева органов морской свинки, павшей при заражении штаммом 231. Этот штамм в отличие от предыдущего беспигментного мутанта не потерял вирулентности и пестицинчувствительности. Кроме этих двух беспигментных мутантов, в работе были использованы бесплазмидные мутанты – производные штамма *Y. pestis* 231, спонтанно утратившие одну из плазмид чумного микроба: кальцийзависимости – pCad, пестициногенности – pPst или фракционную плазмиду pFra. Все три бесплазмидных варианта сохранили способность формировать пигментированные колонии на среде с красителем и пестицинчувствительность (Pgm<sup>+</sup> Pst<sup>s</sup> фенотип).

Для выяснения характера мутаций, вызвавших Pgm<sup>-</sup> фенотип у производных штамма *Y. pestis* 231 – 231/3 и 130, нами были рассчитаны праймеры на разные участки хромосомной области пигментации: гены *hmsHFRS* оперона, острова патогенности НР1 – *irp2* и *psn*, а также на регуляторные гены *hmsT* и *hmsP* [10], контролирующие *hms* оперон и расположенные вне *pgm* области. В ПЦР с помощью этого набора праймеров была исследована структура *pgm* области у беспигментных мутантов *Y. pestis* 231/3 и 130 (табл. 2).

Как следует из табл. 2, у беспигментного мутанта *Y. pestis* 231/3 отсутствовали все гены *hmsHFRS* оперона, гены острова НР1 – *irp2* и *psn*. Аналогичную характеристику имел и изученный нами штамм *Y. pestis* EVНИИЭГ, у которого также не выявлялись гены *hms* локуса и острова высокой патогенности НР1. Ранее было показано, что у вакцинного штамма EV НИИЭГ отсутствует вся область пигментации вследствие обширной делеции в этом участке хромосомы [4]. Этот факт, а также высокая частота спонтанной утраты хромосомной области пигментации (10<sup>-5</sup>) позволяют с высокой степенью вероятности предположить потерю у беспигментного мутанта *Y. pestis* 231/3 всей области пигментации, в том числе и генов структурного *hms* оперона, необходимого для образования биопленки.

Таблица 2

Детекция в ПЦР генов хромосомной области пигментации у использованных в работе штаммов *Y. pestis*

Штамм \ Ген	<i>hmsH</i>	<i>hmsF</i>	<i>hmsR</i>	<i>hmsS</i>	<i>irp2</i>	<i>psn</i>	<i>hmsT</i>	<i>hmsP</i>
231	+	+	+	+	+	+	+	+
231/3	-	-	-	-	-	-	+	+
130	+	+	+	+	+	+	+	+
EVНИИЭГ	-	-	-	-	-	-	+	+
231 pCad <sup>-</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+
231 pFra <sup>-</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+
231 pPst <sup>-</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+

Pgm<sup>-</sup> фенотип другого беспигментного мутанта – *Y. pestis* 130 был вызван, очевидно, другой мутацией, поскольку в отличие от штамма *Y. pestis* 231/3 он сохранил высокую вирулентность и пестицинчувствительность. ПЦР-анализ штамма *Y. pestis* 130 показал, что он содержит все гены *hms* оперона и гены острова патогенности НР1 – *irp2* и *psn*. Это означает, что его Pgm<sup>-</sup> фенотип не связан с потерей всей *pgm* области, а скорее с мутацией, затрагивающей структуру самого *hms* оперона. Для ее выявления нами были секвенированы амплифицированные в ПЦР фрагменты генов *hmsHFRS*. Последовательности фрагментов всех 4 генов были полностью идентичными у исходного штамма *Y. pestis* 231 и его беспигментного мутанта *Y. pestis* 130, за исключением единственной выявленной нами точечной мутации в гене *hmsH* – делеции единичного нуклеотида (-A) в позиции 254 от начала секвенированного в ПЦР фрагмента гена. Делеция единичного нуклеотида приводит к сдвигу рамки считывания гена *hmsH* и нарушению последовательности кодируемого геном структурного белка HmsH, необходимого для образования пигментированных колоний и формирования биопленки. Таким образом, причина отсутствия формирования биопленки и образования пигментированных колоний на среде с красителем у беспигментного мутанта *Y. pestis* 130 вызвана нарушением последовательности одного из структурных *hms* генов.

Для изучения влияния выявленных мутаций на образование биопленки на биотической поверхности в условиях *in vitro* нами была использована лабораторная модель круглого червя – нематоды *C. elegans* штамм N2 Bristol. На газон 18-часовых культур изучаемых штаммов наносили нематод, посеы инкубировали в течение 48 часов, после чего их просматривали для выявления образования биопленки на кутикуле червей. Штамм *Y. pestis* 231 образовывал хорошо видимую биопленку на головной и других частях туловища нематод (рис. 1, А), в то время как беспигментные мутанты 231/3 и 130 не образовывали ее (рис. 1, Б, В). Это означает, что оба типа мутаций – потеря всей области пигментации и точечная мутация в структурном гене *hms* оперона – вызывают потерю способности формировать биопленку на биотической поверхности – на кутикуле нематоды *C. elegans*.

На этой модели нами также было исследовано образование биопленки бесплазмидными мутантами штамма *Y. pestis* 231, поскольку ранее изучение влияния отсутствия плазмид чумного микроба на формирование биопленки на кутикуле нематод не проводилось. В результате проведенных экспериментов установлено, что потеря плазмид *Y. pestis* не приводит к нарушению проявления этого свойства. Все три бесплазмидных мутанта, спонтанно утративших плазмиды кальцийзависимости (*Y. pestis* 231 pCad<sup>-</sup>), пестициногенности (*Y. pestis* 231 pPst<sup>-</sup>) или фракционную (*Y. pestis* 231 pFra<sup>-</sup>), в отличие от беспигментных изогенных мутантов, обладали способностью формировать биопленку *in vitro* на кутикуле немато-



Рис. 1. Изучение образования биопленки на модели нематоды *C. elegans* штаммами *Y. pestis*: А – 231 исходный; Б – 231/3; В – 130; Г – 231 pCad<sup>-</sup>; Д – 231 pPst<sup>-</sup>; Е – 231 pFra<sup>-</sup>

ды *C. elegans* (рис. 1, Г, Д, Е), и, следовательно, гены, расположенные на плаزمиде, не оказывали влияния на проявление этого свойства.

Нами была также исследована способность изогенных беспигментных мутантов *Y. pestis* 231, 231/3 и 130 образовывать биопленку в условиях *in vivo* – в пищеварительном тракте блохи *N. laeviceps*. Инфицирование блох проводили на биомембране с заражающей взвесью бактерий  $10^9$  КОЕ/мл [2]. Через 48 ч после заражения по 10 блох каждого штамма растирали с физраствором, и взвесь наносили на покровные стекла, фиксировали 2,5 % глутаральдегидом для дальнейшего просмотра на атомно-силовом микроскопе (рис. 2).

Через 2 сут после заражения штамм *Y. pestis* 231 содержался в преджелудке блох *N. laeviceps* в достаточно высокой концентрации ( $10^3$ – $10^4$  КОЕ). С помощью атомно-силовой микроскопии у культуры штамма 231, выделенной от блох, выявлена структура биопленки (рис. 2, А). После второй подкормки на 4-е сутки после заражения штаммом *Y. pestis* 231 обнаруживались заблокированные блохи, содержащие массивную биопленку – «чумной блок» в преджелудке. В отличие от исходного штамма беспигментные мутанты – *Y. pestis* 231/3 и 130 выделялись от блох через 48 ч в низкой концентрации ( $10^1$  и  $10^2$  КОЕ) и в виде отдельных несвязанных между собой клеток (рис. 2, Б, В). После второй подкормки на 4-е сутки культуры *Y. pestis* 231/3 и 130 от блох уже не выделялись, что свидетельствовало об их полном вымывании из блох из-за отсутствия способности колонизировать пищеварительный тракт насекомого.

В целом, беспигментные изогенные мутанты штамма *Y. pestis* 231 – 231/3 и 130 независимо от того,

какой тип мутаций они содержали – утрату всей области пигментации или точечную мутацию в одном из генов *hms* локуса – не образовывали биопленку на биотической поверхности *in vitro* – на кутикуле нематоды *C. elegans*, а также *in vivo* – в пищеварительном тракте блохи *N. laeviceps*. Это подтверждает ранее сделанный вывод о том, что сохранение структурно-функциональной целостности генов именно *hms* оперона необходимо для образования биопленки не только *in vitro* – на кутикуле нематоды *C. elegans*, но и *in vivo* – в блохе [8].

Изучение образования биопленки бесплазмидными вариантами штамма *Y. pestis* 231 в блохах нами не проводилось, поскольку такие исследования были выполнены в полном объеме ранее другими авторами, показавшими, что отсутствие плазмид pPst и pCad не приводит к снижению эффективности формирования «чумного блока» в преджелудке блохи [3]. В то же время было установлено, что штаммы *Y. pestis*, лишенные плазмиды pFra, с низкой частотой вызывали образование блока в преджелудке блохи [1], что, по-видимому, было связано с их сниженной выживаемостью в пищеварительном тракте переносчика из-за отсутствия фосфолипазы Д, кодируемой геном *ymt*, локализованном на этой плазмиде. Эти данные указывают на то, что существуют различия в формировании биопленки на кутикуле нематод и в пищеварительном тракте блох у штаммов *Y. pestis*, лишенных плазмиды pFra, в отличие от pCad<sup>-</sup> и pPst<sup>-</sup> вариантов, эффективно образующих биопленку на обоих типах биотических поверхностей.

Таким образом, нами впервые получены данные о том, что спонтанная потеря способности к образованию биопленки может быть вызвана не только

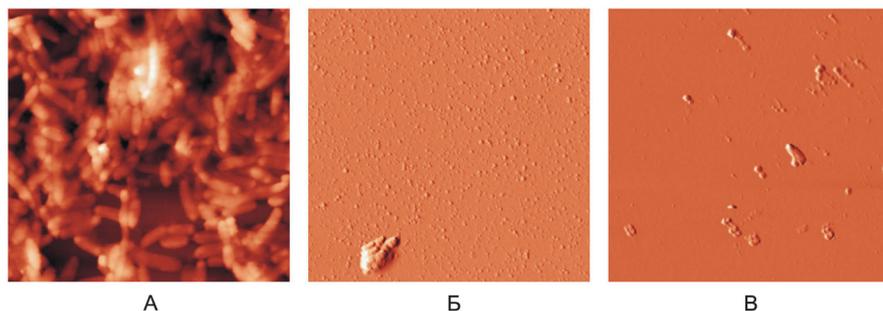


Рис. 2. Изучение образования биопленки в блохах у штаммов *Y. pestis* 231 (А), 231/3 (Б) и 130 (В) с помощью атомно-силовой микроскопии. Размер АСМ изображения составляет 20×20 мкм

делецией всей области пигментации, как это было описано ранее [11], но и точечной мутацией в структурном *hms* опероне. Поскольку этот тип мутаций обнаружен у штамма *Y. pestis*, выделенного из теплокровного животного и с учетом того, что другой тип Pgm<sup>-</sup> мутации (потеря *pgm* области) в природе также встречается у штаммов, выделенных от носителей – грызунов и переносчиков (блох), то это означает, что пребывание в макроорганизме может сопровождаться преобразованиями генома возбудителя, приводящими к изменению его вирулентности и адаптационных возможностей при смене фаз существования в его сложном жизненном цикле.

Работа выполнена по государственному контракту № 70-Д от 25 июля 2011 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Величко Л.Н., Князева Т.В., Анисимов А.П., Назарова Л.С., Мокроусова Т.В., Кокушкин А.М. и др. Влияние экспрессии генов Fга оперона *Yersinia pestis* на трансмиссивный и алиментарный пути передачи чумы грызунами. Пробл. особо опасных инф. 2000; 80:127–32.
2. Величко Л.Н., Кокушкин А.М., Князева Т.В., Мокроусова Т.В., Марысаев В.Б. Применение аппарата для работы с инфицированными чумой блохами. Пробл. особо опасных инф. 1994; 4:49–55.
3. Кокушкин А.М., Величко Л.Н., Князева Т.В., Анисимов П.И., Мокроусова Т.В. Изучение роли собственных плазмид и признака пигментсорбции в способности бактерий чумы инфицировать блох и вызывать у них блокообразование. В кн.: Природно-очаговые инфекции и их профилактика. Саратов; 1991. С. 110–8.
4. Кутырев В.В., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Виноградова Н.А. Сравнительная генетическая характеристика вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV и его предполагаемых «вирулентных производных». Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2009; 4:50–6.
5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
6. Bacot AW, Martin CJ. Observation on the mechanism on the transmission of by fleas. J. Hyg. Plague Suppl. 1914; 3:423–39.
7. Bobrov A.G., Kirillina O., Ryjenkov D.A., Waters C.M., Price P.A., Fetherston J.D. et al. Systemic analysis of cyclic di-GMP signaling enzymes and their role in biofilm formation and virulence in *Yersinia pestis*. Mol. microbiol. 2011; 79:533–51.
8. Darby C, Hsu J.W., Ghori N., Falkow S. *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. Nature. 2002; 417:243–4.
9. Darby C, Ananth S.L., Tan L., Hinnebusch B.J. Identification of *gmhA*, a *Yersinia pestis* gene required for flea blockage, by using a *Caenorhabditis elegans* biofilm system. Infect. Immun. 2005;

73:7236–42.

10. Eroshenko G.A., Vityaeva 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.

11. Fetherston J.D., Schuetze, P., Perry, R.D. Loss of the pigmentation phenotype in *Yersinia pestis* is due to the spontaneous deletion of 102 kb of chromosomal DNA which is flanked by a repetitive element. Mol. Microbiol. 1992; 6:512693–704.

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

13. Kirillina O., Fetherston J., Bobrov A., Abney J., Perry R. HmsP, a putative phosphodiesterase, and HmsT, a putative diguanylate cyclase, control Hms-dependent biofilm formation in *Yersinia pestis*. Mol. Microbiol. 2004; 54:75–88.

14. Kutyrev V.V., Filippov A.A., Oparina O.S., Protsenko O.A. Analysis of *Yersinia pestis* chromosomal determinants Pgm<sup>+</sup> and Pst<sup>+</sup> associated with virulence. Microb. Pathog. 1992; 12(3):177–86.

15. Patel C.N., Wortham B.W., Lines J.L., Fetherston J.D., Perry R.D., Oliveira M.A. Polyamines are essential for the formation of plague biofilm. J. Bacteriol. 2006; 188:2355–63.

16. Vadivaloo V.V. PhoP regulation of *Yersinia pestis* during flea infection. In: «Yersinia 2010». 10 th. Intern. Symp.; Oct. 23–27, 2010; Brazil. P. 67.

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

1. Velichko L.N., Knyazeva T.V., Anisimov A.P., Nazarova L.S., Mokrousova T.V., Kokushkin A.M. et al. [Effect of Fga gene expression of *Yersinia pestis* operon on the vector-borne and alimentary routes of plague transmission by rodents]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2000; 80:127–32.
2. Velichko L.N., Kokushkin A.M., Knyazeva T.V., Mokrousova T.V., Marysaev V.B. [Usage of the equipment for work with plague infected fleas]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 1994; 4:49–55.
3. Kokushkin A.M., Velichko L.N., Knyazeva T.V., Anisimov P.I., Mokrousova T.V. [Studies of the impact of intrinsic (inherent) plasmids and pigment-sorption characteristic on the plague agent ability to infect fleas and initiate block-formation in them]. In: [Natural Foci Infections and Their Prophylaxis]. Saratov; 1991. P. 110–8.
4. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Kukleva L.M., Shavina N.Yu., Vinogradova N.A. [Comparative genetic characterization of the vaccine *Yersinia pestis* EV strain and its potential “virulent derivatives”]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2009; 4:50–6.
5. Maniatis T., Fritch E., Sambrook G. [Molecular cloning]. M., 1984. 480 p.

#### Authors:

Eroshenko G.A., Vityaeva N.A., Kukleva L.M., Koshel' E.I., Odinokov G.N., Shavina N.Yu., Knyazeva T.V., Mokrousova T.V., Krasnov Ya.M., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Erokhin P.S., Boiko A.V., 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., Видяева Н.А., Куклева Л.М., Кошель Е.И., Одинокоев Г.Н., Шавина Н.Ю., Князева Т.В., Мокроусова Т.В., Краснов Я.М., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Ерохин П.С., Бойко А.В., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 20.12.11.

Т.А.Полунина, Н.П.Гусева, М.Н.Киреев, Т.М.Тараненко, З.Л.Девдариани, С.П.Заднова,  
Е.М.Кузнецова, А.В.Степанов, С.Н.Клюева, Т.Л.Захарова

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ И ИММУНОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТОВ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА ЧУМНОГО МИКРОБА, ВЫДЕЛЕННЫХ РАЗНЫМИ МЕТОДАМИ

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

Проведено сравнительное изучение некоторых физико-химических и иммунохимических свойств ЛПС чумного микроба, выделенного разными методами, и деградированного ПС. Установлено, что препараты ЛПС *Y. pestis* EV 28 °С, выделенные водно-фенольной экстракцией по Вестфалю (ЛПС<sup>W</sup>) и ферментативным методом по Darveau (ЛПС<sup>D</sup>), являются типичными R-гликолипидами с молекулярной массой (8,1±3,2) кДа. Все серии ЛПС<sup>W</sup>, ЛПС<sup>D</sup> и деградированного ПС хорошо растворимы в воде и 0,9 % растворе NaCl, гомогенны, характеризуются достаточной степенью чистоты. Кроме того, показано, что ПС является наиболее перспективным фрагментом молекулы ЛПС при конструировании чумных иммунодиагностических препаратов, т.к., обладая меньшей цитотоксичностью, сохраняет идентичность химического состава и иммунохимическую специфичность эндотоксина.

*Ключевые слова:* липополисахарид, деградированный полисахарид, *Yersinia pestis*.

T.A.Polunina, N.P.Guseva, M.N.Kireev, T.M.Taranenko, Z.L.Devdariani, S.P.Zadnova, E.M.Kuznetsova,  
A.V.Stepanov, S.N.Klyueva, T.L.Zakharova

## Comparative Study of Some Physical-Chemical and Immunochemical Properties of Plague Microbe Lipopolysaccharide Preparations Obtained with the Help of Different Techniques

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Carried out is the comparative study of some physical-chemical and immunechemical properties of plague microbe lipopolysaccharide, extracted with the help of different techniques and dehydrated by polysaccharide. Determined is the fact that lipopolysaccharide preparations of *Y. pestis* EV 28 °C, isolated by means of aqueous-phenol extraction according to Westphal (LPS<sup>W</sup>) and fermentation method according to Darveau (LPS<sup>D</sup>), are typical R-glycolipids with molar mass equal to (8,1±3,2) kDa. All series of LPS<sup>W</sup>, LPS<sup>D</sup>, and degraded polysaccharide (PS) are easily soluble in water and in 0,9 % NaCl solution. They are homogenous and characterized by an adequate degree of purity. Aside from that, it is demonstrated that potentially PS is the most productive molecule fragment of LPS for the construction of plague immunodiagnostic preparation, since despite its decreased cytotoxicity PS retains identity of chemical composition and immunechemical specificity of endotoxin.

*Key words:* lipopolysaccharide, degraded polysaccharide, *Yersinia pestis*.

Создание высокоэффективных диагностических препаратов, особенно для идентификации атипичных штаммов возбудителя чумы, остается актуальной проблемой для отечественного здравоохранения.

Липополисахарид (ЛПС), являющийся основным компонентом клеточной стенки бактерий и мощным модулятором иммунной реактивности макроорганизма, нашел широкое применение в диагностике многих инфекционных заболеваний.

Отличительной особенностью ЛПС *Yersinia pestis* является его принадлежность к R-хемотипу, т.к. он построен по типу гликолипида, лишённого O-специфических антигенных цепей, присутствующих в ЛПС большинства грамотрицательных бактерий. Установлено, что наличие у возбудителя чумы шероховатой формы ЛПС объясняется тем, что кластер генов O-антигена не функционирует в результате нескольких мутаций [14]. Синтез ЛПС у чумного микроба конститутивен, однако строение и биологические свойства эндотоксина существенно зависят от температуры выращивания и способов выделения [3, 4, 12]. Биологические свойства молекулы ЛПС определяются различными его структурными фраг-

ментами, так за токсичность и пирогенность отвечает липид А, а иммунохимическая специфичность зависит от структуры полисахаридной части, представленной 8 сахарами, так называемого core-региона [2, 7]. Имеются данные о наличии у полисахарида (ПС) кора *Y. pestis* видо- и родоспецифических детерминантов [9].

Цель работы состояла в сравнительном изучении некоторых физико-химических и иммунохимических свойств ЛПС чумного микроба, полученного разными методами, и деградированного ПС как одного из его диагностически значимых фрагментов.

### Материалы и методы

Для получения ЛПС были использованы два метода: классическая водно-фенольная экстракция по O.Westphal (ЛПС<sup>W</sup>) [15] и ферментативный метод R.P.Darveau (ЛПС<sup>D</sup>) [10] в нашей модификации. Последняя заключалась в том, что процедура прохождения клеточной суспензии дважды под давлением через френч-пресс, с целью разрушения клеток, была заменена обработкой суспензии ультразвуком

в дезинтеграторе УЗДН-2Т при частоте излучения 44 кГц и максимальной мощности 3 раза по 5 мин с интервалами 1 мин.

Препараты ЛПС получали из лиофилизированных клеток *Y. pestis EV НИИЭГ* (Государственная коллекция патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб»), выращенных при 28 °С и обеззараженных 0,5 % формалином в течение 12–18 ч, по технологии, изложенной в производственном регламенте 01898109-04-04 на «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие псевдотуберкулезные».

Выделение деградированного полисахарида (ПС) из ЛПС проводили путем мягкого гидролиза в 1 % уксусной кислоте при 100 °С в течение 1 ч [13]. Осадок липида А отделяли центрифугированием при 3000 g в течение 30 мин. Полисахаридсодержащий супернатант фракционировали на сефадексе G-50 в пиридин-ацетатном буфере (рН 4,5) и лиофилизировали.

Определение химического состава антигенов проводили общепринятыми методами: суммарные углеводы – по Дюбуа с тимолом и серной кислотой, белки – по Lowry, нуклеиновые кислоты – по Спирину.

Электрофорез SDS-PAGE проводили по методу Laemmli в трис-глициновом буфере (рН 8,3) на приборе «Mini protean II» фирмы «Bio Rad» (США), используя 4 % концентрирующий и 13 % разделяющий гели. Нагрузка на гелевую дорожку составляла 10–20 мкг. Для выявления полисахаридов гели проявляли азотно-кислым серебром с помощью набора реактивов фирмы «Bio-Rad Silver Stain» (США). Для характеристики препаратов в отношении белковых примесей гели после электрофореза обрабатывали Кумасси ярко синим R-250 (Диаэм, Германия). В результате белки окрашивались в голубой цвет, а полисахариды – в желтый.

Гель-фильтрацию проводили на колонке (40×3 см) с TSK гелем HW-50, в качестве элюирующего раствора использовали фосфатный буфер М/150 с 0,1 М NaCl, рН 7,2. Колонку предварительно калибровали метчиками молекулярных масс из набора «Dalton Standards MS-II» (Serva).

Обращенно-фазовую жидкостную хроматографию (ОФ ВЭЖХ) проводили при комнатной температуре с использованием градиентной системы Breeze («Waters», США). Для анализа образцов ЛПС<sup>W</sup>, ЛПС<sup>D</sup> и ПС, растворенных в деионизованной воде, использовали колонку Symmetry 300<sup>TM</sup> C 18 (5 мкм; 4,6×150 мм; фирмы «Waters») и градиент концентрации ацетонитрила (10–25 %) в растворе 0,14 М ацетата аммония. Для получения хроматографических данных при длине волны 254 нм использовали УФ-детектор, скорость элюции – 1 мл/мин.

Определение моносахаридного состава в гидролизатах полученных препаратов проводили с помощью газожидкостной хроматографии (ГЖХ) на хроматографе GL-2010 («Shimadzu», Япония), используя капиллярную колонку Equity-1. Сигналы детектора

регистрировали с помощью самописца в виде пиков на хроматограмме, площадь которых пропорциональна количеству вещества. Идентификацию моносахаридов осуществляли по времени удерживания, ориентируясь на время удерживания известных стандартных моносахаридов (глюкозы, маннозы, ксилозы, галактозы, глюкозамина).

Иммунохимическую активность полученных препаратов изучали в реакции иммунодиффузии в геле по Оухтерлони (РИД) и твердофазным иммуноферментным анализом (ТИФА). Для постановки РИД использовали чумные агглютинирующие лошадиные сыворотки (РосНИПЧИ «Микроб»); экспериментальные серии моноклональных IgG к ЛПС *Y. pestis EV* 28 °С, выделенные из асцита линейных мышей BALB/c, которые далее метили пероксидазой хрена методом Nakane [5] и использовали в ТИФА с антимишиным конъюгатом. Специфичность препаратов ЛПС и ПС чумного микроба определяли с экспериментальными мышиными сыворотками, полученными к гетерологичным штаммам: *Yersinia pseudotuberculosis* Ia; *Francisella tularensis holarctica*; *Escherichia coli* 5198/99; *Salmonella typhimurium* 20.

Цитотоксическое действие препаратов ЛПС<sup>W</sup>, ЛПС<sup>D</sup> и ПС на лейкоциты крови нелинейных белых мышей определяли с помощью теста с трипановым синим [6] в 96-луночных пластиковых планшетах. Для этого к 100 мкл клеточной суспензии лейкоцитов добавляли 100 мкл образца в концентрации 3,0, 1,5, 0,75 мг/мл, смесь инкубировали при 37 °С в течение 30 и 60 мин. В качестве отрицательного контроля использовали 0,9 % раствор NaCl. Цитотоксическое действие исследуемых антигенов определяли по проценту поврежденных (окрашенных) лейкоцитов.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием t-критерия Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

ЛПС возбудителя чумы представляет собой липополисахаридные макромолекулы с молекулярной массой около 5 кДа [10, 12], состоящие из двух ковалентно связанных частей, различающихся по структуре и биологической роли. К ним относятся: липид А, обуславливающий токсические свойства и выступающий в роли якоря, прикрепляющего ЛПС к клеточной стенке, и присоединенный к липиду А полисахарид кора, отрицательно заряженные группы которого связывают двухвалентные катионы, что важно для обеспечения целостности и стабильности наружной мембраны. Углеводная и липидная области ЛПС связаны кислоталабильной гликозидной связью 2-кето-3-дезоксид-октоновой кислоты (КДО) и могут быть отделены друг от друга после мягкого кислотного гидролиза (деградации) ЛПС.

Известно, что биологическая активность ЛПС зависит от метода выделения препарата. Большинство современных работ отечественных авторов [1, 3, 4, 8,

Химический состав препаратов ЛПС и ПС

Метод выделения антигена	Выход препарата (% от сухого веса клеток или ЛПС)	Химический состав, %		
		Белок	Углеводы	НК
ЛПС по Вестфало	4,2±0,5	0,89±0,01	38,9±0,2	–
ЛПС по Darveau	2,9±0,6	2,0±0,03	29,2±0,9	0,32±0,05
ПС по Muller-Seitz	7,2±0,8	0,89±0,01	36,2±0,4	0,21±0,03

Примечание. «–» – не выявлено.

9, 12] выполнено на препаратах ЛПС *Y. pestis*, полученных классической водно-фенольной экстракцией по O. Westphal [15], методом C. Galanos [11] или по R.P. Darveau [10].

Нами были получены препараты ЛПС, выделенные по O. Westphal и R.P. Darveau, а также деградированного ПС (по 3 серии каждого), которые представляли собой хлопья белого цвета, хорошо растворимые в воде и 0,9 % растворе NaCl.

Проведенный сравнительный химический анализ препаратов ЛПС<sup>W</sup> и ЛПС<sup>D</sup> показал различия по выходу препарата, содержанию белка и общих углеводов в пользу метода Вестфала. Поэтому в дальнейшем для получения деградированного ПС мы использовали препараты ЛПС<sup>W</sup>. Результаты сравнительного исследования химического состава полученных препаратов ЛПС и ПС представлены в таблице.

При электрофоретическом исследовании в SDS-PAGE установлено, что все препараты ЛПС<sup>W</sup> и ЛПС<sup>D</sup> не окрашивались на белок Кумасси ярко синим и были представлены типичной R-формой ЛПС в отличие от коммерческого препарата S-формы ЛПС *E. coli* 055:B5 (Sigma, США). Молекулярная масса исследованных ЛПС составила (8,1±3,2) кДа, что было подтверждено результатами гель-фильтрации на TSK геле HW-50. Препараты деградированного ПС также не окрашивались на белок и были представлены полосой с молекулярной массой около 5 кДа (рис. 1).

Изучение моносахаридного состава в гидролизатах препаратов ЛПС<sup>W</sup>, ЛПС<sup>D</sup> и ПС методом ГЖХ по относительному времени удерживания в сравнении с известными стандартами выявило наличие значимых пиков глюкозы и галактозы во всех образцах.

Сравнительный анализ хроматограмм образцов

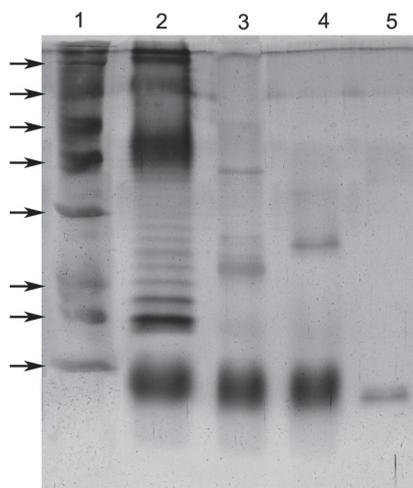


Рис. 1. Электрофореграмма препаратов ЛПС в 13 % SDS-PAGE: 1 – маркеры молекулярной массы 116,0; 66,2; 45,0; 35,0; 25,0; 18,4; 14,4; 11,0 кДа («Fermentas», США); 2 – ЛПС *E. coli* 055:B5 (S-форма ЛПС, Sigma, США.); 3 – ЛПС<sup>D</sup>; 4 – ЛПС<sup>W</sup>; 5 – ПС. Окраска азотно-кислым серебром

ЛПС<sup>W</sup>, ЛПС<sup>D</sup> и ПС методом ОФ ВЭЖХ с УФ-детекцией при длинах волн 254 нм (рис. 2) показал, что профили элюции исследованных антигенов относительно идентичны. Отмечается один основной пик высокой амплитуды на 1,2–2,0 мин, который был собран и исследован электрофоретически. Было также установлено, что во всех случаях в этом пике содержится полисахарид.

Анализ иммунохимической активности показал, что все серии препаратов ЛПС<sup>W</sup>, ЛПС<sup>D</sup> и деградированного ПС в реакции иммунодиффузии с поликлональными чумными агглютинирующими лошадиными сыворотками и моноклональными IgG к ЛПС *Y. pestis* EV 28 °C давали одну четкую линию precipitation, что говорит об их серологической гомогенности. При тестировании в ТИФА с моноклональными IgG активность всех образцов ЛПС<sup>W</sup>, ЛПС<sup>D</sup> и ПС находилась практически на одном уровне и составляла (0,26±0,05); (0,38±0,06) и (0,40±0,09) мкг/мл соответственно. Специфичность полученных препаратов подтверждена отрицательной реакцией с мышиными сыворотками, полученными к гетерологичным штаммам: *Yersinia pseudotuberculosis*

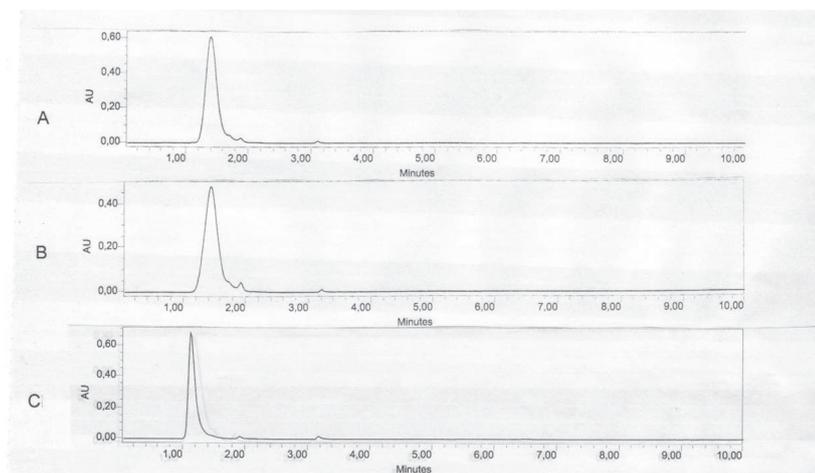


Рис. 2. ОФ ВЭЖХ – анализ антигенов *Y. pestis* EV при 254 нм: А – ЛПС<sup>W</sup>, В – ЛПС<sup>D</sup>, С – ПС

Ia, *Francisella tularensis holarctica*, *Escherichia coli* 5198/99, *Salmonella typhimurium* 20.

Цитотоксическое действие исследуемых антигенов *Y. pestis* EV 28 °С на лейкоцитах крови нелинейных белых мышей с помощью теста с трипановым синим выявило снижение этого эффекта при инкубации с образцами деградированного ПС.

Таким образом, результаты исследования показали, что препараты ЛПС *Y. pestis* EV 28 °С, выделенные водно-фенольной экстракцией по O. Westphal и ферментативным методом по R.P. Darveau, являются типичными R-гликолипидами с молекулярной массой (8,1±3,20) кДа. Все серии ЛПС<sup>W</sup>, ЛПС<sup>D</sup> и деградированного ПС хорошо растворимы в воде и 0,9 % растворе NaCl, гомогенны, характеризуются достаточной степенью чистоты. Сравнительное изучение некоторых физико-химических и иммунохимических свойств выделенных препаратов ЛПС чумного микроба показало преимущество водно-фенольной экстракции, а полученный при этом ПС является наиболее перспективным фрагментом молекулы ЛПС при конструировании чумных иммуноглобулиновых диагностических препаратов, т.к., обладая меньшей цитотоксичностью, сохраняет по ряду показателей идентичность химического состава и иммунохимическую специфичность эндотоксина.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беспалова И.А., Пустовалов В.Л., Львов В.Л., Вернер И.К., Васильева Г.И. Получение и некоторые свойства модифицированного производного липополисахарида *Yersinia pestis*. Биотехнол. 1995; 9–10:31–4.
2. Дентовская С.В., Платонов М.Е., Бахтеева И.В., Анисимов А.П. Наличие полной структуры кора липополисахарида необходимо для активации плазминогена возбудителя чумы. Пробл. особо опасных инф. 2007; 3(93):49–51.
3. Дентовская С.В., Бахтеева И.В., Тутарева Г.М., Шайхутдинова Р.З., Кондакова А.Н., Быстрова О.В. и др. Структурное разнообразие и эндотоксическая активность липополисахарида *Yersinia pestis*. Биохимия. 2008; 73(2):37–46.
4. Зюзина В.П., Демидова Г.В., Соколова Е.П., Беспалова И.А., Бородин Т.Н., Алексеева Л.П. Сравнение спектра белков, присутствующих в препаратах липополисахаридов *Yersinia pestis*, выращенных при 28 и 37 °С. Биотехнология. 2003; 3:20–4.
5. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. Теория и практика иммуноферментного анализа. М.: Высшая школа, 1991. 288 с.
6. Новиков Д.К., Новикова В.И. Клеточные методы иммунодиагностики. Минск: Беларусь; 1979. С. 20–3.
7. Сварваль А.В., Ценева Г.Я., Шендерович О.А. Липополисахарид иерсиний и его биологическая активность. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2006; 3:100–4.
8. Соколова Е.П., Марченков В.И., Демидова Г.В., Зюзина В.П., Беспалова И.А., Павлович Н.В. Комплексы «мышинного» токсина чумного микроба с модифицированными формами липополисахарида *Yersinia pestis* и с липополисахаридами других бактерий. Биотехнология. 2001; 4:53–8.
9. Федорова В.А., Девдариани З.Л. Изучение антигенных

детерминантов липополисахарида *Y. pestis* с помощью моноклональных антител. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 1998; 3:22–6.

10. Darveau R.P., Hancock R.T.W. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella typhimurium* strains. J. Bacteriol. 1983; 155(2):831–8.
11. Galanos C., Luderitz O., Westphal O.A. New method for the extraction of R lipopolysaccharide. Eur. J. Biochem. 1969; 9:245–9.
12. Knirel Y.A., Lindner B., Vinogradov E.V., Kocharova N.A., Senchenkova S.N., Shaikhutdinova R.Z. et al. Temperature-dependent variations and intraspecies diversity of the structure of the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*. Biochemistry. 2005; 44:1731–43.
13. Muller-Seitz E., Jann B., Jann K. Degradation studies on the lipopolysaccharide from *E. coli* 071:K:H12. Separation and investigation of O-specific and core polysaccharides. FEBS Letters. 1968; 1(5):311–4.
14. Skurnik M., Peippo A., Ervela E. Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. Mol. Microbiol. 2000; 37(2):316–30.
15. Westphal O., Luderitz O., Bister F. Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol. Wasser. Z. Naturforsch. Teil B. 1952; 7:148–55.

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

1. Беспалова И.А., Пустовалов В.Л., Львов В.Л., Вернер И.К., Васильева Г.И. [Method for acquisition and some properties of the modified *Yersinia pestis* lipopolysaccharide derivative]. Biotechnologia. 1995; 9–10:3–4.
  2. Дентовская С.В., Платонов М.Е., Бахтеева И.В., Анисимов А.П. [The presence of the complete lipopolysaccharide core structure is necessary for the activation of *Yersinia pestis* plasminogen]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2007; (93):49–51.
  3. Дентовская С.В., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Шайхутдинова Р.З., Кондакова А.Н., Быстрова О.В. et al. [Structural diversity and endotoxin activity of *Yersinia pestis* lipopolysaccharide]. Biokhimiya. 2008; 73(2):37–46.
  4. Зюзина В.П., Демидова Г.В., Соколова Е.П., Беспалова И.А., Бородин Т.Н., Алексеева Л.П. [Comparative assay of the protein spectrum that can be found in lipopolysaccharide preparations of *Yersinia pestis*, cultivated at 28 and 37 °C]. Biotechnologia. 2003; 3:20–4.
  5. Егоров А.М., Осипов А.П., Дзантиев Б.Б., Гаврилова Е.М. [Theory and Practice as Related to Enzyme-Linked Immunoassay]. М.; 1991. 288 p.
  6. Новиков Д.К., Новикова В.И. [Cell-Bond Techniques of Immunodiagnosics]. Minsk; 1979. P. 20–3.
  7. Сварваль А.В., Тсенева Г.Я., Шендерович О.А. [*Yersinia* lipopolysaccharide and its biological activity]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2006; 3:100–4.
  8. Соколова Е.П., Марченков В.И., Демидова Г.В., Зюзина В.П., Беспалова И.А., Павлович Н.В. [Preparation complexes of plague microbe "mice" toxin with modified forms of *Yersinia pestis* lipopolysaccharide and lipopolysaccharides of other bacteria]. Biotechnologia. 2001; 4:53–8.
  9. Федорова В.А., Девдариани З.Л. [Studies of *Y. pestis* lipopolysaccharide epitopes using monoclonal antibodies]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 1998; 3:22–6.
- Authors:**  
Polunina T.A., Guseva N.P., Kireev M.N., Taranenko T.M., Devdariani Z.L., Zadnova S.P., Kuznetsova E.M., Stepanov A.V., Klyueva S.N., Zakharova T.L. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Полунина Т.А., Гусева Н.П., Киреев М.Н., Тараненко Т.М., Девдариани З.Л., Заднова С.П., Кузнецова Е.М., Степанов А.В., Ключева С.Н., Захарова Т.Л. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 29.11.11.

Ю.В.Сизова, И.Я.Черепяхина, В.В.Балахнова, О.С.Бурлакова, Е.В.Сизова, О.И.Помухина,  
О.П.Фецайлова

## ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ СВОЙСТВ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИХ СПОСОБНОСТЬ К ВЫЖИВАНИЮ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ, В БИОПЛЕНОЧНЫХ СООБЩЕСТВАХ

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

Представлены результаты изучения вариабельности ряда свойств, характеризующие персистентный потенциал холерных вибрионов в биопленочном сообществе при длительном культивировании в речной воде. Показано, что эпидемически значимые холерные вибрионы в холодной воде образуют тонкие биопленки и в большинстве своем погибают. Атоксигенные штаммы, выделенные из воды, могут длительно выживать в окружающей среде как в теплое, так и холодное время года за счет образования биопленки и реализации персистентной активности. Выраженность изученных свойств, кроме антилизозимной активности (АЛА), прямо коррелировала с интенсивностью биопленкообразования, а при исследовании имела место обратная зависимость.

*Ключевые слова:* биопленка, холерный вибрион, персистенция, адаптация, антилизозимная активность, каталазная активность, билирезистентность.

Yu.V.Sizova, I.Ya.Cherepakhina, V.V.Balakhnova, O.S.Burlakova, E.V.Sizova, O.I.Pomukhina, O.P.Fetsaylova

## Variability of Properties Characterizing Persistent Potential of Cholera Vibrio in Biofilm Communities

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

Represented are the results of studies on variability of properties characterizing persistent potential of *V. cholerae* in biofilm communities under the long-term cultivation in river water. Demonstrated is the fact that in the cold water epidemically significant cholera vibrios form thin biofilms and do not survive for the most part. But atoxigenic strains, isolated from the water, can survive in the environment both in the cold and warm time of the year due to formation of thick biofilm and realization of the persistent activity. Expressiveness of the properties studied, except antilysozyme activity (ALA), directly correlate with biofilm formation intensity. In case of ALA one observes inverse correlation.

*Key words:* biofilm, cholera vibrio, persistency, adaptation, antilysozyme activity, catalase activity, biliresistance.

Одним из наиболее обсуждаемых в последние годы является вопрос о роли среды обитания в обеспечении условий для выживания и длительной персистенции жизнеспособных популяций микроорганизмов, а также роли генотипического и фенотипического потенциала бактерий в этом процессе.

Установлено, что большинство микроорганизмов в естественных и искусственно созданных экосистемах существует в виде структурированных, прикрепленных к поверхности сообществ – биопленок, которые функционируют как скоординированный консорциум. Такое «социальное поведение» микроорганизмов обеспечивает им защиту и позволяет выжить в неблагоприятных условиях (при недостатке питательных веществ, воздействии бактериофагов и простейших). Биопленки способствуют длительной персистенции микробов в окружающей среде и хронизации инфекционного процесса в макроорганизме путем повышения устойчивости к воздействию антибиотиков, антител, фагоцитов и других потенциально опасных факторов. Основным фактором устойчивости биопленок является экзополисахаридный матрикс, вырабатываемый клетками бактерий сразу после прикрепления к субстрату. Он сложен по составу и меняется в результате адаптации бактерий к условиям окружающей среды, его основу составляют экзополисахариды, липополисахариды, гликопротеины и протеогликаны [10]. Механизм и

особенности формирования биопленок в окружающей среде и макроорганизме у холерных вибрионов достаточно хорошо изучены [1, 8, 9]. Очевидно, что биопленки играют чрезвычайно важную роль в жизнедеятельности микроорганизмов. Однако работ, посвященных изучению свойств холерных вибрионов при персистенции их в биопленочном сообществе, практически нет.

Целью работы было изучение диапазона вариабельности ряда свойств холерных вибрионов, играющих роль в их персистенции, в зависимости от интенсивности образования биопленок при длительном культивировании возбудителя холеры в речной воде при разных температурах.

### Материалы и методы

В работе использовано пять штаммов *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп, имеющих различный набор детерминант патогенности, выделенных от больных и из речной воды. Для решения поставленных задач холерные вибрионы инкубировали в стерильной речной воде в течение девяти месяцев при температуре 4 и 22 °С. Опыты были повторены дважды (2009–2010 и 2010–2011 гг.), в таблице приведены средние результаты.

Биопленки изучали по методике P.L.Watnick *et al.* [13]. Антилизозимную активность определяли ча-

Характеристика свойств холерных вибрионов и интенсивности образования биопленок до и после инкубации в речной воде при различных температурах

Серо- группа	Штамм	Место, год, источник выделения	Наличие генов		Культура	АЛА, мкг/ мл	БР, %	КА, ЕД	ОП биопленки	Удельный вес выживших клеток, %
			ctx	tcp						
O1	P-15499	Вилково, 1991 г., больной	+	+	Исходная	7	136,3	6,9		
					Биопленка, 22 °С	2	176,6	3,2	0,278	3
					Биопленка, 4 °С	4	165,5	1,8	0,087	0,14
	18418	Казань, 2001 г., больной	+	+	Исходная	7	125,1	4		
					Биопленка, 22 °С	2	175,3	3,9	0,302	3,6
					Биопленка, 4 °С	6	137,2	1,5	0,12	0,16
P-18775	Ростовская обл., Каменский р-н, 2005 г., больной	-	+	Исходная	9	91,6	3,2			
				Биопленка, 22 °С	2	134,7	3,1	0,227	0,29	
				Биопленка, 4 °С	6	117,8	1,5	0,099	0,11	
P-18774	Ростов-на-Дону, 1999 г., речная вода	-	-	Исходная	10	73,9	12,9			
				Биопленка, 22 °С	8	81,91	7,7	0,029	4,25	
				Биопленка, 4 °С	3	105,9	11,1	0,199	5,25	
O139	P-16065	Ростовская обл., 1993 г., больной	+	+	Исходная	2	114,9	10		
					Биопленка, 22 °С	2	138,7	2,9	0,658	2,5
					Биопленка, 4 °С	6	129,6	1,5	0,423	0,33

шечным методом [5]. Оценку уровня каталазной активности (КА) проводили кинетическим методом [4]. Уровень билирезистентности (БР) бактерий определяли методом прямой спектрофотометрии при длине волны 540 нм. Результаты оценивали по отношению оптической плотности (ОП) в опытной пробе к ОП в контроле, выраженному в процентах. Все результаты статистически обработаны.

### Результаты и обсуждение

Изучение способности к биопленкообразованию у холерных вибрионов O1 серогруппы показало, что оптическая плотность биопленок у культур, выделенных от людей, колебалась незначительно (таблица). Показатели ОП у тех же изолятов при сохранении в холодной воде (4 °С) были ниже, чем в воде комнатной температуры в 2,5–3 раза. При этом было установлено, что выжившие клетки в биопленках при этой температуре составляли всего десятые доли процента. Таким образом, показано, что эпидемически значимые холерные вибрионы в холодной воде не образуют мощные защитные биопленки и в большинстве своем погибают.

Напротив, у атоксигенного штамма, выделенного из речной воды, показатели биопленкообразования при 4 °С были почти в семь раз выше, чем при инкубации при 22 °С, то же касается и выживаемости – она была несколько выше в холодной воде. Повторяемость результатов в двух опытах свидетельствует о том, что популяции таких штаммов могут длительно персистировать в окружающей среде как в теплое, так и холодное время года за счет большей приспособляемости к выживанию в водных экосистемах.

У штамма O139 серогруппы показатели оптической плотности были гораздо выше, чем у холерных вибрионов O1 серогруппы (при 22 °С – 0,658, при 4 °С – 0,423). Возможно, способность к образованию

биопленки более выражена у капсульных форм холерных вибрионов. Но даже это не обеспечивало выживания в холодной воде вибрионов O139 серогруппы, выделенных от больных людей, т.е. наблюдалась та же картина, что и при исследовании штаммов O1 серогруппы – выжившие вибрионы составляли всего 0,33 % от количества, взятого в опыт.

Все вышесказанное свидетельствует о наличии механизма регуляции процесса образования биопленок у холерных вибрионов. С.П.Заднова [7] предполагает, что у возбудителя холеры существует неизвестная регуляторная система, которая в ответ на определенные сигналы из окружающей среды изменяет экспрессию ряда генов, в том числе кодирующих синтез экзополисахарида.

Параллельно с исследованием динамики биопленкообразования проводили изучение свойств холерных вибрионов, способствующих персистенции: антилизоцимной, каталазной активностей и билирезистентности.

После длительной инкубации холерных вибрионов O1 серогруппы в речной воде при разных температурах наблюдалось снижение значения антилизоцимной активности у биопленочных культур по сравнению с исходными штаммами, но в разной степени. Обращает на себя внимание наличие обратной корреляции в значениях АЛА и оптической плотности биопленок: у штаммов, изолированных от больных, в биопленке при температуре инкубации 22 °С при более высоких значениях ОП уровни АЛА были ниже, чем при 4 °С, а у водного штамма, наиболее приспособленного к жизнедеятельности при низких температурах – наоборот. Вероятно, в наиболее неблагоприятных условиях, в отсутствие выраженной защитной биопленки, холерные вибрионы компенсаторно сохраняют достаточно высокий уровень АЛА, чтобы выжить.

Та же картина наблюдалась у холерных вибрионов O139 серогруппы: несмотря на то, что этот

штамм образовывал мощную биопленку при 22 °С (ОП 0,658), значение АЛА было низким (2 мкг/мл). И, напротив, при более низкой ОП (0,432) в выжившей при 4 °С популяции холерные вибрионы сохраняли достаточно высокий уровень антилизоцимной активности (6 мкг/мл), очевидно, пытаясь нивелировать стрессорное воздействие низкой температуры. Как известно, в неблагоприятных условиях бактерии включают комплекс стрессориндуцибельных систем ответа [2].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что так называемая антилизоцимная активность холерных вибрионов – признак вариабельный, а ее диапазон зависит от условий окружающей среды (в частности, пребывания в речной воде в биопленочном сообществе), а также степени стрессорных воздействий, инициирующих реализацию биологической функции адаптации *V. cholerae*. При этом мы, как и другие исследователи [10], учитываем, что результаты были получены в лабораторных условиях в отсутствие других микробных ассоциантов, а в природных водоемах они могут являться частью более крупного биоценоза, сформированного с участием лизоцимактивных партнеров, поэтому показатели АЛА в каждом конкретном случае будут зависеть и от них.

С учетом полученных результатов возникает вопрос о механизме регуляции факторов персистенции, в частности, антилизоцимной активности. Установлено, что белок, отвечающий за так называемую антилизоцимную активность молекулярной массой от 14 до 21 кД [6], секретируется бактериями во внешнюю среду. Какими функциями, помимо нейтрализации лизоцима, обладает данный белок – неизвестно. Еще в 1994 г. В.М.Бондаренко и соавт. [3], а позднее О.В.Бухарин и соавт. [6] пришли к выводу, что АЛА и устойчивость к антибиотикам у различных микроорганизмов кодируется R-плазмидой. В наших опытах лишь единичные штаммы с высокой АЛА имели множественную лекарственную устойчивость, что ставит под сомнение плазмидную природу этого фактора у холерных вибрионов.

В свете последних данных о функциональной роли белка ToxR в регуляции экспрессии белков наружной мембраны (БНМ) возбудителя холеры [7, 12] можно предположить, что он, воспринимая сигналы из окружающей среды, управляет также экспрессией ряда белков, участвующих в реализации персистентного потенциала, в том числе антилизоцимной активности. По мнению С.П.Задновой [7], белки внешней мембраны, синтез которых регулируется белком ToxR, выполняют ряд важных функций, способствуя сохранению жизнедеятельности холерных вибрионов в кишечнике хозяина и во внешней среде. Так, установлено влияние ToxR на экспрессию белка наружной мембраны OmpU, обладающего защитной функцией против повреждающего воздей-

ствия желчи на клетки холерных вибрионов. Как известно, билирезистентность является одним из ведущих факторов, обуславливающих их персистенцию в организме человека. В воде открытых водоемов и сточной воде холерные вибрионы подвержены воздействию различных моющих средств, содержащих поверхностно-активные вещества (ПАВ), которые, как известно, обладают, как и желчные кислоты, детергентными свойствами.

В наших опытах отмечена прямая зависимость между степенью образования биопленки и резистентностью к желчи. Билирезистентность повышалась у всех биопленочных культур, но ее уровень коррелировал с показаниями ОП. Большинство штаммов обладало более высокой билирезистентностью при 22 °С, и при этой температуре отмечены более высокие показатели ОП биопленок. У штамма, выделенного из воды, более высокий уровень билирезистентности, как и высокая ОП, наблюдался при 4 °С. Все это также свидетельствует о наличии регуляторного механизма, способствующего персистенции выжившей в условиях стресса части популяции.

Такой же характер адаптации имел место при изучении каталазной активности холерных вибрионов, выделенных из биопленок после девяти месяцев инкубации в речной воде. По мере снижения температуры и, соответственно, ОП биопленок, понижался уровень каталазной активности. Интересен результат, полученный при изучении штамма, выделенного из речной воды, у которого более высокий уровень биопленкообразования наблюдался при 4 °С, и уровень КА был выше, чем при 22 °С. В наших опытах у данного штамма наблюдались наибольшие показатели КА, что может быть связано с тем, что в водной среде защита от перекиси водорода зависит только от самого микроба, в то время как у штаммов, выделенных от больных и носителей, к этим процессам подключаются ферментативные системы макроорганизма.

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что при выживании в биопленочном сообществе у холерных вибрионов модифицируются свойства, обуславливающие персистентный потенциал. При этом вариабельность изученных свойств, кроме антилизоцимной активности, прямо коррелировала с интенсивностью биопленкообразования, а при исследовании АЛА имела место обратная зависимость.

Суммируя все вышеизложенное можно сделать вывод, что холерные вибрионы обладают большим запасом пластичности, обеспечивающей им выживание в меняющихся условиях окружающей среды. Не вызывает сомнения, что процессы адаптации этого патогена, фенотипической вариабельности свойств, обуславливающих персистентный потенциал, и образование биопленки координировано регулируются генетической системой в ответ на стрессовые сигналы из окружающей среды.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева Л.П., Чемисова О.С., Мазрухо Б.Л., Шестиалтынова И.С., Михалева В.В., Татаренко О.А., Маркина О.В. К вопросу о способности холерных вибрионов эльтор продуцировать экзополисахарид. Холера и патогенные для человека вибрионы. 2007; 20:77–80.
2. Баснакьян И.А., Бондаренко В.М., Мельникова В.А., Белявская В.А. Стрессор-индуцибельные белки и вирулентность. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2001; 5:101–8.
3. Бондаренко В.М., Петровская В.Г., Яблочков А.Л. Антилизосимный фактор *Klebsiella pneumoniae*: природа, биологические функции и генетический контроль. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1994; 5(Приложение):22–7.
4. Брудастов Ю.А., Сборец Т.С., Дерябин Д.Г. Активность каталазы и супероксиддисмутазы *Staphylococcus aureus* при персистенции в макроорганизме. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2001; 2:13–6.
5. Бухарин О.В., Дерябин Д.Г. Экологическая детерминированность маркеров персистенции стафилококков. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1997; 4:60–3.
6. Бухарин О.В., Кириллов Д.А., Кириллов В.А. Скрининг плазмид у бактерий рода *Bacillus*, обладающих антилизосимной активностью. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2006; 1:3–6.
7. Заднова С.П. Функциональная роль ToxR-регулируемых белков внешней мембраны *Vibrio cholerae*. Пробл. особо опасных инф. 2004; 1(87):9–13.
8. Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я., Марамович А.С., Миронова Л.В., Санто С.Г. Способность холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп к образованию биопленки в эксперименте. Холера и патогенные для человека вибрионы. 2009; 22:90–3.
9. Лобанов В.В. Проблемы колонизации кишечника холерными вибрионами. Эпидемиол. и инф. бол. 2009; 3:37–9.
10. Немцова Н.В., Игнатенко М.Е., Селиванова Е.А., Гоголева О.А., Яценко-Степанова Т.Н., Плотников А.О. Регуляция симбиотических взаимодействий в альго-бактериальных ассоциациях. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2009; 4:62–6.
11. Gander S. Bacterial biofilms: resistance to antimicrobial agents. J. Antimicrob. Chemother. 1996; 37:1047–50.
12. Peterson K.M. Expression of *Vibrio cholerae* virulence genes in response to environmental signals. Curr. Issues Intest. Microbiol. 2002; 3:29–36.
13. Watnick P.L., Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* biofilm. Mol. Microbiol. 1999; 34:285–95.

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

1. Alekseeva L.P., Chemisova O.S., Mazrukho B.L., Shestialtynova I.S., Mikhaleva V.V., Tatarenko O.A., Markina O.V. [Concerning ability of cholera vibrios El Tor to produce exopolysaccharide]. Kholera. Patogen. Dlya Chelov. Vibriony. 2007; 20:77–80.
2. Basnak'yan I.A., Bondarenko V.M., Mel'nikova V.A., Belyavskaya V.A. [Stress-induced proteins and virulence]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2001; 5:101–8.
3. Bondarenko V.M., Petrovskaya V.G., Yablochkov A.L. [Antilysozyme factor of *Klebsiella pneumoniae*: its nature, biological functions, and genetic control]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1994; 5(Suppl.):22–7.
4. Brudastov Yu.A., Sborets T.S., Deryabin D.G. [Catalase and superoxide dismutase activity of *Staphylococcus aureus* in case of persistence in microorganism]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2001; 2:13–6.
5. Bukharin O.V., Deryabin D.G. [Ecological determinacy of *Staphylococcus* persistence markers]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1997; 4:60–3.
6. Bukharin O.V., Kirillov D.A., Kirillov V.A. [Screening of plasmids in *Bacillus* species bacteria that show antilysozyme activity]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2006; 1:3–6.
7. Zаднова S.P. [Functional role of ToxR-regulated outer-membrane proteins of *Vibrio cholerae*]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2004; (87):9–13.
8. Kulikalova E.S., Urbanovich L.Ya., Maramovich A.S., Mironova L.V., Sappo S.G. [Ability of Cholera vibrio O1 and O139 to form biofilm *in vitro*]. Kholera. Patogen. Dlya Chelov. Vibriony. 2009; 22:90–3.
9. Lobanov V.V. [Aspects of intestine colonization by *V. cholerae*]. Epidemiol. Infek. Bol. 2009; 3:37–9.
10. Nemtsova N.V., Ignatenko M.E., Selivanova E.A., Gogoleva O.A., Yatsenko-Stepanova T.N., Plotnikov A.O. [Regulation of symbiotic interactions in algobacterial associations]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2009; 4:62–6.

## Authors:

Sizova Yu.V., Cherepakhina I.Ya., Balakhnova V.V., Burlakova O.S., Sizova E.V., Pomukhina O.I., Fetsaylova O.P. 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:

Сизова Ю.В., Черепакхина И.Я., Балахнова В.В., Бурлакова О.С., Сизова Е.В., Помухина О.И., Фецайлова О.П. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aanet.ru

Поступила 19.10.11.

О.В.Громова, И.А.Кузьмиченко, М.Н.Киреев, О.Д.Клокова, В.С.Бронникова

**ФОСФАТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ В ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЕ И ЕЕ КОМПОНЕНТАХ***ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

Представлены данные по выявлению и характеристике фосфомоно-эстеразной и фосфодиэстеразной активности в детоксицированной культуральной жидкости производственных штаммов 569В и М41 холерного вибриона, в компонентах вакцины – холерогене-анатоксине и О-антигенной фракции. Показано присутствие этих ферментов в таблетке холерной вакцины, что более полно характеризует ее биохимические свойства.

*Ключевые слова:* холерная вакцина, компоненты вакцины, фосфомоноэстераза, фосфодиэстераза.

O.V.Gromova, I.A.Kuz'michenko, M.N.Kireev, O.D.Klokov, V.S.Bronnikova

**Phosphatase Activity in Chemical Cholera Vaccine and its Components***Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov*

Presented are the data on detection and characterization of phosphomonoesterase and phosphodiesterase activities in detoxicated cultural fluid of production *Vibrio cholerae* strains 569B and M41, and in cholera toxin and O-antigenic fraction, the vaccine components. These enzymes were demonstrated to be present in the cholera vaccine tablet, thus its biochemical properties were characterized more completely.

*Key words:* cholera vaccine, vaccine components, phosphomonoesterase, phosphodiesterase.

Коммерческая химическая бивалентная холерная вакцина, помимо основных иммуногенов – холерогена-анатоксина и О-антигенов Инаба и Огава, имеет в своем составе ряд экзоферментов, поступающих в культуральную жидкость в процессе глубокого выращивания штаммов-продуцентов 569В серовара Инаба и М41 серовара Огава [2, 3]. Поскольку выделение двух специфических компонентов вакцины из центрифугатов формализированной культуральной жидкости проводят при достаточно широком диапазоне насыщения серноокислым аммонием, присутствие в этих фракциях других белков, в том числе ферментов, вполне объяснимо. Спектр ферментов, обнаруженных в целевом продукте холерной вакцины (таблетках), довольно обширен, в настоящее время есть сведения о присутствии в них протеазы, нейраминидазы, фосфолипаз А<sub>2</sub> и С, лизофосфолипазы, липазы (твиназы), ДНК-азы, РНК-азы, амилазы, АТФ-азы [1, 4]. Можно предположить наличие в вакцине и других ферментов. Мы остановили свое внимание на фосфатазах. Как известно, эти ферменты широко распространены в различных организмах, гидролизуя эфиры фосфорной кислоты, они обладают важными биологическими функциями, участвуют в регуляции метаболических реакций клеток и снабжении их неорганическим фосфатом [5]. При этом выделяют две группы фосфатаз, гидролизующих моно- и дизфиры фосфорной кислоты.

У возбудителя холеры серовара Эльтор и О139 серогруппы «Bengal» Е.С.Филякиной и соавт. обнаружены три внутриклеточных и два внеклеточных белка с фосфомоноэстеразной активностью при ис-

пользовании в качестве субстрата п-нитрофенилфосфата. Фосфатазная активность выявлена в нативном очищенном холерном токсине по отношению к различным субстратам, в том числе к синтетическим – п-нитрофенилфосфату и бис-п-нитрофенилфосфату [6]. Фосфатазную активность в холерной вакцине практически не изучали, имеются лишь сообщения об отсутствии активности щелочной фосфатазы в холерогене-анатоксине и наличии АТФ-азной активности в таблетках [1].

Цель работы состояла в выявлении и изучении некоторых свойств внеклеточной фосфомоноэстеразной и фосфодиэстеразной активности в белковых фракциях, выделенных из детоксицированной культуральной жидкости производственных штаммов холерного вибриона, в холерогене-анатоксине и таблетках холерной вакцины.

**Материалы и методы**

Детоксицированную культуральную жидкость, полученную после выращивания производственных штаммов холерного вибриона в реакторе, фракционировали путем осаждения сульфатом аммония для получения фракций, содержащих протективные антигены. Из культуральной жидкости штамма 569В серовара Инаба получали фракции 20–50 и 50–80 % насыщения, у штамма М41 серовара Огава – 0–50 и 50–80 % насыщения с последующим отделением осадков и их диализом. Кроме этих фракций, в опыты брали несколько серий лиофилизированного холерогена-анатоксина, а также получаемые после

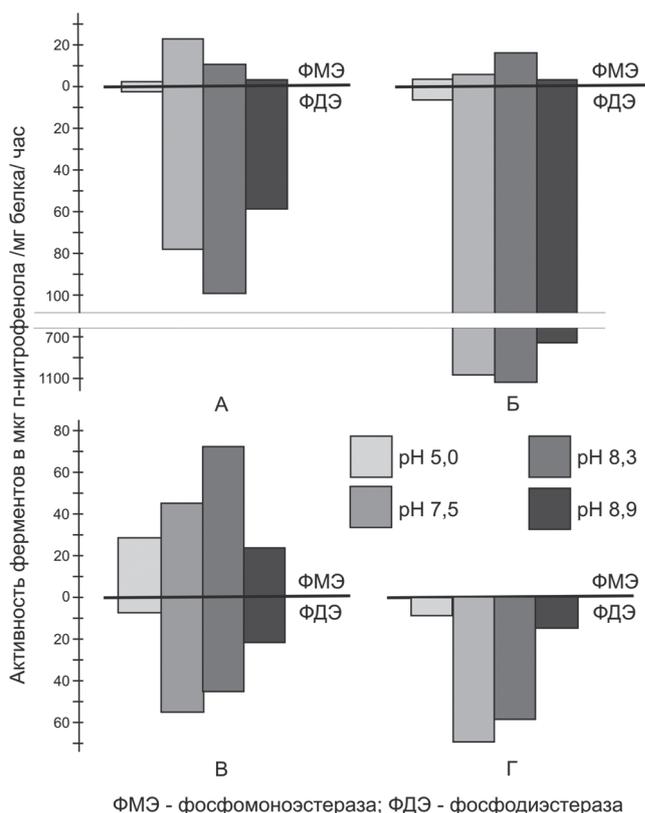
ультрафильтрации культуральной жидкости О-антигенный концентрат, ферментный комплекс протеовибрин и таблетки коммерческой вакцины разных серий. Таблетку измельчали в 2 мл 0,85 % раствора NaCl, настаивали в течение 4 ч при комнатной температуре, добавляли еще 2 мл и центрифугировали для отделения нерастворимой части.

Фосфатазную активность определяли общепринятыми методами с синтетическими хромогенными субстратами – п-нитрофенилфосфатом (Sigma) для фосфомоноэстеразы (ФМЭ) и бис-п-нитрофенилфосфатом (Serva) для фосфодиэстеразы (ФДЭ). Активность выявляли в 0,05 М трис-буфере при pH 5,0; 7,5; 8,3 и 8,9; в 0,05 М цитратном буфере (pH 4,8) и в 0,05 М глициновом буфере (pH 9,9). В качестве активатора фермента использовали ионы магния. Реакцию ставили в микропланшетах, раститровывая препарат двукратно при постоянном объеме субстратной смеси. Учет реакции по образованному п-нитрофенолу проводили на Titertek Multiskan Plus при 405 нм. Из показаний вычитали контрольные значения на окраску препаратов и субстрата. Активность выражали в мкг п-нитрофенола, образованного на 1 мг белка за 1 ч при 37 °С. Статистическую обработку данных проводили общепринятыми методами.

**Результаты и обсуждение**

Во фракциях, выделенных из культуральной жидкости штамма 569В, присутствовали оба вида активности, максимально она проявлялась при pH 7,5–8,3 в трис-буфере (рисунок). Как правило, щелочная фосфатаза в различных органах и тканях имеет наибольшую активность при pH 9,0–10,0, однако в наших опытах в глициновом буфере (pH 9,9) ФМЭ-активность практически отсутствовала, поскольку, как оказалось, ее pH-оптимум в культуральной жидкости был смещен в менее щелочную область. Что касается кислой фосфатазы, активной при pH 4,5–5,0, то ее также не удалось обнаружить. Отсутствие данной активности может быть связано с тем, что детоксикация культуральной жидкости формальдегидом инактивирует некоторые экзоферменты частично или полностью, поэтому возможность инактивации должна быть учтена при выявлении ферментов после формализации.

Судя по полученным данным, такому воздействию не подвержена ФДЭ-активность. Наиболее значимым показателем было ее превосходство (более чем в 200 раз) над ФМЭ-активностью, особенно это характерно для фракции 50–80 % насыщения штамма 569В, белки которой входят в состав холероген-анатоксина. Такой высокой ФДЭ-активности не было в обеих фракциях из культуральной жидкости штамма М41, их особенностью была самая высокая среди других фракций ФМЭ-активность у фракции 20–50 % насыщения и полное ее отсутствие во фракции 50–80 % насыщения при сохранении в ней ФДЭ-активности.



Активность фосфатаз во фракциях из культуральной жидкости штаммов 569В и М41 холерного вибриона:

А, Б – фракции 0–50 и 50–80 % насыщения сульфатом аммония, штамм 569В; В, Г – фракции 20–50 и 50–80 % насыщения сульфатом аммония, штамм М41

Помимо различий в распределении активности по фракциям как у одного штамма, так и между двумя штаммами, разница между обоими ферментами проявлялась в отношении активатора – для ФМЭ-активности были необходимы ионы магния, у ФДЭ такой зависимости не обнаружено. Последнее свойство отмечено и другими исследователями [6].

Анализ активности непосредственно в компонентах вакцины и таблетках показал присутствие обоих видов фосфатаз во всех препаратах, однако следует учитывать, что О-антигенная фракция на стадии полуфабриката подвергается термической стерилизации, и вклад в активность таблетки вносит холероген-анатоксин (таблица). Комплексный ферментный препарат протеовибрин также обладал обоими активностями, однако ФДЭ-активность в нем оказалась неожиданно высокой, хотя во фракциях из

**Фосфатазная активность в компонентах вакцины, протеовибрине и в таблетках**

Штамм	Препарат	Активность в мкг п-нитрофенола/мг белка/ч	
		фосфомоноэстераза	фосфодиэстераза
569В	Холероген-анатоксин	17,2±3,1	280,7±16,2
М41	О-антиген концентрат	31,4±5,3	68,0±5,5
М41	Протеовибрин	19,1±1,7	1140,0±97,2
569В + М41	Таблетки холерной вакцины	5,9±0,9	364±27,4

культуральной жидкости штамма М41 ее уровень не так высок. Помимо того, концентрирование ФДЭ-азы в протеовибрине косвенно указывает на ее небольшую молекулярную массу, поскольку при ультрафильтрации через селективные волоконные фильтры в ультрафильтрат проникают молекулы с массой не выше 45 кДа [4].

Таким образом, в культуральной жидкости обоих производственных штаммов холерного вибриона при использовании синтетических хромогенных субстратов обнаружены два вида фермент – фосфомоноэстераза и фосфодиэстераза. Для конкретизации природных субстратов действия ферментов нужны дополнительные исследования, поскольку для фосфатаз, в целом, характерна широкая субстратная специфичность [5]. Фосфомоноэстеразы, наряду с гидролизом фосфорилированных сахаров, нуклеотидфосфатов, фосфопроизводных аминокислот, способны также катализировать перенос фосфорильных групп на другие молекулы, участвуя в регуляторных реакциях клетки. Значение фосфодиэстеразы проявляется в том, что она входит в состав важнейшей регуляторной системы циклического 3',5'-аденозинмонофосфата, гидролизуя этот метаболит до адениловой кислоты (АМФ). Кроме того, реакцию по типу фосфодиэстераз катализируют дезоксирибонуклеазы, расщепляя фосфодиэстеразную связь в полинуклеотидах, а также фосфолипазы С и Д в фосфолипидах [5].

Обнаружение и характеристика активности внеклеточных фосфомоноэстеразы и фосфодиэстеразы, их устойчивость, особенно у последней, к действию формальдегида и сохранение активности на этапах приготовления вакцины из производственных штаммов 569В и М41 позволяет более полно охарактеризовать биохимические свойства целевого продукта – таблеток холерной вакцины.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Джэпаридзе М.Н., Никитина Г.П., Иванов Н.Р., Рысцова Е.А., Удалова И.Б., Караева Л.П. и др. Биохимическая и иммунохимическая характеристика новой оральной холерной химиче-

ской бивалентной вакцины и результаты испытания препаратов на добровольцах. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1982; 11:29–33.

2. Джэпаридзе М.Н., Наумов А.В., Никитина Г.П., Мелещенко М.В. Оральная химическая вакцина из гипертокси-генных штаммов КМ76 Инаба и КМ68 Огава возбудителя холеры. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1991; 4:31–3.

3. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Киреев М.Н., Белякова Н.И. Активность ферментов в динамике глубинного роста производственных штаммов холерного вибриона О1 и О139 серогрупп. Пробл. особо опасных инф. 2003; 86:86–9.

4. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Киреев М.Н., Еремин С.А., Белякова Н.И., Клокова О.Д. и др. Мониторинг активности ферментов при производстве вакцины холерной бивалентной таблетированной. Биотехнология. 2010; 2:87–92.

5. Мецлер Д. Биохимия. Химические реакции в живой клетке. М.: Мир; 1980.

6. Мишанькин М.Б., Васильева Г.И., Шиманюк Н.Я., Шевченко Л.А., Козловский В.Н., Мишанькин Б.Н. Фосфатазная активность очищенных препаратов энтеротоксинов холерного вибриона. Пробл. особо опасных инф. 2003; 85:85–90.

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

1. Dzhaparidze M.N., Nikitina G.P., Ivanov N.R., Rystsova E.A., Udalova I.B., Karaeva L.P. et al. [Biochemical and immunochemical characteristics of a new oral, chemical cholera bivalent vaccine and results of a trial of the preparation on volunteers]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 1982; 11:29–33.

2. Dzhaparidze M.N., Naumov A.V., Nikitina G.P., Meleshchenko M.B. [An oral chemical vaccine from the hypertoxigenic strains of the causative agent of cholera KM-76 Inaba and KM-68 Ogawa]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1991; 4:31–3.

3. Kuz'michenko I.A., Gromova O.V., Kireev M.N., Belyakova N.I. [Enzymatic activity in the dynamics of submerged cultivation of productional *Vibrio cholerae* strains O1 and O139 serogroups]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2003; (86):86–9.

4. Kuz'michenko I.A., Gromova O.V., Kireev M.N., Eremin S.A., Belyakova N.I., Klokova O.D. et al. [Monitoring of enzyme activities during production of cholera bivalent tablet vaccine]. Biotechnologia. 2010; 2:87–92.

5. Metsler D. [Biochemistry: the chemical reactions of living cell]. M.; 1980.

6. Mishan'kin M.B., Vasil'eva G.I., Shimanyuk N.Ya., Shevchenko L.A., Kozlovsky V.N., Mishan'kin B.N. [Phosphatase activity of purified preparations of *Vibrio cholerae* enterotoxin]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2003; (85):85–90.

#### Authors:

Gromova O.V., Kuz'michenko I.A., Kireev M.N., Klokova O.D., Bronnikova V.S. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Громова О.В., Кузьмиченко И.А., Киреев М.Н., Клокова О.Д., Бронникова В.С. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 14.06.11.

Г.В.Демидова, В.П.Зюзина, Е.П.Соколова, Н.И.Пасюкова, И.А.Беспалова, Т.Н.Бородинна,  
В.И.Тынянова

## ТОЛЕРАНТНОСТЬ К ЛИПОПОЛИСАХАРИДАМ ВАКЦИННОГО И ВИРУЛЕНТНОГО ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* В УСЛОВИЯХ *IN VIVO*

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

Воспроизведен феномен эндотоксиновой толерантности к различным формам липополисахарида (ЛПС) вакцинного (EV 76) и вирулентного (231) штаммов *Y. pestis*, выращенных при 28 и 37 °С, и ЛПС *Escherichia coli* S- и R- хемотипов в условиях *in vivo*. Установлено, что первичное и повторное введение белым мышам препаратов ЛПС чумного микроба во всех сочетаниях приводит к подавлению воспалительного ответа вне зависимости от температурных и штаммовых различий строения ЛПС. При сочетании ЛПС *Y. pestis* с ЛПС *E. coli* ответ организма зависит от формы ЛПС и может варьировать от полной или частичной толерантности до полного ее отсутствия.

**Ключевые слова:** эндотоксиновая толерантность, липополисахарид, *Yersinia pestis*.

G.V.Demidova, V.P.Zyuzina, E.P.Sokolova, N.I.Pasyukova, I.A.Bespalova, T.N.Borodina, V.I.Tyryanova

## *In vivo* Tolerance to Lipopolysaccharides of Vaccine and Virulent *Yersinia pestis* Strains

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

The endotoxin tolerance phenomenon has been reproduced *in vivo*. Different forms of lipopolysaccharide (LPS) of vaccine (EV 76) and virulent (231) *Y. pestis* strains, grown at 28 and 37 °C, and LPS of S- and R-chemotypes of *Escherichia coli* were injected to the white mice in different combinations. Determined is the fact that primary and repeated injection of plague microbe LPS preparations in any combinations results in suppression of inflammatory response regardless of the differences in the LPS structure. In case of combined administration of *Y. pestis* LPS and *E. coli* LPS, the response depends on the LPS form and can vary from complete or partial tolerance to its total absence.

**Key words:** endotoxin tolerance, lipopolysaccharide, *Yersinia pestis*.

Как известно, *Yersinia pestis* относится к числу высоковирулентных бактерий, патогенез которых обусловлен действием эндотоксина. Своеобразие липополисахарида (ЛПС) чумного микроба заключается в выраженной вариабельности его химической структуры внутри вида и температурозависимом характере синтеза. ЛПС *Y. pestis*, выделенные из бактерий, выращенных при температуре тела пойкилотермного (ЛПС28) и теплокровного (ЛПС37) хозяина, отличаются по химическому составу сахаров коровой области и степени ацилирования жирных кислот липида А [3, 4]. Обе формы активируют специфичный для ЛПС рецептор TLR4 миелоидных клеток иммунной системы макроорганизма. ЛПС28 и ЛПС37, в соответствии с химическим строением, обладают различным иммуномодулирующим действием. Так, если ЛПС28 является относительно сильным индуктором синтеза провоспалительных цитокинов, то цитокин-индуцирующая активность ЛПС37 выражена слабо и, как недавно установлено, он обладает иммуносупрессирующим действием [5, 6].

При развитии чумной инфекции одновременное присутствие форм ЛПС, различных по химическому строению и иммуномодулирующим свойствам, *a priori* предполагает возможность прямой и повторной активации иммунокомпетентных клеток гомологичными и гетерологичными формами ЛПС *Y. pestis*, что может вызывать эффект эндотоксиновой толерантности. Насколько нам известно, в литературе отсутству-

ют сведения о воспроизведении этого феномена на модели ЛПС чумного микроба. В настоящей работе изучали толерантность лабораторных животных к различным формам ЛПС чумного микроба, выделенным из вакцинного (EV 76) и вирулентного (231) штаммов *Y. pestis*, выращенных как при 28, так и при 37 °С.

### Материалы и методы

В работе использовали ЛПС двух штаммов чумного микроба – вакцинного *Y. pestis* EV 76 и высоковирулентного *Y. pestis* 231. Бактерии выращивали в течение 48 ч. на пластинках агара LB (Difco, США) при температуре 28 и 37 °С. ЛПС выделяли по методу O.Westphal [8]. В работе использовали также коммерческие препараты S-ЛПС *Escherichia coli* 055:B5 (Fluka, Israel) и R-ЛПС *E. coli* J5, Rc мутант (Sigma, Germany).

Токсическую активность ЛПС проверяли на беспородных белых мышах. Для этого соответствующие дозы исследуемых препаратов вводили внутрибрюшинно в объеме 0,1 мл. Срок наблюдения за животными составлял 1–3 сут.

Условия постановки опытов по воспроизведению феномена эндотоксиновой толерантности были подобраны экспериментально. Предварительно определяли токсичность всех препаратов ЛПС для интактных животных и мышей, сенсibilизированных D-галактозамином (D-GalN). Доза всех пре-

паратов ЛПС, вводимая при первичной активации иммунных клеток, была нетоксична для биопробных животных и равнялась 50 мкг/мышь. Для повышения чувствительности животных к действию ЛПС повторное введение ЛПС проводили через 90 мин совместно с D-GalN [1]. При повторной активации использовали дозы ЛПС, которые на фоне D-GalN вызывали гибель 100 % животных (20 мкг/мышь). Каждая экспериментальная группа состояла из 10 животных. Отсутствие гибели белых мышей после повторного введения им препарата ЛПС служило показателем эндотоксиновой толерантности. Степень толерантности оценивали, используя условные критерии: полная толерантность – при повторной активации выживало  $\geq 50$  % животных, частичная (или неполная) – живыми оставалось менее 50 % мышей. Гибель 100 % белых мышей свидетельствовала об отсутствии толерантности.

### Результаты и обсуждение

Эффект эндотоксиновой толерантности оценивали для различных форм ЛПС: ЛПС28 и ЛПС37 *Y. pestis* EV 76 и *Y. pestis* 231. Коммерческие препараты R- и S-форм ЛПС *Escherichia coli*, молекулярный механизм иммунного действия которых достаточно полно изучен, использовали для сравнения. Экспериментальная «сетка» включала 36 вариантов постановки опытов с учетом всех возможных сочетаний шести препаратов ЛПС при первичной и повторной активации. А именно, первичная активация белых мышей одним из препаратов ЛПС являлась «фоном» для повторной активации всеми шестью формами ЛПС, взятыми в работу. Такие «перекрестные» сочетания позволяли судить о степени идентичности молекулярных механизмов действия исследуемых ЛПС в условиях *in vivo*.

Результаты проведенных экспериментов представлены в таблице. Анализ полученных данных позволяет условно выделить две группы ЛПС, сочетание которых вызывает различный иммунный ответ организма: это все варианты взаимодействия ЛПС *Y. pestis* с ЛПС *Y. pestis* и варианты сочетаний ЛПС *Y. pestis*/ЛПС *E. coli*. Как выяснилось, первичная и повторная активация белых мышей препаратами ЛПС чумного микроба во всех случаях приводит к подавлению

воспалительного ответа организма, при этом эффект эндотоксиновой толерантности не зависит от температурных вариаций химического строения ЛПС *Y. pestis*, штаммовых различий, а также последовательности введения препаратов. Степень толерантности достаточно монотонна – в 14 случаях из 16 выживало  $\geq 50$  % животных, т. е. наблюдалась полная толерантность, и лишь для сочетаний ЛПС28 *Y. pestis* EV 76 / ЛПС 28 *Y. pestis* 231 и ЛПС37 *Y. pestis* EV 76 / ЛПС28 *Y. pestis* EV 76 отмечена толерантность частичного типа (жизнеспособны менее 50 %).

Иная закономерность иммунного ответа наблюдается при комбинации ЛПС *Y. pestis* с ЛПС *E. coli*. Как выяснилось, в проявлении феномена толерантности для ЛПС вакцинного штамма принципиальным является не химическое строение, а последовательность введения препаратов ЛПС биопробным животным. В случае, когда первичная обработка животных проводится ЛПС28 или ЛПС37 *Y. pestis* EV 76, а повторная – S- или R-формами ЛПС *E. coli*, наблюдается гибель 100 % животных, т.е. эффект толерантности отсутствует. При обратной последовательности введения ЛПС – сначала S- или R-форма ЛПС *E. coli*, а затем ЛПС28 или ЛПС37 *Y. pestis* 76 – воспалительный ответ подавлен (защита  $\geq 50$  %). Факт влияния последовательности введения ЛПС различных видов бактерий на проявление толерантности у биопробных животных описан в литературе, но научного объяснения в настоящее время не имеет [2].

Для ЛПС вирулентного штамма в воспроизведении феномена толерантности ЛПС *Y. pestis* 231 / ЛПС *E. coli*, в отличие от вакцинного *Y. pestis* EV 76, существенную роль играет не последовательность введения препаратов ЛПС, а химическое строение ЛПС как чумного микроба, так и ЛПС *E. coli*. Экспериментально установлено, что все сочетания R-формы ЛПС *E. coli* с ЛПС28 и ЛПС37 *Y. pestis* 231 защищают животных от гибели, при этом выживают  $\geq 50$  %. В экспериментах с S-формой ЛПС *E. coli* эффект толерантности, как оказалось, различен для ЛПС28 и ЛПС37 *Y. pestis* 231. При сочетании S-формы ЛПС *E. coli* с ЛПС37 *Y. pestis* 231 в любой последовательности отмечается гибель 100 % животных. В то же время при комбинации S-формы ЛПС *E. coli* с ЛПС28 *Y. pestis* 231 наблюдается эффект полной толерантности (жизнеспособны  $\geq 50$  %).

Эффект гомо- и гетеротолерантности к ЛПС *Y. pestis* и *E. coli* на модели белых мышей, обработанных D-GalN

Препараты ЛПС* (первичное введение)	Препараты ЛПС** (повторное введение на фоне D-GalN***)					
	ЛПС37 <i>Y. pestis</i> 231	ЛПС28 <i>Y. pestis</i> 231	ЛПС37 <i>Y. pestis</i> EV 76	ЛПС28 <i>Y. pestis</i> EV 76	S-ЛПС <i>E. coli</i>	R-ЛПС <i>E. coli</i>
ЛПС37 <i>Y. pestis</i> 231	+	+	+	+	-	±
ЛПС28 <i>Y. pestis</i> 231	+	+	+	+	+	±
ЛПС37 <i>Y. pestis</i> EV 76	+	+	+	±	-	-
ЛПС28 <i>Y. pestis</i> EV 76	+	±	+	+	-	-
S-ЛПС <i>E. coli</i>	-	+	+	+	+	±
R-ЛПС <i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+

\*Доза ЛПС – 50 мкг/мышь. \*\*Доза ЛПС – 20 мкг/мышь. \*\*\*Доза D-GalN – 30 мг/мышь.

Примечания: «+» – количество выживших мышей  $\geq 50$  %; «±» – количество выживших мышей < 50 %; «-» – 100 % гибель мышей.

Обращает на себя внимание тот факт, что в экспериментах с ЛПС28 и ЛПС37 вирулентного штамма *Y. pestis* 231 / R- и S-формы ЛПС *E. coli* результаты близки к эффекту, наблюдаемому в контрольных опытах по перекрестному введению биопробным животным препаратов R- и S-форм ЛПС *E. coli*. Сходство иммунных ответов между ЛПС28 *Y. pestis* 231 и S-ЛПС *E. coli* позволяет предположить, что молекулярный механизм активации и передачи сигнала ЛПС28 максимально приближен к таковому S-формы *E. coli*. Аналогия, которая прослеживается между ЛПС37 *Y. pestis* 231 и R-ЛПС *E. coli*, свидетельствует о том, что действие ЛПС37 *Y. pestis* 231 сопоставимо, но не идентично с действием R-ЛПС *E. coli*.

По литературным данным, рестимуляция TLR 2, 4, 9 иммунокомпетентных клеток различной органной и видовой принадлежности ЛПС чумного микроба на фоне S-ЛПС *E. coli* всегда приводит к супрессии синтеза провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$  и IL-1 [7]. Результаты наших экспериментов в основном совпадают с результатами аналогичных опытов, выполненных в условиях *in vitro*. Исключением является сочетание препаратов ЛПС37 *Y. pestis* 231 и S-ЛПС *E. coli*, введение которых биопробным животным в любой последовательности не приводит к подавлению воспалительного ответа. Эксперименты с ЛПС *Y. pestis* / ЛПС *E. coli* свидетельствуют о том, что ответ организма на воздействие ЛПС28 и ЛПС37 вакцинного и вирулентного штаммов различен и может варьировать от полной или частичной толерантности до полного ее отсутствия. При этом общая закономерность для всех форм ЛПС чумного микроба заключается в подавлении сигнала, вызванного действием R-ЛПС *E. coli*.

Таким образом, в данной работе установлено, что иммунный ответ организма при сочетании ЛПС *Y. pestis* / ЛПС *Y. pestis* отличается от взаимодействия ЛПС *Y. pestis* / ЛПС *E. coli*. Эксперименты с ЛПС *E. coli* позволили выявить различия в иммуномодулирующем действии всех изученных форм ЛПС *Y. pestis*. В то же время при использовании для первичной и повторной активации биопробных животных ЛПС только чумного микроба эти различия нивелируются, и наблюдается эффект эндотоксиновой толерантности.

Общность иммунного ответа на действие раз-

личных по химической структуре ЛПС *Y. pestis* предполагает идентичность молекулярных механизмов процесса эндотоксиновой толерантности для всех форм ЛПС чумного микроба. Дальнейшее изучение этого феномена позволит определить специфику иммуномодулирующего действия ЛПС *Y. pestis* при развитии инфекционного процесса в условиях макроорганизма.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Демидова Г.В., Зюзина В.П., Соколова Е.П., Бородина Т.Н., Беспалова И.А., Пасюкова Н.И. и др. Токсичность липополисахаридов вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV 76 для белых мышей, сенсibilизированных D-галактозамином. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2011; 1:74–6.
2. Dalpke A., Lehner M. D., Hartung T., Heeg K. Differential effects of CpG-DNA in Toll-like receptor-2/-4/-9 tolerance and cross-tolerance. Immunology. 2005; 116:203–12.
3. Kawahara K., Tsukano H., Watanabe H., Matsuura M. Modification of the structure and activity of lipid A in *Yersinia pestis* lipopolysaccharide by growth temperature. Infect. Immun. 2002; 70(8):4092–8.
4. Knirel Y.A., Linder B., Vinogradov E.V., Kocharova N.A., Senchenkova S.N., Shakhutdinova R.Z. et al. Temperature dependent variations and intraspecies diversity of the structure of the lipopolysaccharides of *Yersinia pestis*. Biochemistry. 2005; 44:731–43.
5. Matsuura M., Takahashi H., Watanabe H., Sato S., Kawahara K. Immunomodulatory properties of *Yersinia pestis* lipopolysaccharides on human macrophages. Clin. Vaccine Immunol. 2010; 17(1):9–55.
6. Montminy S., Khan N., McGrath S., Walkowicz M.J., Sharp F., Conlon J.E. et al. Virulent factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response. Nature Immun. 2006; 7(10):1066–73.
7. Telepnev M.V., Klimpel G.R., Haithcoat J., Knirel Y.A., Anisimov A.P. Tetraacylated lipopolysaccharide of *Yersinia pestis* can inhibit multiple Toll-like receptor-mediated signaling pathways in human dendritic cells. J. Infect. Dis. 2009; 200(11):1694–702.
8. Westphal O., Jann K. Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure. Methods carbohydr. Chem. 1965; 5:83–91.

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

1. Demidova G.V., Zyuzina V.P., Sokolova E.P., Borodina T.N., Bepalova I.A., Pasyukova N.I. et al. [Toxicity of *Yersinia pestis* EV 76 lipopolysaccharides for mice sensitized by D galactosamine]. Zh. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol. 2011; 1:74–6.

#### Authors:

Demidova G.V., Zyuzina V.P., Sokolova E.P., Pasyukova N.I., Bepalova I.A., Borodina T.N., Tynyanova V.I. 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:

Демидова Г.В., Зюзина В.П., Соколова Е.П., Пасюкова Н.И., Беспалова И.А., Бородина Т.Н., Тынянова В.И. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru

Поступила 29.11.11.

Н.А.Киршева, Е.А.Ганина, Т.И.Комбарова, Р.З.Шайхутдинова, С.В.Дентовская, А.П.Анисимов

**ИНФЕКЦИОННАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МЫШЕЙ ЛИНИИ BALB/C К ЗАРАЖЕНИЮ PHOTORHABDUS ASYMBIOTICA И PHOTORHABDUS TEMPERATA**

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

Проведена сравнительная оценка вирулентности представителей рода *Photorhabdus* (семейство *Enterobacteriaceae*), отличающихся по патогенности для человека, в отношении мышей при подкожном (п/к) и внутрибрюшинном (в/б) заражении. Показано, что исключительно энтомопатогенный штамм *P. temperata* subsp. *cinerea* 3107<sup>T</sup> авирулентен для мышей линии BALB/c ( $LD_{50\text{п/к}} > 10^8$  КОЕ,  $LD_{50\text{в/б}} > 10^8$  КОЕ), а гибель лабораторных животных вызывают только бактерии вида *P. asymbiotica*, выделенные от больных людей: subsp. *australis* AU81 ( $LD_{50\text{п/к}} = 3,2 \cdot 10^7$  ( $10^7 - 3,2 \cdot 10^8$ ) КОЕ,  $LD_{50\text{в/б}} = 10^6$  ( $2,5 \cdot 10^5 - 4,0 \cdot 10^6$ ) КОЕ) и subsp. *asymbiotica* US86 ( $LD_{50\text{п/к}} = 3,2 \cdot 10^7$  ( $10^7 - 3,2 \cdot 10^8$ ) КОЕ,  $LD_{50\text{в/б}} = 5,6 \cdot 10^7$  ( $1,4 \cdot 10^7 - 2,8 \cdot 10^8$ ) КОЕ). Определены патоморфологические изменения в органах животных, зараженных штаммами *Photorhabdus* spp.

*Ключевые слова:* вновь возникающие инфекции, фоторабдоз, *Photorhabdus asymbiotica*, *Photorhabdus temperata*.

N.A.Kirsheva, E.A.Ganina, T.I.Kombarova, R.Z.Shaikhutdinova, S.V.Dentovskaya, A.P.Anisimov

**Infectious Sensitivity of BALB/c Mice to Infestation with *Photorhabdus asymbiotica* and *Photorhabdus temperata***

State Research Centre of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

Carried out is the comparative assessment of *Photorhabdus* genera (*Enterobacteriaceae* family) representatives, different in their pathogenicity for humans, virulence for mice in case of subcutaneous and intraperitoneal inoculation. It is indicated that entomopathogenic strain *P. temperata* subsp. *cinerea* 3107<sup>T</sup> alone is avirulent for BALB/c mice ( $LD_{50\text{subcut}} > 10^8$  КОЕ,  $LD_{50\text{intrapert}} > 10^8$  КОЕ); while the death of laboratory animals is caused only by *P. asymbiotica* bacteria, isolated from infected people: subsp. *australis* AU81 ( $LD_{50\text{subcut}} = 3,2 \cdot 10^7$  ( $10^7 - 3,2 \cdot 10^8$ ) КОЕ,  $LD_{50\text{intrapert}} = 10^6$  ( $2,5 \cdot 10^5 - 4,0 \cdot 10^6$ ) КОЕ) and subsp. *asymbiotica* US86 ( $LD_{50\text{subcut}} = 3,2 \cdot 10^7$  ( $10^7 - 3,2 \cdot 10^8$ ) КОЕ,  $LD_{50\text{intrapert}} = 5,6 \cdot 10^7$  ( $1,4 \cdot 10^7 - 2,8 \cdot 10^8$ ) КОЕ). Identified are the patho-morphological changes in the organs of animals, inoculated with *Photorhabdus* spp. strains.

*Key words:* re-emerging infections, photorhabdosis, *Photorhabdus asymbiotica*, *Photorhabdus temperata*.

Род *Photorhabdus* семейства *Enterobacteriaceae* включает три вида подвижных, биолюминесцентных, энтомопатогенных почвенных грамотрицательных бактерий: *P. temperata*, *P. luminescens* и *P. asymbiotica*. Бактерии всех трех видов образуют симбиотические комплексы с нематодами семейства *Heterorhabditidae*, вызывающие гибель личинок широкого круга насекомых [3]. *Photorhabdus* spp. колонизируют кишечный тракт молодых особей почвенных нематод. Нематоды проникают в организм личинок чувствительных насекомых и обсеменяют его бактериями, которые размножаются и секретируют инсектицидные токсины, вызывая гибель насекомого и способствуя как собственной репродукции, так и размножению нематод за счет обеспечения их питательными веществами, содержащимися в трупe насекомого. Фоторабдусы выделяют целый спектр antimicrobных субстанций, препятствующих размножению других микроорганизмов в трупe насекомого. После поглощения тканей погибшего насекомого, обсемененных фоторабдусами, нематоды перебираются в организм нового хозяина [2].

В конце 1980-х – начале 1990-х годов в США и Австралии зарегистрировали несколько случаев необычных заболеваний людей, сопровождавшихся появлением на коже гноящихся язв, поражением

мягких тканей, в 80 % случаев – гематогенной диссеминацией с образованием вторичных септических очагов поражения, а в 30 % случаев – бактериемией. Из пораженных тканей были выделены бактерии вида *P. asymbiotica*, причем заболевания, вызванные австралийским подвидом – subsp. *Australis*, протекали тяжелее, чем инфекция, вызванная американским подвидом – subsp. *asymbiotica*. Вероятно, число заболевших людей значительно выше, чем это отражено в научных публикациях. В большинстве случаев при лабораторной диагностике этот микроорганизм расценивают как вторичную микрофлору раневых поверхностей, а не этиологический агент заболевания [5].

Показано, что *P. asymbiotica* – факультативный внутриклеточный патоген, способный размножаться в человеческих макрофагоподобных клетках и клетках насекомых. Штаммы австралийского подвида, в отличие от американского, способны к инвазии в нефагоцитирующие клетки человека. Клинические изоляты из Австралии вызывают апоптоз макрофагоподобных клеток уже через 6 ч после начала эксперимента, а американские – только через 24 ч [4].

В доступной литературе мы не обнаружили данных о воспроизведении фоторабдоза на модели теплокровных лабораторных животных. В данной работе проведена оценка инфекционной чувствительности

мышей линии BALB/c к заражению *P. asymbiotica* и *P. temperata*.

### Материалы и методы

В работе использовали клинические изоляты *P. asymbiotica* AU81 (subsp. *australis*) и US86 (subsp. *asymbiotica*) [4], предоставленные R.Zumbihl (Université Montpellier II, UMR1133 Laboratoire EMIP, F-34095 Montpellier, France), и штамм *P. temperata* subsp. *cinerea* 3107<sup>T</sup> [6], полученный от T.Lakatos (Research and Extension Centre for Fruit Growing, Vadastag 2, H-4244 Ujfehértó, Hungary). Бактерии выращивали на агаре Хоттингера с добавлением 1 % гемолизированной крови в течение 24 ч при температуре 28 °С.

Оценку вирулентности проводили на мышах линии BALB/c при подкожном и внутрибрюшинном введении десятикратных разведений (от 10<sup>8</sup> КОЕ до 1 КОЕ) культур *Photorhabdus* spp. в изотоническом растворе NaCl в объеме 0,1 мл на животное (по четыре животных в группе). Наблюдение за зараженными животными проводили в течение 21 сут. Погибших в ходе эксперимента и умерщвленных после его завершения животных вскрывали и подвергали бактериологическому исследованию. Вычисление величин LD<sub>50</sub> проводили по методу Kärber в модификации И.П.Ашмарина и А.А.Воробьева [1].

Кусочки органов животных (регионарные лимфатические узлы, селезенка, тимус, печень, легкое, почка, тонкий и толстый кишечник) фиксировали в 10 % формалине при комнатной температуре, дегидратировали в спиртах восходящей концентрации, заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4 мкм для микроскопии окрашивали гематоксилин-эозином.

### Результаты и обсуждение

Проведена оценка вирулентности трех штаммов *Photorhabdus* spp. Мы использовали два способа заражения мышей: подкожный и внутрибрюшинный, т.к. естественный путь заражения человека фоторабдозом пока не установлен [7], а инфекционная чувствительность при разных способах заражения может значительно отличаться. Как при п/к, так и при в/б способе введения гибель мышей, зараженных максимальными дозами *P. asymbiotica* AU81 и *P. asymbiotica* US86, наблюдали в течение первых трех суток. Средние сроки гибели для *P. asymbiotica* US86 составили при п/к заражении 2,7 сут, при в/б – 1 сут, а для *P. asymbiotica* AU81 при п/к заражении – 1 сут, при в/б – 1,4 сут. Мы не выявили достоверных отличий в величине LD<sub>50</sub> штаммов *P. asymbiotica* обоих подвидов при подкожном способе введения (таблица). При внутрибрюшинном заражении мышей LD<sub>50</sub> для *P. asymbiotica* subsp. *australis* AU81 была достоверно ниже аналогичного показателя для *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* US86. В то же время мыши,

зараженные *P. temperata* 3107<sup>T</sup>, оставались живыми на протяжении всего срока наблюдения. Таким образом, штаммы вида *P. asymbiotica*, способные вызывать заболевания у людей, оказались вирулентными и для лабораторных животных, в то время как представитель патогенного только для насекомых вида *P. temperata* не вызывал гибели мышей.

У погибших животных в месте введения микробной культуры наблюдали ярко-выраженную гиперемию и инъекцию сосудов подкожной клетчатки. В высевах из органов павших мышей (регионарный лимфоузел, печень, селезенка) и крови из сердца отмечали рост колоний заражающих штаммов. На 8-е сутки у части мышей, выживших после заражения *P. asymbiotica* AU81 и US86, на коже хвоста появились язвенные гнойно-некротические очаги диаметром 1–3 мм, при бактериологических посевах коростовых образований которых выявили рост культур *P. asymbiotica*. Известно, что гнойное поражение мягких тканей с образованием абсцессов является характерным клиническим симптомом фоторабдоза человека [5]. Появление отдаленных от места введения гнойных очагов у мышей подтверждает гематогенную диссеминацию возбудителя в ходе инфекционного процесса.

Характер патоморфологических изменений органов мышей, павших после заражения штаммами *P. asymbiotica* AU81 и US86, был сходен. Имело место неравномерное полнокровие и стаз крови в кровеносных сосудах подкожной клетчатки. В некоторых сосудах легких отмечено изменение состояния крови – в норме гомогенная плазма выглядела как рыхлое сплетение тонких волокон. В печени наблюдали дистрофию и цитоллиз отдельных гепатоцитов. В почках – резкое полнокровие мозгового слоя. Кроме того, обнаружили делимфотизацию органов иммуногенеза: селезенки, лимфатических узлов, тимуса. При этом штамм AU81 вызывал более тяжелое течение инфекции. Наряду с указанной патологией, в синусах красной пульпы селезенки, как и в сосудах легких, имели место агрегация и выпадение компонентов плазмы в виде нитчатых структур, в тимусе – мелкоглыбчатый распад лимфоцитов.

Мы не выявили патологии во внутренних органах мышей, выживших после заражения любым из исследованных штаммов. Изменения, затрагивающие лимфатическую систему, имели продуктивный характер и, видимо, были обусловлены иммунной

Вирулентность штаммов *Photorhabdus* spp. для мышей линии BALB/c

Штамм <i>Photorhabdus</i> spp.	LD <sub>50</sub> КОЕ*	
	п/к заражение	в/б заражение
<i>P. asymbiotica</i> subsp. <i>asymbiotica</i> US86	3,2·10 <sup>7</sup> (10 <sup>7</sup> –3,2·10 <sup>8</sup> )	5,6·10 <sup>7</sup> (1,4·10 <sup>7</sup> –2,8·10 <sup>8</sup> )
<i>P. asymbiotica</i> subsp. <i>australis</i> AU81	3,2·10 <sup>7</sup> (10 <sup>7</sup> –3,2·10 <sup>8</sup> )	10 <sup>6</sup> (2,5·10 <sup>5</sup> –4,0·10 <sup>6</sup> )
<i>P. temperata</i> subsp. <i>cinerea</i> 3107 <sup>T</sup>	> 10 <sup>8</sup>	> 10 <sup>8</sup>

\*95 % доверительный интервал указан в круглых скобках.

перестройкой лимфоидной ткани. У мышей, зараженных штаммом US86, морфологическая перестройка в лимфоидных органах соответствовала гуморальному типу иммунного ответа. Имело место значительное накопление плазматических клеток и плазмобластов в гиперплазированной красной пульпе селезенки и мозговом веществе лимфатических узлов, проходящее на фоне активной пролиферации в центрах размножения лимфатических фолликулов. В иммунный процесс была вовлечена и лимфоидная ткань кишечника. Отмечено увеличение количества и размеров субэпителиальных скоплений лимфоцитов в толстом кишечнике, а также значительное усиление инфильтрации плазматическими клетками слизистой оболочки толстого и тонкого кишечника. Кроме того, у мышей выявили признаки стимуляции Т-клеточного звена иммунитета. Были увеличены активность и количество лимфоцитов в корковом и мозговом веществе тимуса, а также в тимусзависимых зонах селезенки и лимфатических узлов. У мышей, зараженных штаммом AU81, были наиболее выражены изменения в селезенке и лимфатических узлах: клеточная пролиферация в В-зависимых зонах лимфоидной ткани и плазматическая трансформация лимфоцитов, характерные для гуморальной иммунной реакции. При этом общая интенсивность иммунной перестройки в организме была несколько ниже, чем у мышей, зараженных штаммом US86. Меньше плотность клеточной инфильтрации тимусзависимых зон. В кишечнике лимфоидная ткань на уровне контроля. Наряду с продуктивной иммунной реакцией, у мышей, зараженных штаммом AU81, в крови обнаружили увеличение количества полиморфно-ядерных лейкоцитов. Визуально отмечали повышение количества лейкоцитов в сосудах легких, печени, синусах селезенки. Так как очаги гнойного воспаления во внутренних органах мышей не выявлены, то, вероятно, лейкоцитоз в данном случае был обусловлен пролонгацией острой фазы язвенного дерматита.

Реакция на введение непатогенного для теплокровных животных штамма *P. temperata* 3107<sup>T</sup> была ограничена образованием небольшого количества плазматических клеток в селезенке и лимфатических узлах.

Таким образом, впервые определены величины LD<sub>50</sub> для штаммов *P. asymbiotica* US86 (subsp. *asymbiotica*), AU81 (subsp. *australis*) и *P. temperata* 3107<sup>T</sup> (subsp. *cinerea*) при подкожном и внутрибрюшинном заражении мышей (подобраны модельные лабораторные животные для изучения фоторабдоза человека) и определены патоморфологические изменения в органах животных, зараженных штаммами *Photorhabdus* spp. Гибель экспериментальных мышей при заражении штаммами *P. asymbiotica* US86

и AU81 была вызвана токсическим действием на организм и связана с расстройством гемодинамики, изменением свертываемости крови, нарушением лимфоэоза в органах иммуногенеза. Прямое токсическое повреждение клеток выявили только в печени и (для штамма *P. asymbiotica* AU81) тимусе. Наиболее патогенным оказался штамм AU81 австралийского подвида как по тяжести патологии у павших, так и по длительности лейкоцитоза у выживших животных. Для мышей, выживших после заражения штаммами *P. asymbiotica* US86 и AU81, характерен морфологически выраженный процесс плазматизации лимфоидной ткани, связанный с сохранением необходимости выработки гуморальных факторов защиты. Патолого-анатомическим признаком заболевания являются гнойно-некротические язвы в коже выживших животных. Штамм *P. temperata* 3107<sup>T</sup> не патогенен и не иммуногенен для мышей. Характер гистологических изменений не зависел от способа заражения.

Работа выполнена в рамках проекта РФФИ № 10-04-00501-а. Выражаем глубокую благодарность доктору R.Zumbihl и доктору T.Lakatos за предоставленные штаммы *Photorhabdus* spp.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. 180 с.
2. An R., Grewal P.S. Molecular mechanisms of persistence of mutualistic bacteria *Photorhabdus* in the entomopathogenic nematode host. PLoS One. 2010; 5(10):e13154.
3. Clarke D.J. *Photorhabdus*: a model for the analysis of pathogenicity and mutualism. Cell Microbiol. 2008; 10(11):2159–67.
4. Costa S.C.P., Girard P.A., Brehelin M., Zumbihl R. The emerging human pathogen *Photorhabdus asymbiotica* is a facultative intracellular bacterium and induces apoptosis of macrophage-like cells. Infect. Immun. 2009; 77(3):1022–30.
5. Gerrard J., Waterfield N., Vohra R., French-Constant R. Human infection with *Photorhabdus asymbiotica*: an emerging bacterial pathogen. Microbes Infect. 2004; 6(2):229–37.
6. Tóth T., Lakatos T. *Photorhabdus temperata* subsp. *cinerea* subsp. nov., isolated from *Heterorhabditis* nematodes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2008; 58(Pt 11):2579–81.
7. Waterfield N., Ciche T., Clarke D. *Photorhabdus* and a host of hosts. Annu. Rev. Microbiol. 2009; 63:557–74.

#### 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.

#### Authors:

Kirshева N.A., Ganina E.A., Kombarova T.I., Shaikhutdinova R.Z., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

#### Об авторах:

Киришева Н.А., Ганина Е.А., Комбарова Т.И., Шайхутдинова Р.З., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Московская обл., п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 28.06.11.

С.Н.Клюева, Т.Н.Щуковская, Т.П.Шмелькова, А.Л.Кравцов, С.А.Бугоркова, Н.И.Смирнова,  
О.А.Волох, Т.Л.Захарова, Н.И.Белякова, С.А.Еремин, А.К.Никифоров

## ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА В-СУБЪЕДИНИЦЫ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА

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

Проведена иммунобиологическая оценка препаратов В-субъединицы холерного токсина (ХТ), полученных различными экспериментально-производственными способами. Показано, что препараты В-субъединицы не токсичны для биомodelей и не вызывают в их органах и тканях значимых патоморфологических изменений. Отсутствие изменений в состоянии иммунокомпетентных клеток на различных стадиях клеточного цикла, а также способность исследуемых препаратов инициировать иммунитет по наличию синтеза антител к В-субъединице ХТ дают основание считать препараты В-субъединицы перспективными компонентами холерной вакцины.

*Ключевые слова:* В-субъединица холерного токсина, токсичность, протективность, апоптоз, антитоксические антитела.

S.N.Klyueva, T.N.Shchukovskaya, T.P.Shmel'kova, A.L.Kravtsov, S.A.Bugorkova, N.I.Smirnova, O.A.Volokh,  
T.L.Zakharova, N.I.Belyakova, S.A.Eremin, A.K.Nikiforov

### Immunobiological Characteristics of Cholera Toxin B-Subunit

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Carried out was immunobiological evaluation of cholera toxin B subunit preparations obtained using different experimental and production methods. It was demonstrated that B subunit preparations were non-toxic for biomodels and did not cause significant pathological alterations in their organs and tissues. They also did not alter the condition of immunocompetent cells at different stages of their cycle, and promote anti-toxic antibodies production. Thus, B subunit preparations under study can be considered as promising components of cholera vaccine.

*Key words:* cholera toxin B-subunit, toxicity, protective ability, apoptosis, anti-toxic antibodies.

Высокий уровень заболеваемости холерой в мире диктует необходимость оценить с новых позиций потребность в создании эффективной экономической холерной вакцины, проведении массовой вакцинации против холеры [8].

Проводимая во ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» модернизация производства холерной химической вакцины на основе внедрения новейших производственных биотехнологий с применением сконструированных и запатентованных авирулентных генно-инженерных штаммов-продуцентов основных протективных антигенов холерного вибриона (соматического О-антигена сероваров Инаба и Огава, О139 антигена, В-субъединицы холерного токсина) позволит повысить эффективность и качество холерной вакцины, способной инициировать у привитых формирование иммунитета против заражения всеми известными эпидемически опасными штаммами возбудителя холеры [3, 5, 10, 14].

Ключевым фактором вирулентности возбудителя холеры является ХТ с молекулярной массой 85 кДа. ХТ состоит из А-субъединицы, отвечающей за токсическую активность, и В-субъединицы, обеспечивающей связывание с рецепторами эпителиальных клеток тонкой кишки. В-субъединица нетоксична, является одним из основных иммуногенных компонентов, формирует антитоксический иммунитет. При добавлении В-субъединицы ХТ к оральным вакцинам стимулируется образование IgA в кишеч-

нике, что увеличивает защитный эффект вакцинации до 9 месяцев.

Целью исследования явилась комплексная иммунологическая и морфологическая оценка действия экспериментальных препаратов В-субъединицы ХТ в процессе формирования иммунного ответа.

### Материалы и методы

В работе использовали препараты В-субъединицы ХТ: концентрат В-субъединицы, полученный с помощью технологии концентрирования «кросс-флоу» (Вк); В-«ультрафильтрат» (Ву), полученный с помощью технологии дифференциальной ультрафильтрации; хроматографически очищенная В-субъединица (Вх). Продуцентом для вышеперечисленных препаратов являлся рекомбинантный штамм *V. cholerae* non O1 KM93, содержащий гибридную плазмиду pJEM<sub>3</sub> с клонированными генами *vctB*, детерминирующими синтез В-субъединицы холерного токсина [4]. В качестве препарата сравнения использовалась хроматографически очищенная В-субъединица, полученная из ХТ производственного штамма *V. cholerae* 569В (Впр). Все исследуемые препараты прошли контроль специфической стерильности.

Исследования проводили на нелинейных белых мышах смешанного поголовья и мышах инбредной линии Balb/c, полученных из отдела экспериментальных животных с виварием РосНИПЧИ «Микроб» и

отобранных методом случайной выборки.

Испытание препаратов В-субъединицы ХТ на острую токсичность (действие препарата, проявляющееся после его однократного применения) проводили на нелинейных белых мышах (19±1) и (11±1) г [7]. Препараты В-субъединицы ХТ (Вк, Ву, Вх, Впр) вводили внутривентриально 4 группам нелинейных белых мышей (по 10 животных в каждой группе) в дозе 50 мкг в объеме 0,5 мл. 5-й группе мышей вводили препарат Вк в дозе 33 мкг/0,5 мл. Контрольной группе внутривентриально вводили физиологический раствор в количестве 0,5 мл. Наблюдение за животными осуществляли ежедневно в течение 7 сут.

Протективные свойства препаратов В-субъединицы ХТ определяли в тесте активной защиты мышшей, подсчитывали LD<sub>50</sub> и ее доверительные интервалы с вероятностью 95 %. 16 групп нелинейных белых мышшей (11±1) г (по 6 мышшей каждая) иммунизировали внутривентриально препаратами В-субъединицы ХТ в дозах 0,4, 2, 10, 50 мкг. Контрольной группе из 10 животных вводили физиологический раствор. На 21-е сутки после иммунизации препаратами В-субъединицы ХТ заражали мышшей внутривентриально взвесью штамма *V. cholerae* Eltor Ogawa P-3122 дозой 300 LD<sub>50</sub>. Контрольной группе из 10 мышшей вводили то же количество LD<sub>50</sub>, что и иммунным животным. Наблюдения за зараженными животными проводили в течение 3 сут. В группах иммунных и зараженных белых мышшей для определения ImD<sub>50</sub> (средняя иммунизирующая доза) подсчитывали количество выживших животных [1].

Клетки костного мозга и селезенки получали общепринятыми методами. Лейкоциты крови выделяли из гепаринизированной крови экспресс-методом путем осмотического шока эритроцитов с последующим восстановлением водно-солевого баланса. Для цитофлуориметрического исследования лейкоциты, спленоциты и клетки костного мозга отмывали, помещали в 70 % раствор этилового спирта для перфорации клеточной и ядерной мембран и окрашивали смесью флуоресцирующих красителей митрамицина и этидиум бромид [11].

Определение титра антител к В-субъединице ХТ в сыворотке крови нелинейных белых мышшей, иммунизированных экспериментальными сериями препаратов В-субъединицы, проводили на 21-е сутки после иммунизации методом ИФА [12]. Для этого лунки микротитрационных планшетов сенсibilizировали ганглиозидом GM-1 при комнатной температуре (22±2) °С в течение 18 ч. После блокировки свободных сайтов на шейкере при температуре 37 °С раствором BSA вносили В-субъединицу ХТ (Вх или препарат контрольной В-субъединицы – SBL Vaccin AB, Швеция, лот KV7240B3). Связанные антитела выявляли с помощью конъюгата антимишшиных иммуноглобулинов IgG(H+L), меченных пероксидазой хрена (НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи) в рабочем разведении в буфере для конъюгата. В качестве хромогенного субстрата использовали диамониевую

соль ABTS – 2, 2'-азино-бис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота). Результаты учитывали по оптической плотности образцов при длине волны 405 нм на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 3200 (Awareness Technology Inc., США), считая позитивными лунки, в 1,5 и более раза превышающие по интенсивности окраски контрольные. Полученные данные обрабатывали согласно методу определения среднего геометрического титра [2].

Для гистологического исследования забирали кусочки органов (сердце, легкие, печень, селезенка, почки с надпочечниками, мезентериальные лимфатические узлы, по три отрезка тонкого и толстого кишечника). Материал фиксировали в 10 % нейтральном растворе формалина, обезжизняли, пропитывали и заливали в парафин по общепринятой схеме [9]. Полутонкие срезы органов окрашивали гематоксилином и эозином [6] и просматривали в световом микроскопе Olympus CX31 при увеличениях ×100 и 200. Для морфометрического анализа подсчитывали среднее количество клеток (бокаловидных клеток, элементов клеточного инфильтрата – лейкоцитов, лимфоцитов, плазматиков, эозинофилов) в 10 полях зрения срезов тонкого и толстого кишечника при увеличении ×200; количество межэпителиальных лимфоцитов (МЭЛ) тонкого кишечника и лимфоцитов покровного эпителия толстого кишечника определяли на 1000 ядер энтероцитов при увеличении ×200; количество звездчатых ретикулоэндотелиоцитов (клеток Купфера) подсчитывали в 10 полях зрения правильно ориентированных срезов печени при увеличении ×200. Степень активности отдельных структур лимфоидных органов (Т- и В-зон) оценивали полуколичественным методом по 3-балльной шкале (от 0 до 3): 0 баллов – отсутствие активности; 1 балл – слабо выраженная активность; 2 балла – умеренно выраженная активность; 3 балла – резко выраженная активность.

Профили распределения эукариотических клеток по фазам клеточного цикла (ДНК-гистограммы) получали путем количественного измерения уровня свечения каждого из клеточных элементов в области спектра свыше 550 нм на проточном цитофлуориметре ICP-22 PHUYWE (Германия), оснащенном 2048 канальным амплитудным анализатором импульсов Orto Instruments (Westwood, Mass USA) для автоматической сортировки клеток и построения гистограмм. В каждом образце анализировалось не менее 20000 клеток. Клетки в апоптозе, несущие <2С ДНК, подсчитывали (в %) как отношение площади участка ДНК гистограммы (слева от диплоидного пика G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>) к площади всей гистограммы (суммарное число зарегистрированных клеток), умноженное на 100 %. Делящиеся (пролиферирующие) клетки (S+G<sub>2</sub>+M), несущие >2С ДНК, подсчитывали (в %) как отношение площади участка ДНК гистограммы (справа от диплоидного пика G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>) к площади всей гистограммы (суммарное число зарегистрированных клеток), умноженное на 100 %. Для количественного учета процессов апоптоза и пролиферации использовали

коэффициент, который равен отношению апоптотических клеток к пролиферирующим и отражает баланс этих процессов [13].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием стандартного пакета программы Microsoft Office Excel 2010.

### Результаты и обсуждение

В течение всего срока наблюдения при фиксации общего состояния животных, особенностей их поведения, интенсивности и характера двигательной активности, состояния волосяного и кожного покрова, положения хвоста, консистенции фекальных масс, окраски мочи, изменения массы тела отклонений от нормы не выявлено. Исследуемые препараты В-субъединицы в дозах 50 мкг/0,5 мл и 33 мг/0,5 мл не являлись токсичными для животных.

Установлено, что наибольшей протективной активностью обладали хроматографически очищенные препараты В-субъединицы ХТ (Вх и Впр).  $ImD_{50}$  этих препаратов в среднем в 1,6 раза меньше  $ImD_{50}$  других испытуемых препаратов В-субъединицы ХТ (Вк и Ву), что свидетельствовало об их большей иммунологической эффективности. Оптимальная доза Вк, Ву, Впр, защищающая лабораторных животных от развития инфекционного процесса при заражении высоковирулентным штаммом *V. cholerae* Eltor Ogawa P-3122 в дозе  $3,3 \cdot 10^3$  м.к./0,5 мл, составила 10 мкг.

При патолого-анатомическом исследовании мышцей во всех случаях отмечали лишь умеренные гемодинамические нарушения в органах, в большей степени обусловленные способом выведения животных из эксперимента. В кишечнике мышцей наблюдали содержимое обычного характера и объема, незначительное полнокровие сосудов. При гистологическом исследовании регистрировали незначительные изменения со стороны внутренних органов в виде умеренного полнокровия и функционального напряжения паренхимных элементов в печени и почках, чаще характерных для введения препаратов Вк, Вх. Реакцию со стороны звездчатых ретикулоэндотелиоцитов печени (клеток Купфера) характеризовали умеренные процессы активации. Наиболее высокий показатель активности (увеличение количества клеток Купфера) встречался у животных, которым вводили 10 мкг препарата Впр. В то же время препарат Ву в дозе 50 мкг чаще вызывал даже некоторое уменьшение количества клеток Купфера. Со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) во всех случаях нарушений не выявлено. Отмечали некоторое усиление пролиферативных процессов в эпителии, при этом инфильтративный компонент был незначительным. Так, на введение 10 мкг препарата Вк повышалось количество эозинофилов (до  $3,1 \pm 0,98$ ) в тонком кишечнике подопытных животных. Препараты Ву, Вк, Вх вызывали относительную активацию МЭЛ – ( $4,9 \pm 0,92$ ), ( $3,8 \pm 0,92$ ), ( $6,5 \pm 1,17$ ) клеток соответственно – по сравнению с контрольной группой – ( $2,1 \pm 0,32$ ) кле-

ток. На введение препарата Вх незначительно снижалась митотическая активность клеток в кишечных криптах. В лимфоидных органах мышцей не регистрировали признаков достоверной активности отдельных структур (Т- и В-зон), но на ряд препаратов в дозе 50 мкг (Ву, Вк, Вх) в селезенке наблюдали реакцию со стороны мегакариоцитов, косвенно свидетельствующую о характерном для процессов иммуногенеза раздражении костного мозга.

Выявленные незначительные и умеренные изменения со стороны внутренних органов подопытных мышцей в ответ на введение всех исследуемых препаратов являются допустимыми с точки зрения их безопасности (безвредности) для макроорганизма, а имеющие место колебания выраженности или частоты этих изменений у отдельных животных не выходили за пределы допустимых.

Процессы индукции апоптоза клеток эффекторной системы врожденного иммунитета имеют ключевое значение в регуляции иммунного и воспалительного ответа на бактериальные антигены. В связи с этим с использованием метода проточной цитофлуориметрии проведено изучение *in vivo* влияния препаратов В-субъединицы ХТ на процессы апоптоза и пролиферации как двух альтернативных составляющих ответа иммунокомпетентных клеток на 1-е и 7-е сутки после иммунизации.

Клетки в апоптозе идентифицировали как клетки с пониженным содержанием ДНК (<2С), пролиферативные клетки с дифференцировкой по фазам митотического цикла характеризовались повышенным содержанием ДНК (>2С).

В таблице представлены результаты влияния антигенов холерного вибриона на баланс апоптоза и пролиферации иммунокомпетентных клеток белых мышцей. Установлен дозозависимый эффект Вк и Ву в отношении гибели иммунокомпетентных клеток биомоделей. При повышении дозы Вк до 50 мкг происходило статистически достоверное увеличение как апоптотических, так и пролиферирующих клеток костного мозга на раннем этапе иммуногенеза (1-е сутки), лейкоцитов крови и спленоцитов на 1-е и 7-е сутки иммунного ответа относительно контрольных значений. Иммунизация животных хроматографически очищенными препаратами В-субъединицы (Вх и Впр) в дозе 2 мкг вызывала повышение ( $p < 0,05$ ) относительного количества апоптотических и пролиферирующих клеток костного мозга на 1-е сутки иммуногенеза с восстановлением баланса апоптоза и пролиферации к 7-м суткам.

Следует отметить, что подавляющее большинство лейкоцитов крови, клеток костного мозга и селезенки находились в предмитотической и митотической фазах клеточного цикла ( $G_2+M$ ) и меньшее количество – в фазе синтеза (S).

Проведенный цитофлуориметрический мониторинг процесса иммуногенеза показал, что баланс апоптоза и пролиферации, дифференцировка и элиминация клеток костного мозга, лейкоцитов крови

Влияние антигенов холерного вибриона на баланс апоптоза и пролиферации иммунокомпетентных клеток

Иммунизирующий препарат	Доза, мкг	Штамм-продуцент	Лейкоциты		Спленоциты		Клетки костного мозга	
			1 сут	7 сут	1 сут	7 сут	1 сут	7 сут
Концентрат В-субъединицы (Вк)	2	<i>V. cholerae</i> поп О1 КМ93	0,17±0,006	0,22±0,015	0,45±0,02*	0,14±0,15	0,06±0,006	0,11±0,01
	50		0,39±0,01*	0,58±0,1*	0,52±0,02*	0,59±0,18*	0,18±0,03*	0,06±0,006
В-ультрафильтрат (Бу)	2		0,36±0,03*	0,19±0,01	0,56±0,06*	0,18±0,01	0,03±0,002	0,11±0,006
	50		0,48±0,03*	0,25±0,01	0,49±0,045	0,24±0,03*	0,025±0,003	0,08±0,006
Хроматографически очищенная В-субъединица (Вх)	2		0,17±0,01	0,28±0,02	0,11±0,006	0,15±0,015	0,08±0,003*	0,04±0,0002
	50		0,19±0,01	0,25±0,015	0,17±0,002	0,13±0,003	0,07±0,002*	0,05±0,002
Хроматографически очищенная В-субъединица (Впр)	2	<i>V. cholerae</i> 569В	0,32±0,03	0,17±0,01	0,14±0,01*	0,06±0,002	0,07±0,015*	0,095±0,01
	50		0,12±0,015	0,2±0,02	0,18±0,01	0,06±0,003	0,05±0,006	0,04±0,001
Контроль (физиологический раствор)			0,21±0,01	0,22±0,003	0,29±0,02	0,09±0,006	0,03±0,006	0,07±0,003

\* Достоверность различий по отношению к контролю (p<0,05).

и спленоцитов в ответ на исследуемые препараты В-субъединицы ХТ, независимо от способа получения и степени очистки, находились в пределах нормальных показателей, что свидетельствовало об отсутствии их повреждающего действия на организм биомоделей.

Данные экспериментальные серии В-субъединицы ХТ не вызывают значимых изменений в состоянии иммунокомпетентных клеток на различных стадиях клеточного цикла, что можно использовать как дополнительный критерий оценки качества препаратов – кандидатов в иммунобиологические.

Иммуноферментным анализом установлено, что введение препаратов В-субъединицы ХТ индуцировало синтез антител к В-субъединице ХТ в сыворотках крови мышей. Титры антител к В-субъединице ХТ при иммунизации всеми препаратами В-субъединицы значимо не различались. Использование в ИФА в качестве антигена Бу вызвало образование антител к В-субъединице ХТ в титрах, 640 (0÷2176), сравнимых с титрами, зарегистрированных в ответ на контрольную В-субъединицу – 1920 (64÷2048).

Таким образом, испытания иммунобиологических свойств препаратов В-субъединицы ХТ дают основание считать препараты В-субъединицы перспективными компонентами холерной вакцины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. 180 с.
2. Ворошилова М.К., Жевандрова В.И., Балаян М.С. Методы лабораторной диагностики энтеровирусных инфекций. М.: Медицина; 1964. 152 с.
3. Захарова Т.Л., Ливанова Л.Ф., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Получение очищенной В-субъединицы холерного токсина из рекомбинантного штамма *Vibrio cholerae*. Биотехнология. 2003; 5:53–6.
4. Ильина Т.С., Смирнов Г.Б., Смирнова Н.И., Ливанова Л.Ф. Рекомбинантная плазмидная ДНК рJEM<sub>3</sub>, кодирующая синтез В-субъединицы холерного токсина, способ ее конструирования и штамм бактерий *V. cholerae* – продуцент В-субъединицы холерного токсина. А.с. 1505022, опублик. 15.10.1991.
5. Кутырев В.В., Шуковская Т.Н. Холерные вакцины. В кн.: Вакцины и вакцинация: национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2011. С. 431–45.
6. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир; 1969. 645 с.
7. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям: Методические указания. М.; 1998. 128 с.
8. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Шуковская Т.Н., Смирнова

Н.И., Никифоров А.К. Специфическая профилактика холеры в современных условиях. Пробл. особо опасных инф. 2011; 1(107):5–12.

9. Саркисов Д.С., Перов Ю.Л. Микроскопическая техника: руководство. М.: Медицина; 1996. 542 с.

10. Шуковская Т.Н., Саяпина Л.В., Кутырев В.В. Вакцинопрофилактика холеры: современное состояние вопроса. Эпидемиол. и вакцинопрофилактик. 2009; 2(45):62–7.

11. Barlogie B., Spidzer G., Hart G.S. et al. DNA histogram analysis of human hemopoietic cells. Blood. 1976; 48(2):245–57.

12. Chang Y.S., Sack D.A. Development of a novel in vitro assay (ALS assay) for evaluation of vaccine-induced antibody secretion from circulating mucosal lymphocytes. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2001; 8(3):482–8.

13. Lotzmanova E.Yu., Kravtsov A.L., Livanova L.F. et al. Flow cytometric monitoring of leukocyte apoptosis in experimental cholera. Proc. SPIE. 2002; 5068:462–6.

14. Rhie G., Jung H., Park J. et al. Construction of cholera toxin B subunit-producing *Vibrio cholerae* strains using the Mariner-FRT transposon delivery system. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2008; 52:23–8.

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. Voroshilova M.K., Zhevandrova V.I., Balayan M.S. [Methods of Laboratory Diagnostics of Enteroviral Infections]. M.; 1964. 152 p.
3. Zakharova T.L., Livanova L.F., Zadnova S.P., Smirnova N.I. [Obtaining of purified cholera toxin B-subunit from the recombinant *Vibrio cholerae* strain]. Biotechnologiya. 2003; 5:53–6.
4. Il'ina T.S., Smirnov G.B., Smirnova N.I., Livanova L.F. [Recombinant plasmid pJEM<sub>3</sub>, DNA, encoding cholera toxin B-subunit, the method of its construction, and *V. cholerae* strain – producer of cholera toxin B-subunit]. AS 1505022.
5. Kutyrev V.V., Shchukovskaya T.N. [Cholera vaccines]. In: [Vaccines and Vaccination: National Manual]. M.; 2011. P. 431–45.
6. Lilly R. [Pathohistological Technique and Practical Histochemistry]. M.; 1969. 645 p.
7. [Methods of Control of Immunobiological Preparations Administered to Humans]. MR. M.; 1998. 128 p.
8. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., Shchukovskaya T.N., Smirnova N.I., Nikiforova A.K. [Cholera specific prophylaxis in modern conditions]. Probl. Osobo. Opasn. Infek. 2011; (107):5–12.
9. Sarkisov D.S., Perov Yu.L. [Microscopic Technique: Manual]. M.; 1996. 542 p.
10. Shchukovskaya T.N., Sayapina L.V., Kutyrev V.V. [Cholera vaccine prophylaxis: present day state]. Epidemiol. Vaktzynoprof. 2009; 2(45):62–7.

Authors:

Klyueva S.N., Shchukovskaya T.N., Shmel'kova T.P., Kravtsov A.L., Bugorkova S.A., Smirnova N.I., Volokh O.A., Zakharova T.L., Belyakova N.I., Eremin S.A., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rus-rapi@microbe.ru

Об авторах:

Клюева С.Н., Шуковская Т.Н., Шмелькова Т.П., Кравцов А.Л., Бугоркова С.А., Смирнова Н.И., Волох О.А., Захарова Т.Л., Белякова Н.И., Еремин С.А., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rus-rapi@microbe.ru

Получила 10.01.12.

А.А.Сергеев, О.В.Пьянков, О.К.Демина, А.Н.Шиков, Ал.А.Сергеев, Л.Н.Шишкина,  
А.С.Сафатов, А.П.Агафонов, А.Н.Сергеев

## ИЗУЧЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КУР К ВИРУСУ ГРИППА ПТИЦ А/Н5N1

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

Все изученные высокопатогенные (по IVIP) штаммы вирус гриппа птиц А/Н5N1 (ВГП), выделенные на территории России и стран СНГ, при аэрозольном заражении проявляют высокую достоверно не различающуюся вирулентность для кур (50 % аэрогенная летальная доза – от 2 до 15 50 % эмбриональных инфицирующих доз). Вероятность инфицирования этих животных ВГП при интраназальном способе заражения в 20 раз выше, чем при пероральном способе заражения, и в 300 раз выше, чем при интрагастральном, что свидетельствует о более высокой чувствительности к ВГП тканей респираторных органов кур по сравнению с тканями их желудочно-кишечного тракта. Первичным органом-мишенью для вируса у интраназально инфицированных кур является дыхательный тракт (слизистая носовой полости). Отмечено существование фекально-назального механизма передачи ВГП у кур.

*Ключевые слова:* вирус гриппа птиц А/Н5N1, курица, интраназальное заражение, аэрозольное инфицирование, оральное заражение, интрагастральное инфицирование, 50 % летальная доза, накопление вируса, органы и ткани курицы.

A.A.Sergeev, O.V.P'yankov, O.K.Demina, A.N.Shikov, Al.A.Sergeev, L.N.Shishkina, A.S.Safatov,  
A.P.Agafonov, A.N.Sergeev

## Studies of Sensitivity to Avian Flu Virus A/H5N1 in Chickens

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

All the studied highly pathogenic (according to the IVIP) strains of avian flu virus A/H5N1 (AFV), isolated in the territory of the Russian Federation and CIS countries, in case of aerosol challenge (aerogenic LD<sub>50</sub> – 2–15 embryonic ID<sub>50</sub>) appear to be highly virulent for chickens. The chance of AFV infection of chickens in case of intranasal challenge is 20 times as great as in the case of peroral one, and 300 times as great as in the case of intragastral one, which bears evidence to higher sensitivity to AFV of the tissues of avian respiratory organs, in comparison with the tissues of gastro-intestinal tract. Therewith, primary target organ for virus in intranasal infected birds is their respiratory channel (mucous membrane of the nasal cavity in particular). Registered is the possibility of existence of fecal-nasal AFV transfer mechanism in chickens.

*Key words:* Avian flu virus A/H5N1, chicken, intranasal challenge, aerosol challenge, oral challenge, intragastral challenge, LD<sub>50</sub>, virus accumulation, avian organs and tissues.

Вирус гриппа птиц (ВГП) является объектом исследований многих ученых в мире в связи с участвовавшими в последние годы случаями массовой гибели дикой и домашней птицы от гриппа. В связи с этим целью работы являлось изучение на курах инфекционных свойств различных штаммов вируса гриппа птиц А/Н5N1, выделенных от сельскохозяйственной птицы на территории России и стран СНГ, и механизма их заражения.

### Материалы и методы

В работе использовали восемь высокопатогенных штаммов ВГП субтипа Н5N1 (по IVIP), выделенных на территории России и стран СНГ: А/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005; А/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005; А/Chicken/Kurgan/05/2005; А/Duck/Kurgan/08/2005; А/Chicken/Crimea/04/2005; А/Chicken/Omsk/06; А/Chicken/Krasnodar/02/06; А/Chicken/Dagestan/06. Все штаммы на 2–3-м пассажах (от источника выделения) при культивировании на куриных эмбрионах (КЭ) были наработаны до концентрации 7,5–8,5 lg 50 % эмбриональных инфицирующих доз в 1 мл (ЭИД<sub>50</sub>/мл) и хранились до использования в экспериментах в низкотемпературной морозильной камере при –70°С.

В исследованиях использовали кур кросса

Хайсекс Браун генетической линии Род-айленд массой (300±20) г, полученных из Новосибирской птицефабрики. Птиц содержали на стандартном рационе с достаточным количеством воды согласно ветеринарному законодательству и в соответствии с требованиями по гуманному содержанию и использованию животных в экспериментальных исследованиях [4]. Наблюдение за инфицированной птицей осуществляли в течение 12 сут с момента заражения. Культивирование вируса, находящегося в биологических пробах, проводили на 9-суточных КЭ.

Интраназальное и оральное заражение кур проводили традиционными методами, вводя каждому животному по 0,02 и 0,1 мл вирусосодержащего материала соответственно, с применением в первом случае седативных средств. Интрагастральное инфицирование кур осуществляли следующим способом: на первом этапе в пищевод животных вводили металлическую трубку диаметром 0,7 мм с оливой на конце; затем сквозь нее в желудок пропускали пластиковый катетер (внутренний диаметр – 0,4 мм), через который и вводили шприцем вирусосодержащую суспензию в объеме 0,1 мл; после этого вынимали пластиковый катетер, а затем – и металлическую трубку. Это позволило практически исключить травматическое воздействие на верхние отделы пищеварительного тракта кур при интрагастральном заражении и минимизировать ве-

роятность попадания вирусосодержащего материала в ротовую полость и пищевод животных. Значения 50 % летальных доз ( $LD_{50}$ ) штаммов ВГП определяли при интраназальном, оральном и интрагастральном заражении кур согласно общепринятой методике [1].

Аэрозольное инфицирование кур осуществляли тем же способом и с использованием того же оборудования, как это было ранее описано [5], создавая вирусосодержащий полидисперсный аэрозоль с медианно-массовым аэродинамическим диаметром частиц – 1,1 мкм ( $\delta=1,2$ ). Результат заражения оценивали путем расчета 50 % аэрогенной летальной дозы ( $ALD_{50}$ ) штаммов ВГП [5], с учетом минутного объема дыхания используемых в экспериментах кур, который составлял 0,13 л/мин [6].

Специфичность гибели кур оценивали по наличию вируса гриппа в гомогенатах легких кур, павших в экспериментах. Определение концентрации и наличия жизнеспособного вируса в образцах тканей животных и аэрозольных пробах проводили традиционным методом путем титрования на КЭ с последующей регистрацией вируса в реакции гемагглютинации [2].

Образцы органов (стенки носовой полости, трахея, легкие, пищевод, желудок, толстый и тонкий кишечник) и сыворотки крови интраназально инфицированных кур отбирали каждые 12–24 ч в течение 2,5 сут после заражения (п.з.), умерщвляя по 3 животных на каждую временную точку методом цервикальной дислокации. С целью приготовления гомогенатов органы кур дезинтегрировали механическим способом с помощью речного песка в ступке. Титр вируса в гомогенатах органов и сыворотке крови инфицированной птицы определяли путем титрования на КЭ.

Статистическую обработку данных и сравнение результатов осуществляли стандартными методами [1].

## Результаты и обсуждение

На первом этапе проведены сравнительные исследования чувствительности кур к аэрозольному заражению различными штаммами ВГП. При этом отмечено, что через 3–5 сут п.з. у части животных регистрировали некоторые клинические признаки заболевания: сниженная двигательная активность, нарушение походки, уменьшение нормальной вокализации, цианоз и отек головы, отек ног, пятнистость и бледность голени и другие. Смерть наступала на 5–7-е сутки п.з. Показатели  $ALD_{50}$  для всех изучаемых штаммов ВГП достоверно не различались и находились в диапазоне от 0,3 до 1,2 lg ЭИД<sub>50</sub>.

На следующем этапе исследований были получены показатели вирулентности штамма A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 ВГП при инфицировании кур тремя различными способами (интраназальный, оральный и интрагастральный). Было отмечено, что вирус проявлял наибольшую вирулентность для кур при интраназальном способе его введения ( $LD_{50}$  – 2,7 lg ЭИД<sub>50</sub>) по сравнению с таковой с оральным и тем более интрагастральным способами введения

( $LD_{50}$  – 3,9 lg ЭИД<sub>50</sub> и 5,2 lg ЭИД<sub>50</sub> соответственно). Это обстоятельство свидетельствует о более высокой чувствительности к ВГП тканей респираторных органов кур по сравнению с тканями их желудочно-кишечного тракта. При этом более высокой эффективностью инфицирования птицы штаммом A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 ВГП обладал аэрозольный способ ( $ALD_{50}$  – 1,2 lg ЭИД<sub>50</sub>) по сравнению с интраназальным.

С целью выявления первичного органа-мишени у кур, в клетках которого происходит размножение ВГП при интраназальном способе заражения, было проведено изучение динамики накопления штамма A/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 в некоторых органах (респираторного и желудочно-кишечного тракта) и крови животных, интраназально инфицированных 3–5  $LD_{50}$  вируса для этих животных. Результаты исследований представлены в таблице. Показано, что первичным органом-мишенью для вируса является слизистая носовой полости кур, в которой его концентрация достигает максимальной величины к 36 ч п.з., и возбудитель заболевания практически исчезает к 60 ч п.з. Через 36 ч п.з. патоген обнаруживается во многих исследованных органах животных как респираторного, так и желудочно-кишечного тракта, достигая максимальных значений к 60 ч п.з. (максимальная временная точка изучения).

В научной литературе приводятся данные о интраназальном, внутривенном и оральном способах заражения птиц ВГП [8, 10]. Для выяснения механизма распространения вируса гриппа птиц среди кур мы дополнительно применили и другие способы их инфицирования: интрагастральный и аэрозольный. Все использованные в работе штаммы ВГП, относящиеся к высокопатогенным для кур (внутривенный индекс патогенности, IVIP – от 2,7 до 3,0), проявляли одинаково высокую вирулентность для кур при аэрозольном заражении ( $ALD_{50}$  – от 2 до 20 ЭИД<sub>50</sub>) несмотря на то, что источники их выделения различались по виду сельскохозяйственной птицы (курица, утка, индейка). А это означает то, что штаммы ВГП, выделенные от уток и индеек, могут потенциально вызывать серьезные эпизоотии и среди кур.

Сравнительные эксперименты на курах при их заражении разными способами показали более высокую чувствительность к ВГП тканей респираторного тракта этих животных по сравнению с таковой у тканей желудочно-кишечного тракта, что в определенном смысле противоречит общеизвестному представлению о фекально-оральном механизме передачи гриппа птиц среди кур [3, 7, 10]. Кроме того, с учетом данных оценки вирулентности вируса, введенного орально и интрагастрально, отмечена в 20 раз большая чувствительность к патогену верхнего отдела желудочно-кишечного тракта кур (слизистая ротовой полости), чем нижнего. Эти кажущиеся противоречия объясняются следующими двумя обстоятельствами. Во-первых, существующими в норме у кур анатомическими особенностями нёба, разделяющего ротовую полость от носовой, которое имеет

Динамика распространения вируса гриппа птиц А/Н5N1 (штамм А/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005) у кур при интраназальном заражении 3–5 ЛД<sub>50</sub>

Вид биопробы	Биокоцентрация вируса (M±Sm) [в lg ЭИД <sub>50</sub> /г (мл)] через разные промежутки времени после инфицирования:			
	12 ч	24 ч	36 ч	60 ч
Сыворотка крови	<0,2	<0,2	2,5±0,3	<0,2
Стенки носовой полости	<0,2	4,5±0,3	5,0±0,4	<0,2
Трахея	<0,2	<0,2	3,0±0,3	<0,2
Легкие	<0,2	<0,2	1,8±0,2	5,8±0,3
Пищевод	<0,2	<0,2	<0,2	3,5±0,3
Желудок	<0,2	<0,2	3,5±0,3	4,5±0,4
Кишечник	<0,2	<0,2	1,8±0,2	3,5±0,3

Примечание. «M» – 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 ЭИД<sub>50</sub>/г (мл) чувствительности использованного метода титрования вируса.

щель практически от ноздрей до глотки. Благодаря данной щели в нёбе продукты питания, контаминированные вирусом, поступившие в ротовую полость этих животных, имеют тесный контакт и со слизистой оболочкой носа. Во-вторых, в экспериментах по интраназальному заражению кур нами было показано более раннее размножение ВГП в респираторном тракте этих животных (слизистая носовой полости) по сравнению с органами желудочно-кишечного тракта, несмотря на то, что вирусодержащая суспензия, вводимая интраназально, несомненно, попадала и в пищеварительный тракт.

Совокупность вышеперечисленных обстоятельств свидетельствует о том, что ВГП, попавший с продуктами питания в ротовую полость кур, с высокой вероятностью первично инфицирует птицу через слизистую носовой полости. А это, в свою очередь, дает основание утверждать о существовании фекально-назального механизма передачи инфекции среди кур. Сравнивая два способа респираторного инфицирования животных, обращает на себя внимание более высокая эффективность заражения птицы аэрозольным способом (в 30 раз) по сравнению с интраназальным. Это, скорее всего, объясняется большей эффективностью распределения (осаждения) вводимого с аэрозолем вирусодержащего материала по респираторному тракту кур, чем таковая при интраназальном заражении, при котором основная часть вируса через щель в нёбе попадает на слизистую ротовой полости (пищеварительный тракт), обладающей существенно меньшей чувствительностью к ВГП.

Таким образом, все изученные высокопатогенные штаммы ВГП А/Н5N1 при аэрозольном заражении проявляют высокую достоверно не различающуюся вирулентность для кур (АЛД<sub>50</sub> – 2–15 ЭИД<sub>50</sub>). Вероятность инфицирования этих животных ВГП при интраназальном способе заражения в 20 раз выше, чем при пероральном способе заражения и в 300 раз выше, чем при интрагастральном, что свидетельствует о более высокой чувствительности к ВГП тканей респираторных органов кур по сравнению с тканями их желудочно-кишечного тракта. Первичным органом-мишенью у кур интраназально инфицированных штаммом А/Chicken/Suzdalka/Nov-11/2005 ВГП является дыхательный тракт (слизистая

носовой полости). Результаты изучения инфекционных свойств различных штаммов вируса гриппа птиц на курах и механизма их заражения свидетельствуют о существовании фекально-назального механизма передачи ВГП у кур.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962.
2. Мейхи Б., редактор. Вирусология. Методы. М.: Мир; 1988.
3. Онищенко Г.Г., редактор. Грипп птиц в Сибири – 2005. Новосибирск: Изд-во «Церис»; 2006. 192 с.
4. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. Вашингтон: Национальная Академия; 1996.
5. Сергеев А.Н., Жуков В.А., Порываев В.Д., Пьянков О.В., Шишкина Л.Н., Петрищенко В.А. и др. Разработка простого метода прямой оценки наличия инфекционного процесса у мышей и крыс, аэрогенно инфицированных вирусом гриппа. Вopr. вирусол. 2002; (4):44–4.
6. Lasiewski R.C., Calder W.A. A preliminary allometric analysis of respiratory variables in resting birds. Respir. Physiol. 1971; 11(2):152–66.
7. Shortridge K.F., Zhou N.N., Guan Y. et al. Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. Virology. 1998; 252(2):331–42.
8. Swayne D.E. Pathobiology of H5N2 Mexican Avian Influenza Virus Infections of Chickens. Vet. Pathol. 1997; 34:557–67.
9. Swayne, D.E., Halvorson, D.A. Influenza. In: Diseases of Poultry, Y.M.Saif, ed. (Ames, IA, Iowa State Press. Blackwell Publishing Co); 2003. P. 135–60.
10. Yamamoto Y., Nakamura K., Okamoto M., Yamada M., Mase M. Avian Influenza Virus (H5N1) Replication in Feathers of Domestic Waterfowl. Emerg. Infect. Dis. 2008; 14(1):149–51.

## 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.
  2. Meykhi B., editor. [Virology. Methods]. M.; 1988.
  3. Onishchenko G.G., editor. [Avian Flu in Siberia – 2005]. Novosibirsk; 2006. 192 p.
  4. [National Research Council. Guidelines on Care and Use of Laboratory Animals]. Washington: National Academy; 1996.
  5. Sergeev A.N., Zhukov V.A., Poryvaev V.D., P'yankov O.V., Shishkina L.N., Petrishchenko V.A. et al. [Development of a simple method for direct evaluation of disease progression in mice and rats in case of aerogenic infestation with influenza virus]. Vopr. Virusol. 2002; (4):44–4.
- Authors:**  
Sergeev A.A., P'yankov O.V., Demina O.K., Shikov A.N., Sergeev A.A., Shishkina L.N., Safatov A.S., Agafonov A.P., Sergeev A.N. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia. E-mail: vector@vector.nsc.ru

## Об авторах:

Сергеев А.А., Пьянков О.В., Демина О.К., Шиков А.Н., Сергеев А.А., Шишкина Л.Н., Сафатов А.С., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл, п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Поступила 26.06.11.

УДК 616.932:616-07

Т.В.Аленкина<sup>1</sup>, Г.В.Бочкарева<sup>1</sup>, Л.В.Саяпина<sup>2</sup>, И.В.Касина<sup>2</sup>, И.В.Шульгина<sup>1</sup>, О.А.Лобовикова<sup>1</sup>,  
Е.Г.Абрамова<sup>1</sup>, О.В.Громова<sup>1</sup>, А.К.Никифоров<sup>1</sup>

**РАЗРАБОТКА И ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ВНЕДРЕНИЯ ПРЕПАРАТА  
«ИММУНОГЛОБУЛИНЫ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИЕ ХОЛЕРНЫЕ O139»**

<sup>1</sup> ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов;

<sup>2</sup> ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», Москва

Разработан новый препарат, предназначенный для индикации и идентификации возбудителя холеры O139 серогруппы в мазках из различных материалов и чистых культур методом флуоресцирующих антител. Диагностикум прошел все этапы Государственных приемочных испытаний, в результате которых был оценен как высокоспецифичный, так как не выявлял штаммы, не относящиеся к *Vibrio cholerae* O139 серогруппы в концентрации бактерий  $10^8$  в 1 мл. Чувствительность с чистыми культурами холерных вибрионов O139 серогруппы составляла  $5 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^6$  м.к./мл, при исследовании биологических объектов –  $10^6$ – $10^7$  м.к./мл, объектов внешней среды –  $5 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^6$  м.к./мл. Была определена перспективность применения иммуноглобулинов в практике здравоохранения и даны рекомендации к регистрации в Российской Федерации в качестве изделия медицинского назначения.

*Ключевые слова:* иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие холерные O139, *V. cholerae* O139, метод флуоресцирующих антител, государственные испытания

T.V.Alenkina<sup>1</sup>, G.V.Bochkareva<sup>1</sup>, L.V.Sayapina<sup>2</sup>, I.V.Kasina<sup>2</sup>, I.V.Shul'gina<sup>1</sup>, O.A.Lobovikova<sup>1</sup>, E.G.Abramova<sup>1</sup>,  
O.V.Gromova<sup>1</sup>, A.K.Nikiforov<sup>1</sup>

**Development and Main Stages of Introduction of the Preparation “Cholera O139 Diagnostic  
Fluorescent Immunoglobulins”**

<sup>1</sup>Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov; <sup>2</sup>Research Center for Evaluation of Products for Medical Application, Moscow

Developed was a new preparation intended for cholera O139 agent indication and identification in the smears and pure cultures, using fluorescent antibodies method. The diagnosticum underwent State validation procedure, and was evaluated as a highly specific preparation. Its sensitivity was shown to be equal to  $5 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^6$  m.c./ml for pure cultures of *V. cholerae* O139,  $10^6$ – $10^7$  – for biological objects and  $5 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^6$  – for environmental objects. Application of the preparation for practical purposes was considered to be promising, and it was recommended for State registration as a product of medical application.

*Key words:* cholera O139 diagnostic fluorescent immunoglobulins, *V. cholerae* O139, fluorescent antibodies method, State validation procedure.

Появление в 1992 г. холерного вибриона O139 серогруппы, который явился причиной вспышки диарейных заболеваний, принявших в дальнейшем характер крупных эпидемий, опровергло долго существовавшее представление о том, что только холерные вибрионы O1 группы способны вызывать эпидемии и пандемии [5, 6], и вызвало необходимость создания препаратов для обнаружения данного патогена.

Первым препаратом для детекции *Vibrio cholerae* O139, зарегистрированным в Российской Федерации (РУ ФСР № 2008/03209) и внесенным в перечень препаратов для диагностики холеры, стала разработанная в ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» сыворотка диагностическая холерная не O1 группы O139 адсорбированная кроличья для реакции агглютинации (РА) на стекле [4].

Однако достоверность лабораторной диагностики холеры «Бенгал» может быть достигнута при комплексном применении различных методов – от классической реакции агглютинации до тест-систем,

разработанных на основе таких современных технологий, как гибридная биотехнология, или с помощью генодиагностических методов [1, 2, 10]. В то же время при конструировании диагностических препаратов немаловажным фактором является их доступность для практического здравоохранения.

Метод флуоресцирующих антител (МФА) занимает ведущее место в индикации возбудителей особо опасных инфекционных заболеваний благодаря высокой иммунологической чувствительности в сочетании с точностью микроскопического анализа. Чувствительность МФА при приготовлении мазков из взвеси бактерий составляет  $1 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^5$  м.к./мл. Метод надежно зарекомендовал себя при обнаружении возбудителя холеры O1 серогруппы. Отсутствие подобного диагностикума для индикации *V. cholerae* O139 обусловило актуальность работ в этом направлении.

Целью исследований была разработка препарата для индикации и идентификации *V. cholerae* O139 в

прямом МФА и внедрение его в практику здравоохранения.

Основные этапы работы заключались в разработке биотехнологической схемы получения диагностикума, проведении всех этапов Государственных испытаний и регистрации препарата в качестве изделия медицинского назначения (ИМН).

### Материалы и методы

В качестве животных-продуцентов гипериммунных холерных O139 сывороток были использованы кролики породы шиншилла массой (2,5±0,5) кг. Иммунизацию проводили препаратом О-антигена, выделенного ультрафильтрацией из формализованного безмикробного супернатанта штамма *V. cholerae* O139 MO-45. Данный антиген характеризуется тем, что на всех стадиях очистки сохраняет однофазное растворенное состояние. Однородность фазового состояния при выделении О-антигена позволяет сохранять неизменной нативную конформацию его специфических эпитопов, определяющих серологическую активность липополисахаридного комплекса [7].

Активность и специфичность полученных сывороток определяли в объемной РА и оценивали в соответствии с нормативной документацией (НД) на аналогичные препараты.

Адсорбентами являлись формализованные клетки штаммов *V. cholerae* не O1 169-68 O22 серогруппы, *V. cholerae* O1 M-41 (Огава) и 569В (Инаба), выращенные методом глубинного культивирования. Свойства адсорбентов стабилизировали лиофилизацией.

Контроль специфической активности гипериммунных сывороток и экспериментальных серий препарата иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих холерных O139 кроличьих адсорбированных проводили на штаммах *V. cholerae* O139 серогруппы: P-16064, P-16131, 1306, 1311, AP-1. Специфичность препарата изучали на штаммах *V. cholerae cholerae* 1488a (Инаба), M-47 (Огава); *V. cholerae eltor* 118 (Инаба), 7/96 (Огава), а также *V. cholerae* не O1 N СТС 4716 (O4), B-4202-64 (O5), 7007-62 (O6), 11416-62 (O13), B 5267-64 (O18), KM-24 (O22), 14438-62 (O24), 12630-62 (O28), 161-68 (O29), 152-68 (O34), 14520 (O41). Все штаммы были получены из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Культуры холерных вибрионов выращивали при температуре (37±1) °С в течение 18–20 ч на жидких и плотных питательных средах – мясопептонном бульоне Мартена, бульоне Хоттингера, агаре Мартена и Хоттингера, pH всех сред – 7,7±0,1.

Бактериальные суспензии с концентрацией 10<sup>9</sup> м.к./мл готовили на 0,9 % растворе натрия хлорида по оптическому стандарту мутности бактериальных взвесей 5 единиц.

Иммуноглобулиновую фракцию из сыворотки животных выделяли однократным осаждением 3М

раствором (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> при 45 % насыщении.

Конъюгирование иммуноглобулинов с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ) («Sigma», США) проводили по методу J.D.Marshall *et al.* (1958).

Освобождение иммуноглобулиновой фракции от (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, а также удаление ФИТЦ, химически не связанного с белком, осуществляли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-50 в 0,5 М натрий карбонат-бикарбонатном буфере при pH 9,2±0,1.

Уровень специфической активности и специфичности изготовленных серий иммуноглобулинов определяли в прямом МФА. Степень яркости свечения бактерий оценивали по общепринятой 4-крестовой системе: 4 креста – сверкающая флуоресценция оболочки микробной клетки, четко контрастирующая с темным телом клетки; 3 креста – яркая флуоресценция оболочки микробной клетки; 2 или 1 крест – слабое свечение всей клетки или едва заметные контуры. Препарат в рабочем разведении должен обеспечивать специфическое свечение *V. cholerae* O139 интенсивностью 3–4 креста. Свечение на 1–2 креста является неспецифическим и не учитывается.

### Результаты и обсуждение

Для выполнения поставленной цели необходимым условием являлось получение качественного сырья – гипериммунной кроличьей сыворотки с минимальным содержанием гетерологичных антител. Первоначальные опыты по созданию флуоресцирующих иммуноглобулинов к *V. cholerae* O139 на основе кроличьей сыворотки O139, полученной с использованием корпускулярного О-антигена бескапсульного варианта штамма *V. cholerae* O139 P-16064, показали, что основной недостаток выделенных иммуноглобулинов заключался в необходимости проведения неоднократных адсорбций препарата с целью удаления гетерологичных антител. Присутствие большого количества перекрестно реагирующих антител в сыворотке-полуфабрикате было обусловлено не только высоким генетическим сродством холерных вибрионов O139 и O22 серогрупп (более 90 %), но и структурными изменениями в составе О-антигена под воздействием высокой температуры, поскольку при изготовлении корпускулярного О-антигена способом инактивации микробной клетки является кипячение в течение 2 ч. При такой обработке неизбежна частичная деградация терминальных строгоспецифичных полисахаридных боковых цепей, в результате чего обнажаются участки липополисахарида (коровая часть), являющиеся группоспецифическими антигенными детерминантами [11].

Немаловажным фактором, предопределяющим интенсивность антителообразования, является физическое состояние антигена, а также степень его очистки. На основании этого в качестве альтернативы был выбран растворимый О-антиген, полученный способом [7].

Подбор способов аппликации О-антигена, доз и

кратности введения определил наиболее оптимальную схему иммунизации – 2-цикловая схема иммунизации большими дозами О-антигена (до 8 мг) при внутривенном способе введения. Активность холерных О139 сывороток, полученных по такой схеме, составляла в объемной РА 1:1600–1:2000. Неспецифические реакции со штаммами холерных вибрионов О1 и О22 серогрупп у 59,22 % продуцентов отсутствовали, у 40,78 % находились на уровне 1:200. Таким образом, сыворотки-полуфабрикаты от кроликов, иммунизированных О-антигеном, полученным способом [7], по активности и специфичности соответствовали требованиям, предъявляемым к качеству полуфабриката для изготовления флуоресцирующих иммуноглобулинов. Минимальная активность сывороток-полуфабрикатов, пригодных для последующего изготовления иммуноглобулинов флуоресцирующих холерных О139, была установлена в пределах 1:400.

Изучение сывороток, полученных от 87 кроликов-продуцентов в непрямом МФА с холерными вибрионами О2–О82 серогрупп, показало отсутствие перекрестных реакций с указанными штаммами, за исключением *V. cholerae* не О1 169-68, относящегося к О22 серогруппе, и подтвердило высокую специфичность полуфабрикатов, применяемых для изготовления препарата. Штамм *V. cholerae* не О1 169-68 был внесен в технологическую схему в качестве адсорбента. Кроме того, результаты тестирования сывороток послужили основанием для внесения в НД в качестве контрольных культур, помимо холерных вибрионов классического и эльтор биоваров сероваров Инаба и Огава, только 11 штаммов *V. cholerae* не О1 серогруппы – О4, О5, О6, О13, О18, О22, О24, О28, О29, О34, О41, наиболее часто встречающиеся на территории Российской Федерации, а также штамм *V. cholerae* не О1 КМ-24 (357) О22 серогруппы.

Диагностические препараты, как правило, изготавливают из полуфабрикатов, подвергшихся хранению при температуре 2–8 °С не менее 6 мес. [8]. Целью такого выдерживания является, во-первых, физическое просветление сывороток благодаря оседанию на дно бутылки белков макроглобулиновой природы. Во-вторых, стабилизация активности полуфабриката. Титр сыворотки, первое время падающий иногда весьма резко, к концу 3–6-го месяца становится относительно устойчивым. В дальнейшем возможно снижение активности лишь в небольших пределах (до 10 % за год).

Изучение стабильности свойств гипериммунных холерных О139 кроличьих сывороток в процессе хранения показало, что 100 % исследованных полуфабрикатов сохраняли первоначальную активность в течение 5 лет (срок наблюдения). У 92 % сывороток наблюдалось снижение уровня гетерологичных антител на 1–2 порядка в течение 3 и более месяцев. Это объясняется тем, что в условиях гипериммунизации в организме продуцента вырабатываются специфические антитела, относящиеся к классу G. IgG являют-

ся пространственно стабильными молекулами и характеризуются устойчивостью к физико-химическим воздействиям. Неспецифические антитела, идентифицированные как IgM [8], быстрее разрушаются в процессе хранения вследствие своей лабильности, а также образуют конгломераты и выпадают в осадок. На основании полученных данных был установлен срок, необходимый для стабилизации сывороток-полуфабрикатов, – не менее 3 мес.

Как правило, для изготовления флуоресцирующих диагностических препаратов используют не цельную иммунную сыворотку, а выделяют ее глобулиновую фракцию для последующего присоединения флуорохрома [3]. Этим достигается концентрирование активных иммунных белков для конъюгации, а удаление балластных белков альбуминовой фракции, во-первых, позволяет снизить неспецифические реакции, обусловленные высокой реакционной способностью альбумина, во-вторых, уменьшает расход флуорохрома.

Для выделения иммуноглобулиновой фракции оптимальным оказался метод осаждения сульфатом аммония, который обеспечивал хорошую степень очистки, высокий выход и сохранение иммунологической активности антител.

После конъюгирования холерных О139 иммуноглобулинов с ФИТЦ следовал этап адсорбции формализированными клетками гетерологичных штаммов. Перекрестно реагирующие антитела полностью удалялись в результате одной адсорбции. В 96,4 % случаев это не влияло на специфическую активность иммуноглобулинов. В 3,6 % случаев отмечалось снижение специфической активности иммуноглобулинов в 2 раза.

Лиофилизацию препарата осуществляли в течение (34±2) ч. В качестве стабилизатора использовали 0,9 % сахарозы и 0,1 % натрия тиосульфата. Герметизацию ампул с сухим препаратом проводили под вакуумом.

Изготовленный по данной технологии препарат представлял собой аморфную массу оранжевого цвета, характеризовался хорошей растворимостью – в течение 1 мин. После растворения – опалесцирующая жидкость желто-зеленого цвета. Потеря в массе при высушивании не превышала 2,5 %, pH 8,0–9,5, содержание белка от 0,7 до 1,5 %, молярное соотношение ФИТЦ/белок от 5,0 до 14,0. Специфическая активность лиофилизированных иммуноглобулинов составляла 1:64–1:128.

Экспериментальные серии иммуноглобулинов изучали в лабораторных испытаниях с 22 штаммами *V. cholerae* О139, выделенными от больных и вибрионосителей и 20 авирулентными штаммами *V. cholerae* О139, выделенными из объектов внешней среды (вода), специфичность – с холерными вибрионами серогрупп: О2-О83, О1 классического и эльтор биоваров сероваров Инаба и Огава, холерными вибрионами в R-форме, а также с микроорганизмами семейств *Vibrionaceae*, *Pseudomonaceae* и *Enterobacteriaceae*.

Показатели стабильности иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих холерных O139

№ серии	Контроль при выпуске, через	Растворимость, с (норма* – в течение 3 мин)	pH (норма – от 8,0 до 9,5)	Белок, % (норма – от 0,7 до 1,5 %)	Молярное соотношение ФИТЦ/белок (норма – от 5,0 до 14,0)	Специфическая активность препарата в рабочем разведении (норма – не менее 3+)	Потеря в массе при высушивании (норма – не более 2,5 %)
01	При выпуске	30	8,0	1,3	7,5	4+	0,25
	2 года	30	8,1	1,3	7,5	4+	0,25
	2 года 6 мес.	30	8,0	1,3	7,5	4+	0,25
02	При выпуске	30	8,0	1,3	6,96	4+	0,85
	2 года	30	8,0	1,3	7,0	4+	0,85
	2 года 6 мес.	30	8,1	1,3	7,0	4+	0,85
03	При выпуске	10	9,1	0,7	8,0	4+	1,26
	2 года	10	9,1	0,7	8,0	4+	1,26
	2 года 6 мес.	10	9,1	0,7	8,0	4+	1,26
04	При выпуске	20	9,1	0,7	8,0	4+	2,13
	2 года	20	9,1	0,7	8,0	4+	2,13
	2 года 3 мес.	20	9,1	0,7	8,0	4+	2,13
05	При выпуске	20	9,1	1,1	11,8	4+	1,4
	2 года	20	9,1	1,1	11,8	4+	1,4

\*Норма указана в соответствии с требованиями технических условий.

Результаты испытаний показали, что эффективность выявления холерных вибрионов O139 серогруппы составила 100 % независимо от источника выделения штаммов, а также подтвердили высокую специфичность нового препарата, поскольку отсутствовали перекрестные реакции с другими микроорганизмами.

Для установления срока годности изучали стабильность физико-химических (растворимость, pH, содержание белка, молярное соотношение ФИТЦ/белок, потеря в массе при высушивании) и биологических свойств (специфическая активность и специфичность) экспериментальных серий препарата, хранившихся при температуре от 0 до 8 °С. Иммуноглобулины сохраняли все физико-химические и биологические характеристики в течение 2,5 лет (таблица). На основании этого был установлен срок годности – 2 года.

Три экспериментальные серии иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих холерных O139 были представлены на Государственные испытания. Первый этап (приемочные испытания) включал экспертизу проектов НД и лабораторную оценку качества экспериментальных серий препарата с использованием коллекционных штаммов. В ходе испытаний препарат показал высокую специфичность, так как не выявлял штаммы, не относящиеся к *V. cholerae* O139 серогруппы, в концентрации бактерий 10<sup>8</sup> м.к./мл. Чувствительность с чистыми культурами холерных вибрионов O139 серогруппы составила 5·10<sup>5</sup>–5·10<sup>6</sup> м.к./мл. В рабочем разведении препарат давал свечение на 4–3 креста.

Второй этап (испытания по медицинскому применению – полевые испытания) проходил на двух клинических базах и заключался в исследовании клинического материала от людей (испражнения, рвотные массы) и проб из объектов окружающей среды (вода и смывы). По результатам полевых ис-

пытаний препарат признан высокоспецифичным, так как не выявлял в клиническом материале и пробах из объектов окружающей среды холерные вибрионы O1 и не O1/O139 серогрупп в концентрации 10<sup>8</sup> м.к./мл. Чувствительность составляла 10<sup>6</sup>–10<sup>7</sup> м.к./мл при исследовании испражнений и рвотных масс, 5·10<sup>5</sup>–5·10<sup>6</sup> м.к./мл – в пробах воды и смывах.

Заключительным этапом испытаний была экспертиза качества, эффективности и безопасности. По результатам Государственных испытаний препарат «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие холерные O139 адсорбированные кроличьи, лиофилизат для диагностических целей» был признан перспективным и зарегистрирован в качестве изделия медицинского назначения в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения и социального развития (РУ № ФСР 2010/09364).

Таким образом, в результате проведенных исследований разработан новый препарат, предназначенный для выявления и идентификации возбудителя холеры O139 серогруппы в мазках из различных материалов и чистых культур прямым МФА. Внедрение в практику иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих холерных O139 позволит повысить эффективность лабораторной диагностики холеры.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева Л.П., Мазрухо Б.Л., Маркина О.В. и др. Получение диагностических флуоресцирующих моноклональных иммуноглобулинов к *Vibrio cholerae* O139 серовара. Клиническая диагностика. 2002; 12:50–1.
2. Алексеева Л.П., Сальникова О.И., Мазрухо Б.Л., Маркина О.В., Чемисова О.С., Лобанов В.В. Моноклональные антитела к липополисахариду *Vibrio cholerae* O139. Биотехнология. 2002; 2:79–84.
3. Гольдин Р.Б., Белецкая Л.В., Крюкова И.Н. и др. Иммунолюминесценция в медицине. М., 1977. 240 с.
4. Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Дятлов И.А., Елисеев Ю.Ю., Киреев М.Н., Космоенко О.Л. Способ получения O-антигена холерного очищенного. Патент РФ 2143280, опубл. 27.12.1999. Бюл. № 56.
5. Ломов Ю.М. Эволюция возбудителя холеры и прогноз по этой инфекции на ближайшее будущее. Эпидемиол. и инф. бол.

2004; 1:7–12.

6. *Онищенко Г.Г., Ганин В. С., Голубинский Е.П.* Вибрионы не O1 серологической группы и их значение в патологии человека. М.; 2001. 384 с.

7. *Онищенко Г.Г., Кутырев В.В.*, редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. М.: Медицина; 2009. 472 с.

8. *Смирнов В.В., Чаплинский В.Я., Андреева З.М.* и др. Научные основы производства диагностических препаратов. Киев, 1980. 195 с.

9. *Смирнова Н.И.* Возбудитель холеры новой O139-серогруппы: молекулярно-генетические особенности и происхождение. Мол. генет. микробиол. и вирусол. 2002; 3:23–33.

10. *Федорова В.А., Громова О.В., Девдариани З.Л.* Иммуноферментная тест-система для детекции *Vibrio cholerae* O139. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобил. 1998; 5:77–80.

11. *Яровая Л.М., Аleshkin В.А.* Новые данные о химической структуре липополисахаридов и практические перспективы. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобил. 1991; 3:73–8.

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

1. *Alekseeva L.P., Mazrukho B.L., Markina O.V. et al.* [Obtaining of monoclonal fluorescent diagnostic immunoglobulins for *Vibrio cholerae* O139]. Clin. Lab. Diagn. 2002; 12:50–1.

2. *Alekseeva L.P., Sal'nikova O.I., Mazrukho B.L., Markina O.V., Chemisova O.S., Lobanov V.V.* [Monoclonal antibodies for *Vibrio cholerae* O139 lipopolysaccharide]. Biotekhnologiya. 2002; 2:79–84.

3. *Goldin R.B., Beletskaya L.V., Kryukova I.N. et al.* [Immunoluminescence in Medicine]. М.: 1977. 240 p.

4. *Gromova O.V., Dzhaparidze M.N., Dyallov I.A., Eliseev Yu.Yu., Kireev M.N., Kosmoenko O.L.* [Method of obtaining of cholera purified O-antigen]. RF Patent 2143280.

5. *Lomov Yu.M.* [Cholera agent evolution and prognosis on this infection for the nearest future]. Epidemiol. Infek. Bol. 2004; 1:7–12.

6. *Onishchenko G.G., Ganin V.S., Golubinsky E.P.* [Non-O1 Vibrios and Their Impact in Human Pathology]. М.; 2001. 384 p.

7. *Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V.*, editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases]. М.; 2009. 472 p.

8. *Smirnov V.V., Chaplinsky V.Ya., Andreeva Z.M. et al.* [Scientific Bases of Diagnostic Preparations Production]. Kiev; 1980. 195 p.

9. *Smirnova N.I.* [Cholera agent of the new O139 serogroup: molecular genetic peculiarities and origin]. Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. 2002; 3:23–33.

10. *Fedorova V.A., Gromova O.V., Devdariani Z.L.* [Immuno-enzyme test-system for *Vibrio cholerae* O139 detection]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1998; 5:77–80.

11. *Yarovaya L.M., Aleshkin V.A.* [New data on chemical structure of lipopolysaccharides and practical prospects]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1991; 3:73–8.

**Authors:**

*Alenkina T.V., Bochkareva G.V., Shul'gina I.V., Lobovikova O.A., Abramova E.G., Gromova O.V., Nikiforov A.K.* Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrap@microbe.ru

*Sayapina L.V., Kasina I.V.* Research Center for Evaluation of Products for Medical Application. Moscow.

**Об авторах:**

*Аленкина Т.В., Бочкарева Г.В., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Абрамова Е.Г., Громова О.В., Никифоров А.К.* Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

*Саяпина Л.В., Касина И.В.* Научный центр экспертизы средств медицинского применения. Москва.

Поступила 15.12.11.

А.А.Зайцев, О.А.Гнусарева, Б.В.Солодовников, Н.С.Царева, В.В.Остапович, А.Н.Куличенко

## АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ НА ТУЛЯРЕМИЮ

*ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь*

Предложен алгоритм лабораторной диагностики при исследовании иксодовых клещей (ИК) на туляремию, включающий проведение первичного скрининга суспензий клещей на наличие видоспецифических фрагментов ДНК и антигена. Лабораторный анализ следует начинать с постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР), учитывая ее высокую чувствительность и диагностическую значимость. Пулы с положительными результатами в ПЦР подлежат исследованию в твердофазном иммуноферментном методе и иммунохроматографических тестах. В случае обнаружения туляремийного антигена такие пулы ИК обязательно исследуют биологическим или бактериологическим методами для выделения возбудителя.

*Ключевые слова:* возбудитель туляремии, лабораторная диагностика, иксодовые клещи, природные очаги туляремии.

A.A.Zaitsev, O.A.Gnusareva, B.V.Solodovnikov, N.S.Tsareva, V.V.Ostapovich, A.N.Kulichenko

## Algorithm of Laboratory Diagnostics Applied for Examination of Ixodic Ticks for Tularemia

*Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol*

Put forward is the algorithm of laboratory diagnostics applied for examination of Ixodic ticks (IT) for tularemia. It involves carrying out primary screening of tick suspensions for the presence of species-specific fragments of DNA and antigen. It is recommended that laboratory analysis starts with PCR, taking into account its high sensitivity and diagnostic value. Pools with positive PCR tests are subjected to verification by means of enzyme-linked immunosorbent assay and immune-chromatographic tests. In case of tularemia antigen detection, these pools of IT are examined with the help of biological or bacteriological techniques to isolate the agent.

*Key words:* tularemia agent, laboratory diagnostics, Ixodic ticks, natural tularemia foci.

При проведении градации территорий природных очагов туляремии по степени активности обязательно учитывают случаи выделения возбудителя и детекции его антигена [5].

Иксодовые клещи (ИК) подлежат исследованию на наличие возбудителя туляремии и его антигена [1, 4, 5]. В действующих инструктивно-методических документах для обнаружения туляремийного микроба в организме беспозвоночных животных рекомендовано применение биологического метода [5]. Не менее эффективен прямой посев содержимого тела ИК на питательную среду [2]. Возможно обнаружение в ИК туляремийных бактерий с помощью метода флуоресцирующих антител (МФА) и его антигена в серологических реакциях [1, 4, 5].

ИК инфицируются, кормясь на больных туляремией животных. От личинки до имаго количество туляремийных бактерий может увеличиться в клеще в 1000–10000 раз и достигнуть  $10^9$  м.к. Но если при исходном инфицирующем кормлении на больном туляремией теплокровном животном в клеща поступило недостаточное количество бактерий (менее 10000), то при переходе из одной фазы развития в другую возможно полное освобождение ИК от инфекции [3].

Очевидно, возбудитель туляремии в ИК может находиться в живом или деструктивном состояниях, в концентрациях от единичных микробных клеток до  $n \cdot 10^9$  м.к. и более. Это делает целесообразным проведение первичного скрининга с целью отбора проб,

перспективных для выделения культуры и изучения методами, выявляющими нежизнеспособные клетки туляремийного микроба.

### Материалы и методы

Исследовано 5855 иксодовых клещей, в том числе 2482 *Dermacentor marginatus* и 2598 *D. reticulatus*. Клещи были сгруппированы в 526 пулов, из которых приготовлены суспензии в 1,2–1,5 мл 0,01 М натрий-фосфатного буфера (рН 7,2–7,4). Пробы, отобранные для постановки серологических реакций, инактивировали при 56 °С в течение 30 мин в присутствии 2 % формалина.

Для проведения первичного скрининга суспензий ИК использовали диагностикум эритроцитарный туляремийный иммуноглобулиновый с чувствительностью  $6,25 \cdot 10^5$  м.к./мл в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) и тест-систему для твердофазного иммуноферментного метода (ТИФМ) чувствительностью  $1,0 \cdot 10^6$  м.к./мл, производства ФКУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора. Постановку РНГА осуществляли макрометодом в объеме 0,4 мл, а ТИФА – 0,1 мл. Суспензии ИК титровали в 4 лунках с шагом  $\frac{1}{2}$ .

Суспензии ИК с положительными результатами в РНГА и ТИФМ изучали с использованием набора реагентов для иммунохроматографического экспресс-выявления и идентификации возбудителя

Состав олигонуклеотидных праймеров для тест-системы «*Francisella tularensis multiplex-Eph*»

ДНК-мишень	Обозначение праймеров	5'-3' последовательности праймеров	Размер ампликона (п.н.)
<i>ISFtu2</i>	Ft-IS2-F	aagcaattgtagatcagttgtagg	208
	Ft-IS2-R	ataccttgaatatgctgcctgattc	
23 кДа	Ft-23 кДа-F	tgtagatgctgagtcgattc	349
	Ft-23 кДа-R	gcagtagatcagttctcacatg	
<i>fopA</i>	Ft-fopA-F	gcaaacactaattcagctactacac	500
	Ft-fopA-R	gtaccgcctctgccattag	

туляремии «ИХ тест *F. tularensis*» (ИХ тест) с чувствительностью  $1 \cdot 10^7$  м.к./мл, производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» п. Оболенск. Постановку МФА осуществляли с иммуноглобулинами диагностическими флуоресцирующими туляремиными, сухими, производства филиала «Медгамал» ГУ НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН. Исследование методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) проводили с использованием мультилокусной тест-системы «*Francisella tularensis multiplex-Eph*», разработанной в ФКУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора, с праймерами комплементарными участкам мобильного элемента *ISFtu2* и генов 23 кДа, *fopA* [6]. Чувствительность ПЦР составляла  $1 \cdot 10^2$ – $1 \cdot 10^3$  м.к./мл. Набор олигонуклеотидных праймеров для мультиплексной ПЦР тест-системы с детекцией в электрофоретическом формате представлен в таблице.

Исследование биологическим и бактериологическим методами проводили в соответствии с инструктивно-методическими документами [4, 5]. Для выделения туляремиального микроба использовали Ft-агар [2].

### Результаты и обсуждение

Нами было исследовано 217 пулов иксодовых клещей, собранных на территориях Красногвардейского, Изобильненского и Ипатовского районов Ставропольского края весной 2008 г., 129 пулов ИК – на территориях Шпаковского и Грачевского районов Ставропольского края весной 2010 г. и 180 пулов ИК – на территории Карачаево-Черкесской Республики весной 2010 г.

Суспензии ИК исследованы параллельно в РНГА, ТИФМ и ПЦР. Положительные результаты в РНГА получены при исследовании 49 пулов. В 11 из них зарегистрированы положительные результаты в ТИФМ с величиной оптической плотности в опытных лунках, соответствующей положительному контролю. Им соответствовали видоспецифические фрагменты ДНК, обнаруженные методом ПЦР. Эти 11 пулов ИК с положительными результатами в ТИФМ были изучены с помощью ИХ тестов и МФА с получением положительных результатов в 100 % случаев, а также биологическим и бактериологическим методами с выделением возбудителя туляремии.

Дополнительно в 5 суспензиях ИК (10,2 % от общего количества положительных в РНГА) заре-

гистрированы положительные результаты в ТИФМ, но с величиной оптической плотности в опытных лунках в 1,5–2 раза ниже, чем в положительном контроле. Исследование этих суспензий с помощью ИХ тестов и МФА дало отрицательные результаты, хотя в ПЦР были получены положительные. Из них не выделен туляремиальный микроб.

В оставшихся 33 пробах с положительными результатами в РНГА присутствие туляремиального антигена не подтвердилось в ТИФМ и ИХ тестах, а исследование методом ПЦР дало отрицательные результаты. Возбудитель туляремии не обнаружен в них биологическим и бактериологическим методами. Напротив, методом ПЦР положительные результаты дополнительно зарегистрированы в 6 пулах (1,3 % от общего количества отрицательных в РНГА), где возбудитель туляремии или его антиген не обнаружен при первичном скрининге.

Проведенные исследования показали, что первичный скрининг суспензий ИК можно проводить в РНГА, которую отличает методическая простота постановки и общедоступность диагностикума. Но учитывая недостаточную специфичность РНГА (6,9 % ложноположительные результаты), достоверность обнаружения туляремиального антигена в этой реакции следует подтверждать с помощью ИХ тестов или ТИФМ. Это значительно снижает целесообразность использования РНГА для исследования суспензий ИК.

Исследование пулов ИК с помощью ИХ тестов показало их высокую специфичность. Положительные результаты в ИХ тестах в 100 % случаев совпали с положительными результатами в РНГА, ТИФМ, ПЦР и выделением культур возбудителя, что позволяет рекомендовать применение ИХ тестов на практике.

Исследование твердофазным иммуноферментным методом позволило дифференцировать пробы на две группы. В первую вошли пулы ИК, в которых величина оптической плотности положительного результата иммуноферментной реакции соответствовала значению положительного контроля. Положительные результаты этого метода совпали с положительными результатами в РНГА, ИХ тестах, ПЦР и выделением культур возбудителя. Вторую группу составили пробы с положительными результатами в ТИФМ, но величиной оптической плотности в опытных лунках в 1,5–2 раза ниже, чем в положительном контроле. Из этих проб не выделен возбудитель туляремии. Согласно полученным данным,

наиболее вероятным в таких случаях может быть совпадение результатов в ТИФМ с ПЦР, на основании чего можно будет утверждать о присутствии туляремийного антигена и ДНК в исследуемом пуле ИК.

Применение ПЦР позволило подтвердить достоверность результатов ИХ тестов и ТИФМ и дополнительно обнаружить видоспецифические фрагменты ДНК еще в 6 пулах. Этот метод оказался наиболее информативным. Особую группу составили пулы ИК с отрицательными результатами в ТИФМ и других серологических реакциях, но содержащие видоспецифические фрагменты ДНК туляремийного микроба. По нашему мнению, такие результаты указывают на участки потенциально опасных территорий природного очага туляремии.

Таким образом, учитывая высокую чувствительность и диагностическую значимость ПЦР, эту реакцию следует использовать при проведении первичного скрининга суспензий ИК. Пулы с положительными результатами в ПЦР подлежат исследованию в ТИФМ и ИХ тестах для обнаружения в них туляремийного антигена. В случае обнаружения антигена такие пулы ИК обязательно подлежат изучению биологическим или бактериологическим методами для выделения туляремийного микроба с высокой степенью вероятности. Наличие одновременно положительных результатов в ТИФМ, ИХ тесте, МФА и ПЦР предполагает присутствие возбудителя туляремии в пробе.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безсмертный В.Е., Попов В.П., Жуков В.И., Иванова С.М. Обзор эпизоотической ситуации по туляремии на территории

Российской Федерации во втором полугодии 2008 г. и прогноз на первое полугодие 2009 г. Пробл. особо опасных инф. 2009; 2(100):11–3.

2. Морозова Т.П., Домотенко Л.В., Храмов М.В. Оценка диагностических свойств прозрачной питательной среды для культивирования и выделения туляремийного микроба (Ft-агара). Пробл. особо опасных инф. 2010; 3(105):50–3.

3. Олсуфьев Н.Г., Дунаева Т.Н. Эпизоотология (природная очаговость) туляремии. В кн.: Туляремия. М.; 1960. С. 136–206.

4. Туляремия. В кн.: Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. М.: Медицина; 2009. С. 142–69.

5. Эпидемиологический надзор за туляремией. МУ 3.1.2007-05. М.; 2005. 24 с.

6. Versage J.L., Severin D.D.M., Chu M.C., Petersen J.M. Development of a Multitarget Real-Time TagMan PCR Assay for Enhanced Detection of *Francisella tularensis* in Complex Specimens. J. Clin. Microbiol. 2003; 41(12):5492–9.

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

1. Bezsmertny V.E., Popov V.P., Zhukov V.I., Ivanova S.M. [Review of tularemia epizootic situation in the Russian Federation territory in the second half of 2008 and prognosis for the first half of 2009]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2009; (100):11–3.

2. Morozova T.P., Domotenko L.V., Khramov M.V. [Evaluation of the diagnostic properties of transparent nutrient medium for cultivation and isolation of tularemia agent (Ft-agar)]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; (105):50–3.

3. Olsuf'ev N.G., Dunaeva T.N. [Epizootiology (natural focality) of tularemia]. In: [Tularemia]. M.; 1960. P. 136–206.

4. [Tularemia]. In: [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases]. M.; 2009. P. 142–69.

5. [Tularemia epidemiological control]. MR 3.1.2007-05. M.; 2005. 24 p.

#### Authors:

Zaitsev A.A., Gnusareva O.A., Solodovnikov B.V., Tsareva N.S., Ostapovich V.V., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

#### Об авторах:

Зайцев А.А., Гнусарева О.А., Солодовников Б.В., Царева Н.С., Остапович В.В., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 17.08.11.

И.И.Корсакова, Н.П.Храпова, Г.М.Напалкова, Л.В.Ломова, Н.М.Дрефс, Ю.А.Голосеев, Т.В.Булатова

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИММУНОХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИГЕНОВ ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград

Изучены иммунохимические свойства антигенных препаратов, спектр и молекулярные массы составляющих их компонентов, показано значение вертикального электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия, реакции иммунодиффузии, иммуноэлектрофореза, ракетного иммуноэлектрофореза со специфическими сыворотками для идентификации и дифференциации буркхольдерий. Наиболее информативным методом следует признать РИЭФ, который дает возможность дифференцировать патогенные буркхольдерии от непатогенных для человека в обычных условиях.

**Ключевые слова:** антигенные комплексы патогенных и непатогенных буркхольдерий, иммунохимическая идентификация и дифференциация.

I.I.Korsakova, N.P.Khrapova, G.M.Napalkova, L.V.Lomova, N.M.Drefs, Yu.A.Goloseev, T.V.Bulatova

## Comparative Analysis of Immunochemical Methods Applied for Studies of Pathogenic *Burkholderia* Antigens

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd

Studied are immunochemical properties of antigen preparations, the spectrum and molar masses of the components contained. Demonstrated is the significance of vertical SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, immunodiffusion test, immunoelectrophoresis assay, rocket immunoelectrophoresis with specific sera for identification and differentiation of *Burkholderia*. Rocket immunoelectrophoresis should be viewed as the most informative method which allows for differentiation between pathogenic and non-pathogenic for humans *Burkholderia* under usual terms.

**Key words:** antigen complexes of pathogenic and non-pathogenic *Burkholderia*, immunochemical identification and differentiation.

Интерес исследователей к изучению буркхольдерий, относящихся к группе *pseudomallei* и *Burkholderia cepacia*-комплексу, сохраняется до настоящего времени, что объясняется рядом причин. Возбудитель мелиоидоза, *Burkholderia pseudomallei*, способный вызывать тяжелые заболевания у людей и животных, обитает в природе, главным образом в Юго-восточной Азии, Северной Австралии, некоторых районах Африки, Северной и Центральной Америки [6, 7, 9]. Хотя исторически мелиоидоз считается относительно редким заболеванием, за последний период его частота возросла в ряде стран в связи с увеличением посещений эндемичных по данной инфекции регионов мира и совершенствованием методов лабораторной диагностики [2].

Привлекает внимание и близкородственный возбудитель сапа *Burkholderia mallei*, способный вызывать острые и хронические заболевания у людей, профессионально занятых уходом за животными. Настороженность в отношении *B. pseudomallei* и *B. mallei* как возможных агентов биотерроризма значительно возросла [2]. Из объектов окружающей среды в процессе эпидемиологического мониторинга выделяются фенотипически и генотипически родственные *B. pseudomallei* и *B. mallei* буркхольдерии *B. cepacia*-комплекса и *Burkholderia thailandensis*, близкие между собой по антигенному составу и характеризующиеся вариабельностью и гетерогенно-

стью диагностических признаков, что не позволяет идентифицировать штаммы до видовой принадлежности с помощью полуавтоматических систем [1, 8].

Перспективным направлением работы остается обнаружение и идентификация экстрацеллюлярных и связанных с поверхностью клеток антигенов патогенных буркхольдерий, являющихся общими, видовыми, ассоциированными с иммуногенностью и вирулентностью данных возбудителей, на основе которых могут быть разработаны новые реагенты для диагностических тестов и созданы вакцинные препараты для специфической профилактики сапа и мелиоидоза.

Цель работы – проведение иммунохимического анализа антигенных комплексов патогенных и непатогенных для человека буркхольдерий различными методами, установление наличия общих и видовых антигенов у *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia*, *B. gladioli*, определение ценности каждого метода на этапах дифференциации буркхольдерий.

### Материалы и методы

Для работы использовали типичные штаммы возбудителей сапа и мелиоидоза с полноценной антигенной структурой из коллекции ФКУЗ «ВолгоградНИПЧИ»: *B. mallei* – 13, *B. pseudomal-*

lei – 60 штаммов, мутантные штаммы *B. mallei* 10230-11-2, *B. pseudomallei* 100-6-1, 111-6-1, а также штаммы 3 близкородственных видов буркхольдерий: *B. thailandensis* – 5, *B. cepacia* – 14, *B. gladioli* – 3.

Культивирование микроорганизмов и накопление биомассы проводили на бифазной питательной среде, состоящей из Nutrient-агара («Difco»), рН 6,8, на который насливали Nutrient-бульон («Difco»), рН 6,8, при 37 °С в течение 48 ч. Микробную взвесь инактивировали добавлением 4 объемов охлажденного до –30 °С ацетона. Для получения водно-солевых экстрактов (ВСЭ) к 1 г высушенной ацетоном клеточной массы добавляли 60 мл забуференного 0,15 М раствора NaCl (рН 7,2) и 0,05 % азида натрия. Взвесь перемешивали на магнитной мешалке при отсутствии пены в течение 1 сут при 4 °С. Антигенные комплексы экстрагировали ультразвуковой обработкой клеточной суспензии с помощью дезинтегратора Artek-150 («Artek», США) в течение 2 мин при частоте 22 кГц и мощности 160 Вт. Полученный материал центрифугировали при 15000 об/мин в течение 30 мин с охлаждением. Супернатант отделяли, концентрировали и диализовали против дистиллированной воды на мембране РМ-10 («Diaflo», США), затем разливали по аликвотам и хранили при –10 °С.

Антиген 8 (Аг 8) получали из высушенных ацетоном микробных клеток экстракцией формамидом по методу Фуллера в модификации, которая заключалась в экстрагировании при температуре 20 °С [4]. Экстрацеллюлярные антигены (ЭЦА) получали, как указано [4].

Гипериммунные кроличьи и козьи сыворотки получали путем внутрикожных или подкожных введений целых микробных клеток, ЭЦА или Аг 8 с использованием полного или неполного адьюванта Фрейнда («Calbiochem», США) в соотношении 1:1 в 8–10 точек вдоль позвоночника четырехкратно с интервалом в 1 неделю возрастающими дозами антиге-

нов. Курс иммунизации состоял из двух или четырех циклов с интервалом 30 сут. Взятие крови проводили на 7-е сутки после заключительной инъекции. В работе использовали сыворотки, активность которых в РИД была не ниже 1:32.

Иммунохимические свойства антигенных препаратов, спектр и молекулярные массы (м.м.) составляющих их компонентов определяли методом вертикального электрофореза в 7,5 и 10 % полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ПААГ-ДСН) [10], в реакции иммунодиффузии (РИД) [5], при иммуноэлектрофорезе (ИЭФ) [5] и ракетном иммуноэлектрофорезе (РИЭФ) [3] со специфическими сыворотками. Определение химического состава полученных антигенов (концентрация белка и углеводов) осуществляли с использованием методов O.Lowry и M. Dubois соответственно [4, 5].

**Результаты и обсуждение**

С помощью модифицированной формамидной экстракции нам удалось выделить из капсулы клеток возбудителей сапа и мелиоидоза гликопротеины, которые позволяют дифференцировать указанные микроорганизмы от близкородственных буркхольдерий и других микробных видов. К ним относится антиген 8, имеющий м.м. 200 kDa, что установлено при электрофорезе в полиакриламидном геле. Детальное изучение в процессе пролонгированного электрофореза в полиакриламидном геле состава Аг 8 выявило, что он имеет несколько субъединиц, располагающихся в пределах м.м. от 150 до 220 kDa. При ИЭФ Аг 8 формирует характерную дугу преципитата в электро-нейтральной зоне. Установлено, что концентрация белка в препарате составляла 0,4–3 мг/мл, а углеводов – 3,07–48 мг/мл.

При использовании в РИД (таблица) микробных клеток, а также выделенного из них антиген-

Результаты обнаружения антигенов буркхольдерий различными методами

Метод исследования	Сыворотка к антигену	Антиген возбудителей				
		<i>B. pseudomallei</i>	<i>B. mallei</i>	<i>B. thailandensis</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>B. gladioli</i>
РИД	Аг 8	+	+	–	–	–
	ЭЦА <i>B. pseudomallei</i> C-141	+	+	+	–	–
	ЭЦА <i>B. mallei</i> 10230	+	+	+	–	–
	ЭЦА <i>B. thailandensis</i> 264	+	+	+	±	±
	ВСЭ <i>B. pseudomallei</i> C-141	+	+	±	±	±
	ВСЭ <i>B. thailandensis</i> 264	+	+	+	±	±
	ВСЭ смеси 5 штаммов <i>B. thailandensis</i>	+	+	+	±	±
ИЭФ	Аг 8	+	+	±	–	–
	ЭЦА <i>B. pseudomallei</i> C-141	+	+	+	–	–
	ЭЦА <i>B. mallei</i> 10230	+	+	+	–	–
	ЭЦА <i>B. thailandensis</i> 264	+	+	+	–	–
	ВСЭ <i>B. pseudomallei</i> 100	+	+	–	–	–
РИЭФ	Аг 8	+	+	–	–	–
ПААГ-ДСН	нет	±	±	±	±	±

<sup>1</sup>Ацетонвысушенные микробные клетки.

<sup>2</sup>ВСЭ исследуемых штаммов.

Примечания: «+» – антиген определяется; «–» – не определяется; «±» – определяется непостоянно.

ного материала ни один из 5 штаммов *B. cepacia* и 3 штаммов *B. gladioli* не взаимодействовал с сывороткой, полученной к ЭЦА *B. pseudomallei* С-141. Эти же штаммы и авирулентный вариант возбудителя сапа дали отрицательные результаты с сывороткой, полученной к ЭЦА *B. mallei* 10230, а с сывороткой против ВСЭ *B. pseudomallei* С-141 результаты были отрицательными с единичными штаммами *B. cepacia*, *B. thailandensis*, *B. gladioli*. С сывороткой к ЭЦА *B. thailandensis* 264 все исследованные штаммы, кроме *B. cepacia* 423 и *B. gladioli* 8495, дали положительный результат. При постановке реакции с сывороткой к ВСЭ *B. thailandensis* 264 из всех исследованных штаммов с последней не прореагировали по 2 штамма *B. cepacia* (423, 8237) и *B. gladioli* (8495, 1298). РИД оказалась положительной со всеми штаммами, за исключением *B. cepacia* 1934, 8237, 423 и *B. gladioli* 8495, при использовании сыворотки против ВСЭ смеси пяти штаммов *B. thailandensis*. С сывороткой к ЭЦА *B. cepacia* 25416 преципитация обнаружена только у ВСЭ гомологичного штамма и возбудителей сапа и мелиоидоза. Положительные результаты с козьей сывороткой, содержащей специфические антитела к Аг 8, получены лишь для *B. pseudomallei* и *B. mallei*.

Таким образом, реакция иммунодиффузии при условии применения поликлональных сывороток не позволяла во всех случаях четко дифференцировать различные виды буркхольдерий между собой.

Изучены клеточные антигенные комплексы патогенных буркхольдерий и близкородственных видов микроорганизмов с помощью ИЭФ с гомологичными и гетерологичными сыворотками. С сывороткой к Аг 8 *B. pseudomallei* 100 взаимодействовали антигены как вирулентных, так и авирулентных штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза, всех испытанных штаммов *B. thailandensis*. При этом спектр антигенов у них имел некоторые отличия. Близкородственные буркхольдерии *B. cepacia* 25416 и *B. gladioli* с указанной сывороткой не реагировали. Смесь антигенов ВСЭ *B. pseudomallei* 100 давала полосы преципитации в ИЭФ со всеми изученными сыворотками. Исследование ВСЭ *B. pseudomallei* 100, *B. mallei* 10230 и близкородственных штаммов *B. thailandensis* 251, 264, 295, 299, *B. cepacia* 25416, *B. gladioli* 8494, 8495 в ИЭФ с козьей иммунной сывороткой, полученной к Аг 8, показало его отсутствие во всех микробных клетках, кроме возбудителей сапа и мелиоидоза.

Нами установлено, что все оппортунистические патогены, т.е. непатогенные для здорового человека буркхольдерии, кроме *B. thailandensis*, не имеют общих антигенов с ЭЦА *B. pseudomallei* и *B. mallei*; антигенный состав различных штаммов *B. thailandensis* и, в большей степени, *B. cepacia* неоднороден. С помощью ИЭФ возможно отличить *B. pseudomallei* и *B. mallei* от других буркхольдерий при условии применения сыворотки против Аг 8 и ВСЭ исследуемых штаммов. Для целей дифференциации

и идентификации патогенных буркхольдерий необходимо использовать высокоочищенные антигенные препараты, полученные из капсулы клеток возбудителей сапа и мелиоидоза.

Наличие пиков преципитатов в геле со специфическими иммуноглобулинами против Аг 8 у всех исследуемых штаммов при общепринятых условиях РИЭФ не позволяло дифференцировать патогенные *B. pseudomallei* и *B. mallei* от близкородственных буркхольдерий. В результате исследований методом РИЭФ в нашей модификации [3] установлено, что с той же сывороткой через 4 ч после начала электрофореза обнаруживались только антигены возбудителей сапа и мелиоидоза. С антигенами авирулентных штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, а также с близкородственными культурами результаты были отрицательными. Предложенную постановку РИЭФ можно использовать для дифференцирования сапных и мелиоидозных микробов от других видов буркхольдерий.

В работе исследовали методом электрофореза в 10 % ПААГ-ДСН (5 мА, 20 В, 22 ч) ВСЭ 6 штаммов *B. pseudomallei*, 2 – *B. mallei*, 5 – *B. thailandensis*, 4 – *B. cepacia*, 3 – *B. gladioli*. Установлено, что для всех исследованных штаммов характерно наличие значительного количества антигенных компонентов белково-углеводной природы (от 8 до 15) с широким диапазоном м.м. (14–500 kDa). Мажорными антигенами возбудителя мелиоидоза являлись гликопротеины с м.м. 220, 200, 97, 66, 57, 36 и 23 kDa. Состав компонентов у возбудителя сапа несколько отличался: наряду с биополимерами 220, 97, 66, 57 kDa присутствовали антигены 180, 160, 50 и 45 kDa. В составе всех испытанных штаммов *B. thailandensis* обнаружены антигены 205 и 66 kDa, в области м.м. 116–500 kDa набор компонентов у разных штаммов варьировал, штамм 251 имел мажорный компонент в зоне 205–500 kDa. Штаммы *B. cepacia* значительно отличались между собой и по количеству, и по м.м. антигенных компонентов (31–300 kDa). Близкородственные *B. gladioli* имели набор биополимерных антигенов, не идентичный *B. mallei*, *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* и *B. cepacia*, но с общими компонентами в зонах м.м. 205, 97, 66 и 53 kDa.

Таким образом, оппортунистические бактерии *B. cepacia*-комплекса и *B. gladioli* характеризуются большей вариабельностью антигенного состава по сравнению с возбудителями сапа, мелиоидоза и *B. thailandensis*. Наличие нескольких общих биополимерных компонентов у всех исследованных видов буркхольдерий затрудняет выбор антигена, на основе которого можно проводить их дифференциацию и идентификацию. Для этих целей метод электрофореза в ПААГ-ДСН целесообразно использовать как дополнительный.

Не все иммунохимические методы с применением сывороток к группоспецифическому для возбудителей сапа и мелиоидоза Аг 8 позволяют отличить их от близкородственных патогенов. Наиболее информативным методом из использованных в настоя-

щей работе следует признать РИЭФ, который дает возможность дифференцировать патогенные буркхольдерии от непатогенных для человека в обычных условиях. Вариабельность данных, полученных всем комплексом методов, свидетельствует о необходимости разработки способов идентификации антигенов-маркеров и создания их стандартных образцов, отражающих индивидуальные особенности видов буркхольдерий, имеющих медицинское значение.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонов В.А., Илюхин В.И., Сенина Т.В., Лобойко А.Д., Ткаченко Г.А., Зинченко О.В. и др. Фенотипическая и генотипическая идентификация бактерий комплекса *Burkholderia cepacia*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2008; 4:78–82.
2. Илюхин В.И., Сенина Т.В., Плеханова Н.Г., Антонов В.А., Меринова Л.К., Сеимова И.К. *Burkholderia thailandensis*: биологические свойства, идентификация и таксономическая позиция. Мол. генет. микробиол. и вирусол. 2002;1:7–11.
3. Корсакова И.И., Напалкова Г.М., Храпова Н.П., Пивень Н.Н., Ломова Л.В. Способ дифференцирования патогенных от непатогенных буркхольдерий. Патент 2378360 РФ, опубл. 10.01.2010.
4. Пивень Н.Н., Авророва И.В., Жукова С.И., Алексеев В.В., Храпова Н.П., Корсакова И.И. и др. Иммуногенность поверхностных и капсульных антигенов *Burkholderia mallei*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 1:47–52.
5. Пивень Н.Н., Илюхин В.И., Замарин А.Е., Алексеев В.В., Васильев В.П. Адекватный выбор антигенов при серодиагностике экспериментального мелиоидоза. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 2:49–53.
6. Чухланцев Д.А., Маракулин И.В., Дармов И.В. Использование ПЦР для идентификации и межвидового дифференцирования возбудителей сапа и мелиоидоза. Пробл. особо опасных инф. 2008; 97:63–6.
7. Bossi P., Guihot A., Bricare F. Emerging or re-emerging infections that can be used for bioterrorism. Presse Med. 2005; 34(2, Pt. 2):149–55.
8. Elvin S.J., Healy G.D., Williamson E.D., Eyles J.E., Smither S.J., Sarkar-Tyson M. et al. Immunogenic agents against *Burkholderia pseudomallei* and/or *Burkholderia mallei*, comprising lipopolysac-

charide, capsular polysaccharide and/or proteins from *Burkholderia pseudomallei*. Patent WO/2007/036735, PCTT/GB2006/003628, 05.04.2007.

9. Sarkar-Tyson M., Titball R.W. Progress toward development of vaccines against melioidosis: A review. Clin. Ther. 2010; 32(8):1437–45.

10. Westemeier R. Electrophoresis in practice: A guide to methods and applications of DNA and protein separations. 4th ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag; 2005. 406 p.

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

1. Antonov V.A., Ilyukhin V.I., Senina T.V., Loboyko A.D., Tkachenko G.A., Zinchenko O.V. et al. [Phenotype and genotype identification of *Burkholderia cepacia* bacteria complex]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2008; 4:78–82.
2. Ilyukhin V.I., Senina T.V., Plekhanova N.G., Antonov V.A., Merinova L.K., Seimova I.K. [*Burkholderia thailandensis*: biological properties, identification and taxonomic position]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 2002; 1:7–11.
3. Korsakova I.I., Napalkova G.M., Khrapova N.P., Piven' N.N., Lomova L.V. [Method of differentiation between pathogenic and non-pathogenic *Burkholderia*]. RF Patent 2378360.
4. Piven' N.N., Avrorova I.V., Zhukova S.I., Alekseev V.V., Khrapova N.P., Korsakova I.I. et al. [Immunogenicity of surface and capsular *Burkholderia mallei* antigens]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2007; 1:47–52.
5. Piven' N.N., Ilyukhin V.I., Zamarin A.E., Alekseev V.V., Vasil'ev V.P. [Adequate selection of antigens in case of serodiagnostics of experimental melioidosis]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2007; 2:49–53.
6. Chukhlantsev D.A., Marakulin I.V., Darmov I.V. [Application of PCR for identification and interspecific differentiation of glanders and melioidosis etiologic agents]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2008; 97:63–6.

#### Authors:

Korsakova I.I., Khrapova N.P., Napalkova G.M., Lomova L.V., Drefs N.M., Goloseev Yu.A., Bulatova T.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russia. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

#### Об авторах:

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

Поступила 24.11.11.

А.Н.Куличенко, Е.Л.Ракитина, Д.Г.Пономаренко, О.В.Логвиненко, А.Г.Рязанова

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕСТА АКТИВАЦИИ БАЗОФИЛОВ С АНТРАКСИНОМ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ (*IN VITRO*) ДИАГНОСТИКИ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь

Получены данные о перспективе применения теста оценки активации базофилов с учетом результатов на цитометре для диагностики сибирской язвы. Длительность анализа – 1 ч, возможна количественная оценка степени сенсибилизации организма. Методика *in vitro* исключает дополнительную аллергизацию организма. Предлагаемый метод перспективен в качестве экспресс-теста для ранней и ретроспективной лабораторной диагностики сибирской язвы, оценки поствакцинального иммунитета.

*Ключевые слова:* сибирская язва, антраксин, тест активации базофилов, проточная цитометрия.

A.N.Kulichenko, E.L.Rakitina, D.G.Ponomarenko, O.V.Logvinenko, A.G.Ryazanova

## Application of Basophil Activation Test with Anthraxin for Laboratory (*in vitro*) Diagnostics of Anthrax

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol

Demonstrated is the possibility to use *in vitro* basophil activation test with anthraxin, with registration of the results by means of flow cytometry, for anthrax diagnostics. This approach seems promising as it provides quantitative assessment of sensitization of the organism and does not cause its additional allergization. The duration of the analysis is 1h. The test is suggested for application, as an express one, for early and retrospective laboratory diagnostics of anthrax, estimation of post-vaccinal immunity.

*Key words:* anthrax, anthraxin, cellular antigen stimulation test, flow cytometry.

Для диагностики сибирской язвы во второй половине XX века был разработан и активно применялся иммунологический метод с использованием антраксина, так называемый антраксин-кожный тест (АКТ). Сущность метода заключается в том, что организм больного, переболевшего сибирской язвой или иммунизированного против этой инфекции, отвечает местной аллергической реакцией в виде гиперемии и инфильтрации кожи на месте введения сибиреязвенного аллергена – антраксина. Реакция может проявляться с первых суток после инфицирования, у подавляющего числа наблюдаемых на 5–7-е сутки [3, 4, 5].

Есть данные о высокой эффективности АКТ теста при ранней диагностике сибирской язвы: на третий день заболевания АКТ был положителен у 82 % больных с острой формой сибирской язвы, при этом культуру удалось выделить лишь у 42 % (группа наблюдения 110 чел.) Аллергическая перестройка организма у переболевших сибирской язвой может сохраняться длительное время, имеются данные, что у 72 % из них АКТ остается положительным в течение трех лет; это позволяет использовать метод и для ретроспективной диагностики. Показано, что антибиотикотерапия не влияет на интенсивность реакции с антраксином [3, 8].

По данным Э.Н. Шляхова, у людей, иммунизированных вакциной СТИ-1, положительная кожная реакция на введение антраксина развивалась у 28 % испытуемых на 2–5-й день после вакцинации, затем процент таких лиц повышался до 61, а через год составил 30.

Таким образом, АКТ позволяет проводить раннюю и ретроспективную диагностику сибирской язвы, метод обладает сравнительно высокой диагностической и специфической чувствительностью. К недостаткам АКТ относят риск побочных реакций организма на дополнительную антигенную нагрузку, возможность возникновения ложноположительного результата при патологических иммунных процессах.

В настоящее время ведутся исследования, направленные на замену инвазивного АКТ на более безопасный, с точки зрения возникновения осложнений, метод *in vitro* оценки аллергической перестройки организма [1, 2, 3], однако достойной альтернативы кожно-аллергическому тесту пока не разработано.

На сегодняшний день имеется значительный прогресс в диагностике аллергических состояний путем выявления специфических IgE методом иммуноферментного анализа и тестов оценки активации базофилов специфическими аллергенами с помощью проточной цитометрии.

Особо перспективным представляется тест активации базофилов, сущность которого сводится к тому, что при контакте аллергена с молекулами IgE на специализированных эффекторных клетках – базофилах – происходит каскад ферментных реакций, приводящих к дегрануляции и высвобождению медиаторов из гранул (гепарин, гистамин). Маркером клеточной перестройки базофилов является CD63(gp53). По сути дела, это аналогичный аллергический тест в условиях *in vitro*. Благодаря используемой технологии CAST®(Cellular Antigen Stimulation Test, тест антигенной стимуляции клеток) способ обладает вы-

сокой специфичностью по сравнению с классическими методиками.

В доступной литературе публикации по использованию теста дегрануляции базофилов со специфическими аллергенами применительно к диагностике особо опасных инфекций отсутствуют.

Целью работы являлось изучение возможности применения теста активации базофилов с антраксином в условиях *in vitro* с использованием проточной цитометрии для оценки аллергической перестройки у больных и вакцинированных против сибирской язвы людей.

### Материалы и методы

В эксперименте исследовали кровь 15 человек. Из них – 5 больных кожной формой сибирской язвы на 7-е сутки после инфицирования (на 2–4-й день заболевания), 5 – иммунизированные по эпидпоказаниям вакциной *Bacillus anthracis* СТИ-1 на 21-е сутки после вакцинации, 5 – контрольная группа. Экспрессию на базофилах CD63 определяли на проточном цитометре FACSCalibur, используя набор высокоспецифичных моноклональных антител, которые связываются с высокоаффинным IgE рецептором (Flow 2 CAST, Buhlmann laboratories, Швейцария) [7].

Для определения фонового значения, с целью исключения ложноположительного результата, в контрольную пробирку со стабилизированной кровью вносили «буфер для стимуляции» (Flow 2 Cast). В опытную пробирку добавляли антраксин.

Окрашивание базофилов проводили с помощью реагента – смесь моноклональных антител к CD63 человека, конъюгированных с флюоресцеинизотиоцианатом (анти-CD63-FITC), и хемокиновому рецептору CCR, меченному фикоэритрином (анти-CCR3-PE). CCR3 конститутивно экспрессируется на эозинофилах и базофилах. Эритроциты удаляли с помощью лизирующего агента и центрифугирования, после чего лейкоциты ресуспендировали в отмывающем буфере и анализировали на проточном цитометре. При учете результата значение фоновой пробы вычитали из аналогичного показателя при стимуляции антраксином, полученные цифровые данные отражают процент активированных базофилов.

Обеззараживание исследуемого материала от больных сибирской язвой осуществляли согласно санитарно-эпидемиологическим правилам (СП 1.3.1285-03).

### Результаты и обсуждение

При постановке теста активации базофилов в крови больных кожной формой сибирской язвы определено от 41 до 79 % активированных антраксином базофилов. У вакцинированных количество детектируемых клеток варьировало от 12 до 26 %. В контрольной группе процент сенсibilизированных базофилов находился на уровне от 1,7 до 6,7 % (рисунок).

При исследовании крови больных сибирской язвой фоновое количество активированных базофилов составило (5,8±1,9) %, после внесения в пробу специфического аллергена выявлено достоверное повышение исследуемых клеток до (60,0±6,1) % (p<0,05).

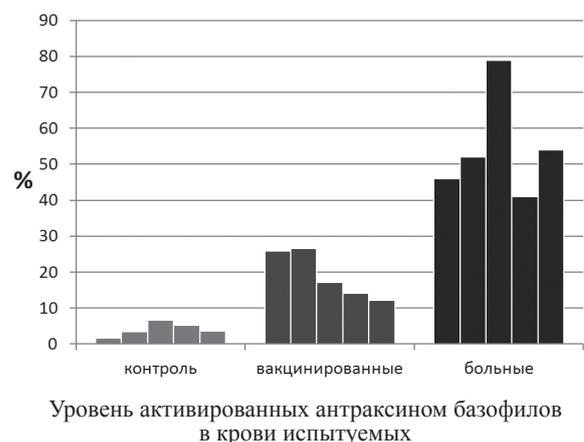
Аналогичная тенденция отмечается у пациентов, иммунизированных вакциной *B. anthracis* СТИ-1. Полученные фоновые значения составили (4,9±0,6) %, при добавлении антраксина в пробу наблюдали увеличение показателя до (24,1±3,3) % (p<0,05).

В контрольной группе пациентов среднестатистическое фоновое количество активированных базофилов составило (4,4±1,4) %, при активации антраксином число исследуемых клеток увеличилось до (8,52±0,75) %.

При проведении исследований выявлено, что в контрольной группе уровень активированных базофилов, экспрессирующих рецепторы к CD63, составил (4,12±0,85) %, что в 5,3 раза ниже, чем у людей, вакцинированных против сибирской язвы – (21,7±3,02) %, и в 13,2 раза, чем у больных кожной формой – (54,4±6,5) %. В группе переболевших сибирской язвой имело место достоверное увеличение количества активированных антраксином базофилов более чем в два раза, по сравнению с вакцинированными.

Полученные результаты указывают на перспективу применения аллергического теста *in vitro* для диагностики сибирской язвы. Учет результатов проводят через 1 ч от начала исследования, при этом возможна количественная оценка степени сенсibilизации организма. Предложенная методика исключает добавочное антигенное воздействие на организм, что предупреждает возникновение осложнений и дополнительной аллергизации организма и может быть использована как экспресс-тест при диагностике сибирской язвы.

В связи с тем, что базофилы являются активными эффекторными клетками в развитии реакций гиперчувствительности немедленного типа и вызывают на своей поверхности специфические IgE к различным аллергенам, с которыми человек контактирует в течение жизни, могут возникать ложноположительные результаты реакции. Для объективной



интерпретации полученных результатов необходимо определение индивидуальных фоновых значений количества базофилов неспецифически активированных стимулирующим буфером. Также необходимо проведение исследований по динамике изменения изученного показателя в поствакцинальный период.

Таким образом, показана принципиальная возможность и перспектива использования теста активации базофилов для лабораторной диагностики сибирской язвы и оценки поствакцинального иммунитета.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бакулов И.А., Гаврилов В.А., Селиверстов В.В. Сибирская язва новые страницы в изучении «старой» болезни. Владимир: Посад; 2001. 278 с.
2. Новиков Д.К., Сергеев Ю.В., Новиков П.Д. Лекарственная аллергия. М: Национальная академия микологии; 2001. 330 с.
3. Онищенко Г.Г., Васильев Н.Т., Литусов Н.В., Харченко А.Т., Васильев П.Г., Садовой И.В., Кожухов В.В. Сибирская язва: актуальные аспекты микробиологии, эпидемиологии, клини- ки, диагностики, лечения и профилактики. М: ВУНМЦ МЗ РФ; 1999. 448 с.
4. Онищенко Г.Г., Кожухова В.В. Сибирская язва. М: Медицина; 2010. 424 с.
5. Шляхов Э.Н. Сибирская язва. Биологические и имму- нологические основы диагностики и защиты. Сообщение 4. Динамика и интенсивность кожных проб с антраксином у мор- ских свинок, инокулированных вакциной СТИ. Журн. гигиены, эпидемиол., микробиол. и иммунол. 1970; 3:364–8.
6. Шюковская Т.И., Фирстова В.В., Кравцов А.Л., Клюева С.Н., Попов Ю.А., Микшиш Н.И. Оценка приобретенного имму- нитета против сибирской язвы по степени повреждения лейкоци- тов крови *in vitro* антраксином. Пробл. особо опасных инф. 2007;

1(93):81–4.

7. De Weck A.L., Sanz M.L. Flow cytometric cellular allergen stimulation test. Technical and clinical evaluation of a new diag- nostic test in allergy and pseudo-allergy. ACI International. 2002; 4(5):204–15.

8. Shlyakhov E. Anthrax- $\alpha$  skin test for early and retrospective diagnosis of anthrax and anthrax vaccination assessment. Salisbury Med Bull Suppl. 1996; 87:109–10.

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

1. Bakulov I.A., Gavrilov V.A., Seliverstov V.V. [Anthrax. New pages in histories of old disease]. Vladimir; 2001. 278 p.
2. Novikov D.K., Sergeev Yu.V., Novikov P.D. [Drug allergy]. M: 2001. 330 p.
3. Onishchenko G.G., Vasil'ev N.T., Litusov N.V., Kharchenko A.T., Vasil'ev P.G., Sadovoi I.V., Kozhukhova V.V. [Anthrax: actual aspects of micro- biology, epidemiology, clinic, diagnostics and prophylaxis]. M.; 1999. 448 p.
4. Onishchenko G.G., Kozhukhov V.V. [Anthrax]. M.; 2010. 424 p.
5. Shlyakhov E.N. [Anthrax. Biological and immunological principles of diagnostics and prevention. 4. The dynamics and intensity of skin tests with anthraxin in guinea pigs inoculated with a STI vaccine]. Zh. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 1970; 3:364–8.
6. Shchukovskaya T.I., Firstova V.V., Kravtsov A.L., Klyueva S.N., Popov Yu.A., Mikshis N.I. [Estimation of the acquired immunity against an- thrax according to the extent of blood leucocytes damage *in vitro* caused by anthraxin]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2007; (93):81–4.

#### Authors:

Kulichenko A.N., Rakitina E.L., Ponomarenko D.G., Logvinenko O.V., Ryzanova A.G. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

#### Об авторах:

Куличенко А.Н., Ракитина Е.Л., Пономаренко Д.Г., Логвиненко О.В., Рязанова А.Г. Ставропольский научно-исследовательский проти- вочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 22.11.11.

Л.М.Михайлов<sup>1</sup>, А.И.Калиновский<sup>1</sup>, Н.Л.Баранникова<sup>1</sup>, В.И.Кузнецов<sup>1</sup>, А.Г.Атлас<sup>1</sup>, Н.М.Андреевская<sup>1</sup>,  
В.А.Михайлова<sup>1</sup>, О.Г.Татарникова<sup>1</sup>, Л.Н.Гордиенко<sup>2</sup>, Е.В.Куликова<sup>2</sup>, С.В.Балахонов<sup>1</sup>

## КОНСТРУИРОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ БРУЦЕЛЛ В L-ФОРМЕ

<sup>1</sup>ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск; <sup>2</sup>ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт бруцеллеза и туберкулеза животных Российской академии сельскохозяйственных наук», Омск

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что разработанные сухие питательные среды на основах печеночного настоя и гидролизата сороги обладают высокой чувствительностью, полностью ингибируют рост бруцелл в S-форме и могут быть использованы для выделения, культивирования и накопления бруцелл в L-форме при бактериологической диагностике бруцеллеза. Питательные среды не нуждаются в корректировке pH, не требуют фильтрации и автоклавирования, удобны при транспортировке, что позволяет использовать их для работы в стационарных и полевых условиях.

*Ключевые слова:* бруцеллы в S- и L-формах, питательные среды, чувствительность.

L.M.Mikhailov<sup>1</sup>, A.I.Kalinovsky<sup>1</sup>, N.L.Barannikova<sup>1</sup>, V.I.Kuznetsov<sup>1</sup>, A.G.Atlas<sup>1</sup>, N.M.Andreevskaya<sup>1</sup>,  
V.A.Mikhailova<sup>1</sup>, O.G.Tatarnikova<sup>1</sup>, L.N.Gordienko<sup>2</sup>, E.V.Kulikova<sup>2</sup>, S.V.Balakhonov<sup>1</sup>

## CONSTRUCTION OF NUTRIENT MEDIA FOR L-FORM BRUCELLA

<sup>1</sup>Irkutsk Research Anti-Plague Institute, Irkutsk; <sup>2</sup>Russian Research Institute of Animal Brucellosis and Tuberculosis of RAAS, Omsk

Dry nutrient media on the basis of hepatic infusion and Siberian roach hydrolyzate are constructed. Experimental data demonstrate that these media possess high sensitivity, completely inhibit growth of S-form *Brucella*, do not require pH adjustment, filtration and autoclaving. They can be used for isolation, cultivation and accumulation of L-form *Brucella* for bacteriological diagnostics of brucellosis. As these media are accessible for transportation, they are applicable for stationary and field conditions.

*Key words:* S- and L-form *Brucella*, nutrient media, sensitivity.

Одной из причин длительного существования неманифестных очагов бруцеллеза может быть циркуляция в них возбудителя в L-форме. Недостаточные знания об условиях образования L-форм бруцелл, методах их выделения и идентификации не позволяют в полной мере оценить их значение в эпизоотических и эпидемических проявлениях [6, 10].

До настоящего времени известны лишь единичные случаи заболевания людей бруцеллезом, которые подтвердились выделением культур бруцелл в L-форме [10, 11]. Известно, что для выделения и культивирования бруцелл в L-форме использовали питательные среды различного состава [5, 9, 11]. Согласно существующим методическим указаниям для выделения бруцелл в L-форме рекомендованы питательные среды на основе печеночного настоя или смеси мясной воды и пептона Мартена [8]. В настоящее время серийный выпуск этих сред отсутствует. Разработка питательных сред для бактериологической диагностики атипичного бруцеллеза, обусловленного возбудителем в L-форме, позволит более целенаправленно проводить диагностические, лечебные и профилактические мероприятия. Поэтому совершенствование существующих и разработка новых питательных сред для выделения бруцелл в L-форме необходимы и актуальны [2, 3, 7, 9].

Целью работы является разработка питательных сред для бруцелл в L-форме.

## Материалы и методы

В качестве контрольных питательных сред применяли: эритроцит-агар (ТУ 9365-046-14237183-09), агары Хоттингера и мясопептонный, для приготовления экспериментальных серий питательных сред для бруцелл в L-форме – мясную воду, печеночный настой, триптический гидролизат сороги (*Rutilus rutilus lacustris*), гидролизат селезенки крупного рогатого скота (КРС), перевар сердечной мышцы. Добавками служили: пептон ферментативный сухой для бактериологических целей (ГОСТ 13805-76), автолизат пекарских дрожжей, аммоний молибденовокислый (ГОСТ 3765-78, ч.д.а.), глицерин (ГОСТ 6259-75, ч.д.а.), глюкоза (ГОСТ 6038-79, ч.д.а.), кристаллический фиолетовый (ТУ 6-09-4119-75), магний сернокислый (ГОСТ 4523-77, х.ч.), натрия гидроокись (ГОСТ 4328-77, х.ч.), натрий лимонно-кислый (ТУ 5-09-22-48-77), натрий хлористый (ГОСТ 4233-77, ч.д.а.), калий хлористый (ГОСТ 4234-77), сахароза (ГОСТ 5833-75, ч.д.а.), крахмал, линкомицин, витамин В<sub>1</sub>, бициллин-3, налидиксовая кислота, нормальная лошадиная сыворотка (НЛС), агар микробиологический (ГОСТ 17206-84).

Питательную среду на основе гидролизата сороги для выделения и накопления L-форм бруцелл готовили смешиванием сухих компонентов [4]. Навеску сухой среды растворяли в дистиллирован-

ной воде, доводили до кипения при помешивании, кипятили в течение 2–3 мин, охлаждали до температуры (40±5) °С, добавляли НЛС (10–20 %), тщательно взбалтывали и разливали в стерильные чашки Петри или бактериологические пробирки.

Основу печеночной питательной среды для выделения и культивирования L-форм бруцелл готовили смешиванием в шаровой мельнице типа «Лабор»-2182 сухих компонентов: печеночного настоя, пептона ферментативного, сахарозы, магния сернокислого, натрия гидроксида, кристаллического фиолетового и агара микробиологического.

Для получения L-трансформантов использовали 18 штаммов бруцелл разных биоваров из коллекции музея живых культур Иркутского противочумного института; для определения скорости роста и показателя прорастания на питательных средах – 89 штаммов бруцелл в S- и L-формах и 24 экспериментальные культуры в L-форме, предоставленные Всероссийским научно-исследовательским институтом бруцеллеза и туберкулеза животных, а также штамм *Brucella abortus* И-206 в L-форме, полученный нами экспериментально, и два штамма в L-форме, изолированных от больных хроническим бруцеллезом людей.

Контролем ингибирующих свойств среды в отношении S-форм бруцелл служили: *B. melitensis* 16 М, *B. abortus* 544, *B. suis* 1330 (референтные) и *B. rangiferi* И-181, *B. abortus* И-206 в S-форме. Работу с микроорганизмами проводили согласно Санитарным правилам [1].

Интенсивность роста бруцелл на питательных средах оценивали по четырехкрестовой схеме: четыре – сплошной рост; три – более 30 колоний образующих единиц (КОЕ); два – от 10 до 30 КОЕ, один – до 10 КОЕ.

Для получения в лабораторных условиях бруцелл на различных стадиях L-трансформации использовали бициллин-3 в нарастающих концентрациях от 10 до 13000 ЕД/мл питательной среды.

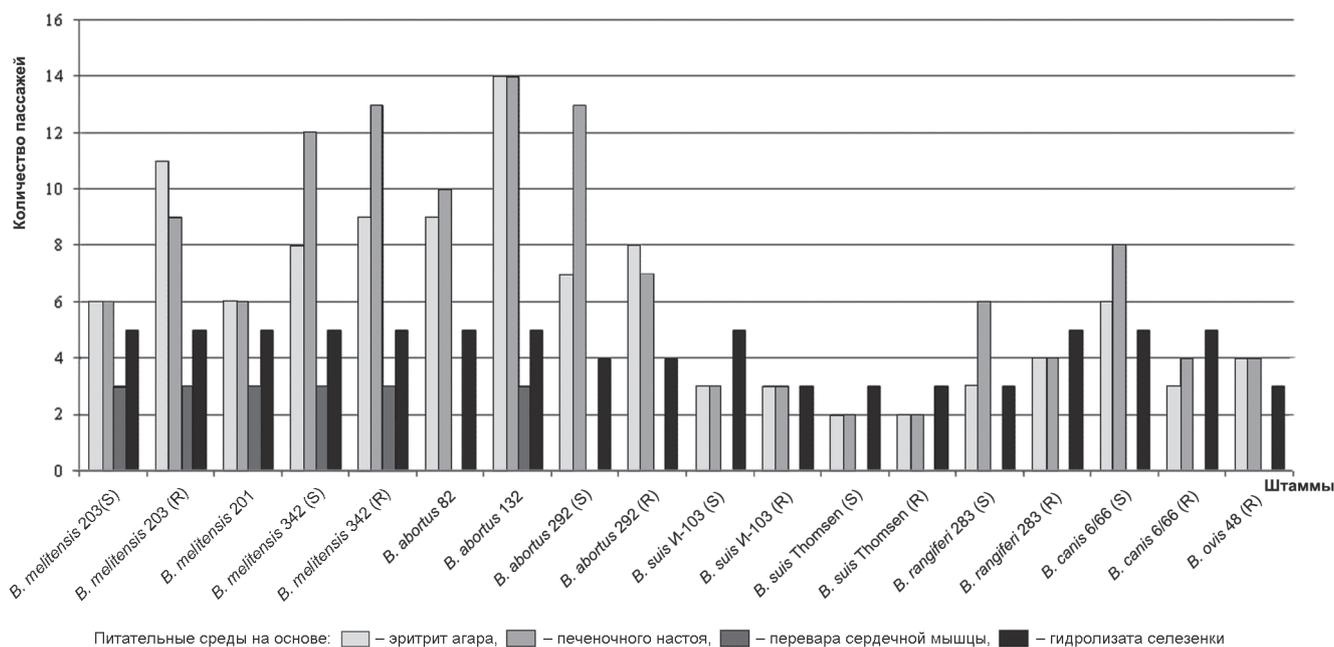
### Результаты и обсуждение

При подборе оптимального состава компонентов питательных сред для получения бруцелл в L-форме приготовлены и испытаны среды на основах: печеночного настоя, рекомендуемого для выделения и культивирования L-форм бруцелл [8]; перевара сердечной мышцы; эритроцит-агара и ранее не апробированного гидролизата из непищевого сырья – селезенки КРС.

При пересевах 18 штаммов бруцелл разных видов наиболее глубокий и быстрый процесс L-трансформации отмечен на печеночном агаре, где количество пассажей составило 14 в течение 123 сут с интервалом от 8 до 13 сут. На эритроцит-агаре количество пассажей также составило 14, но в течение 176 сут с интервалом от 8 до 18 сут. Время появления видимого роста бруцелл в L-форме, по сравнению с S-формами, увеличивалось в зависимости от концентрации бициллина-3 и использованной питательной среды. При посевах всех штаммов бруцелл на среды с переваром сердечной мышцы и селезенки КРС после 5-го пассажа рост отсутствовал.

Зависимость образования L-трансформантов бруцелл с использованием различных питательных сред отражена на рисунке.

Результаты сравнительного изучения чувствительности опытной серии среды на основе гидролизата селезенки КРС и стандартных сред: агаров Хоттингера и мясопептонного (МПА) при посеве двух референтных штаммов *B. abortus* 544, *B. me-*



Количество пассажей при L-трансформации бруцелл на различных питательных средах

Сравнительная чувствительность питательных сред при культивировании бруцелл

Штаммы	Посевная доза, м.к.	Количество выросших колоний (КОЕ)											
		агар на основе гидролизата селезенки КРС				агар Хоттингера				МПА			
		1	2	3	среднее	1	2	3	среднее	1	2	3	среднее
<i>B. melitensis</i> 16 М (реф.)	20	27	25	26	26	31	31	27	29,7	7	7	4	6
<i>B. abortus</i> 544 (реф.)	20	19	30	27	25,3	34	31	30	31,7	7	5	6	6
<i>B. abortus</i> И-206 (S)	20	23	21	26	23,3	23	17	20	20	4	5	7	5,3

*litensis* 16 М и эпизоотического *B. abortus* И-206 в S-форме обобщены в таблице .

Чувствительность питательной среды на основе гидролизата селезенки КРС при посевной дозе 20 м.к. *B. melitensis* 16 М, *B. abortus* 544, *B. abortus* И-206 (S) составила от 23,3 до 26 КОЕ, на агаре Хоттингера – 20–31,7 КОЕ, а на МПА – 5,3–6 КОЕ.

Из результатов таблицы следует, что питательная среда, приготовленная на основе гидролизата селезенки КРС, менее чувствительна, чем агар Хоттингера, но значительно чувствительнее МПА, что свидетельствует о перспективности дальнейшей разработки среды для выделения бруцелл из непещевого сырья.

Изучение влияния на процесс L-трансформации кормовых и пекарских дрожжей, добавленных в питательные среды на основах печеночного настоя, гидролизата селезенки КРС и эритрит-агара проводили с использованием штаммов *B. abortus* И-206 и *B. melitensis* 342. В качестве контроля служили вышеназванные питательные среды без добавок.

Отмечено, что на опытной среде на основе печеночного настоя наибольшее количество проведенных пассажей штамма *B. abortus* И-206 составило 14 за 177 сут, *B. melitensis* 342 – 12 пассажей за 151 сут. На контрольной среде количество пассажей для обоих штаммов не превысило 9 за 102 сут. На питательной среде, приготовленной на основе гидролизата селезенки КРС с добавлением кормовых дрожжей, с обоими штаммами бруцелл количество пассажей составило 9 в течение 106 сут. Добавление в питательную среду пекарских дрожжей не привело к существенному увеличению пассажей по сравнению с контролем. При испытании эритрит-агара наибольшее количество пассажей проведено у *B. abortus* И-206 – 10 за 160 сут и *B. melitensis* 342 – 6 за 57 сут, а добавление в среду пекарских и кормовых дрожжей снизило их до 4–5 за 14–21 сут.

Изучено влияние различных концентраций пептона (0,5, 1, 2 %) на процесс L-трансформации, осмотических стабилизаторов: магния серноокислого (0,5, 1, 2 %), натрия хлористого (0,5, 1 %); глицерина (1 %) и сахарозы (10, 15 %). Наиболее оптимальным является содержание в питательной среде пептона – 1 %, магния серноокислого – 2 %, сахарозы – 10 %, глицерина – 1 %.

Добавление молибденово-кислого аммония и натрия лимонно-кислого в концентрациях 0,03, 0,05, 0,07, 0,1 % как стимуляторов роста бруцелл в

L-форме не привело к желаемому результату.

При конструировании сред для культивирования бруцелл в L-форме использовали агар микробиологический в концентрациях: 0,8, 0,9, 1 и 1,2 %. Оптимальная прочность агарового студня достигнута при добавлении 1 % агара.

Минимальную подавляющую концентрацию бициллина-3 на рост штаммов *B. melitensis* 16 М, *B. abortus* 544, *B. suis* 1330 (референтные), *B. abortus* И-206 в S- и L-формах определяли в повторных опытах при посеве петлей на питательную среду на основе печеночного настоя с добавлением 20 % НЛС. Было установлено, что добавление в питательные среды бициллина-3 в концентрациях 3000 ЕД/мл и выше ингибирует рост бруцелл в S-форме и не влияет на L-форму.

Таким образом, сконструированная сухая питательная среда на основе печеночного настоя представляет собой светло-коричневый аморфный порошок с физико-химическими показателями: рН 7,2±0,2, аминный азот – 0,7 %, потеря в массе при высушивании не более 7 %, прочность студня 505 г. Для приготовления питательной среды для бруцелл в L-форме навеску, указанную на этикетке, расплавляют в литре дистиллированной воды и после охлаждения до температуры (40±5) °С вносят стерильные глицерин (1 %), НЛС (20 %) и бициллин-3 (3·10<sup>7</sup> ЕД). При посеве возбудителя бруцеллеза в L-форме в концентрации 5·10<sup>2</sup> м.к./мл появлялись мелкие колонии синего цвета (за счет содержания в среде кристаллического фиолетового) на 5-е сутки, а при посеве 10<sup>2</sup> м.к./мл на 7-е. Показатель прорастания L-форм бруцелл на среде составил 25,2–33,3 %. Роста бруцелл в S-форме не отмечено.

При разработке более дешевой питательной среды для выделения и накопления бруцелл в L-форме опытным путем подобран ее оптимальный состав, который содержит гидролизат сороги, глюкозу, цистеин, тиамин хлорид, крахмал, магния сульфат, налидиксовую кислоту, линкомицин, агар-агар, гидроокись натрия, НЛС, воду дистиллированную. Приготовлено 4 экспериментальных серии среды, в качестве контроля использовали коммерческую питательную среду для выделения и культивирования бруцелл сухую (эритрит-агар – ТУ 9365-046-14237183-09). Для улучшения результатов визуализации роста бруцелл в среду добавляли налидиксовую кислоту (0,04–0,05 г/л), которая оставляет ее прозрачной в отличие от бициллина-3. Рост бруцелл в L-форме на

плотной питательной среде составил 30–33 % КОЕ, на полужидкой – из пяти клеток, с полной ингибицией роста бруцелл в S-форме.

Изучение влияния сконструированных плотных питательных сред на стабильность свойств бруцелл в L-форме, полученных экспериментально и выделенных от больных людей, показало, что на сухой питательной среде на основе печеночного настоя экспериментальные L-трансформанты бруцелл сохраняли свои свойства при периодических пересевах без изменений в течение десяти лет (срок наблюдения), культуры, выделенные от людей, – трех лет (срок наблюдения), а на среде из основы гидролизата сороги – не более двух месяцев. Поэтому рекомендовано использовать среду на основе печеночного настоя для выделения и культивирования бруцелл, а среду на основе гидролизата сороги – для выделения и накопления.

Испытание интенсивности и скорости роста бруцелл на разработанных сухих питательных средах для выделения, накопления и культивирования бруцелл в L-форме провели с использованием 24 экспериментальных культур бруцелл в L-форме и 89 эпизоотических штаммов бруцелл в S- и L-формах, в том числе выделенных от северных оленей.

Результаты исследования показали, что на среде из основы гидролизата сороги у всех экспериментальных штаммов в L-форме отмечался интенсивный рост с оценкой на четыре креста через 24 ч, что составляло 100 %; на среде на основе печеночного настоя – на один-два креста – (95,8±4,1) % штаммов. Через 72 ч на среде из основы печеночного настоя интенсивность роста возросла и оценивалась на четыре креста у (54,2±10,2) %, на три – 37, (5±9,9) % и на два – у (8,3±5,6) % штаммов.

Штаммы бруцелл в L-формах, выделенные от северных оленей и агглютинирующиеся L-бруцеллезными сыворотками, росли на обеих средах, но значительно интенсивнее на питательной среде из основы гидролизата сороги, на которой рост штаммов бруцелл через 24 ч культивирования составлял (85,5±3,7) %, через 48 ч – (87,6±3,5) %, через 72 ч – (88,8±3,3) % и оценивался на четыре креста. Интенсивность роста штаммов на печеночной среде зависела от срока культивирования: через 24 ч – на один крест, что составляло (67,4±5,0) %, на два креста – (13,5±3,6) %, на три креста – (5,6±3,4) %, на четыре – (2,2±1,6) %. Через 48 ч у (34,8±5,0) % рост штаммов оценивался на один крест, на два креста – (41,6±5,2) %, на три креста – (7,9±2,9) %, на четыре – (9,0±3,0) %. Рост культур через 72 ч культивирования составил у (19,1±4,2) % на один крест, на два креста – (23,6±4,5) %, на три креста – (37,1±5,1) %, на четыре – (4,6±3,7) % штаммов. Отмечен рост у (2,24±1,6) % культур, взаимодействующих только с S-антисывороткой на один крест и при взаимодействии культур с S-, R- и L-сыворотками в (17,97±0,2) % случаях. Штаммы, взаимодействующие с S-бруцеллезной сывороткой на два и более

креста, на испытуемых средах не росли.

Таким образом, сконструированные питательные среды обеспечивают высокую скорость и интенсивный рост экспериментальных и эпизоотических L-трансформантов бруцелл, полностью препятствуют росту бруцелл в S-форме, при этом более интенсивный рост отмечен на питательной среде из основы гидролизата сороги.

Апробирование сконструированных питательных сред проводили при экспериментальном бруцеллезе у 60 морских свинок, которых заражали бруцеллами в S-, L-формах и их смесью в дозах:  $10^9$ ,  $2 \cdot 10^{10}$  и  $4 \cdot 10^{10}$  м.к./мл. Животных хлороформировали на 1, 2, 7, 14 и 30-е сутки и проводили высеивание из лимфатических узлов, селезенки и крови. Наибольший индекс инфицированности (18) выделенных культур бруцелл в L-форме наблюдался на 14-е сутки после заражения. На среде из основы гидролизата сороги рост появился на 5-е, а на печеночной среде на 13-е сутки. S-варианты бруцелл изолированы через 30 сут после заражения S- и смесью S- и L-форм только на эритроцит-агаре (контроль), на сконструированных питательных средах роста не отмечено.

При бактериологической диагностике материала от больных хроническим бруцеллезом людей изолированы две гемокультуры, которые были аналогичны бруцеллам в L-форме по культурально-морфологическим, тинкториальным свойствам, результатам фазово-контрастного микроскопирования, серологического исследования и ПЦР.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что предлагаемые питательные среды на основе гидролизата сороги [4] и печеночного настоя [5] для выделения, культивирования и накопления бруцелл в L-форме обладают более высокой чувствительностью и селективностью по сравнению со средой, рекомендуемой ранее [8].

Таким образом, питательные среды для выделения, культивирования и накопления бруцелл в L-форме, приготовленные на сухих основах печеночного настоя и гидролизата сороги, обладают высокой чувствительностью, полностью ингибируют рост бруцелл в S-форме и могут быть использованы для бактериологической диагностики бруцеллеза, обусловленного возбудителем в L-форме. Разработанные питательные среды не нуждаются в корректировке pH, не требуют фильтрации и автоклавирования, удобны при транспортировке, что позволяет использовать их как в стационарных, так и полевых условиях. Наиболее эффективной для культивирования L-форм бруцелл является питательная среда на основе печеночного настоя, а для выделения и накопления – на основе гидролизата сороги.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безопасность работ с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). СП 1.3.1285-03. М.; 2003. 82 с.
2. Зыкин Л.Ф., Васильев Д.А. L-формы возбудителей зооантропонозов. Ульяновск; 2000. 68 с.
3. Косилов И.А., Аракелян П.К., Димов С.К. и др. Бруцеллез сельскохозяйственных животных. Новосибирск; 1999. 343 с.

4. Михайлов Л.М., Маевский М.П., Кузнецов В.И., Калиновский А.И., Татарникова О.Г. Питательная среда для выделения и культивирования L-форм бруцелл. Патент 2415918 РФ, опубл. 10.04.2011. Бюл. № 10.

5. Михайлов Л.М., Калиновский А.И., Андреевская Н.М., Голубинский Е.П., Михайлова В.А., Репина Л.П. и др. Способ получения L-субкультур штамма *Brucella abortus* И-206. Патент 2263142 РФ, опубл. 27.10.2005. Бюл. № 30.

6. Михайлов Л.М., Калиновский А.И., Репина Л.П. и др. Эпидемиологическое и эпизоотологическое значение измененных форм бруцелл. Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2002; 3:49–53.

7. Ощепков В.Г., Копейкин И.Г., Степанов Е.М. и др. L-трансформация *B. ovis* на искусственных питательных средах и в организме овец. В кн.: Диагностика и профилактика инфекционных и инвазивных заболеваний сельскохозяйственных животных. Омск; 1986. С. 21–8.

8. Профилактика инфекционных болезней. Инфекции общие для человека и животных. Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза. МУ 3.1.7.1189-03. М.; 2003. 38 с.

9. Толмачева Т.А., Кац Л.Н. Биологические свойства и ультраструктура бруцелл в процессе L-трансформации и реверсии. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1977; 1:90–3.

10. Триленко П.А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных. Л.; 1976. 279 с.

11. Nelson E.L., Pickett M.J. The cover of *Brucella* and their relation to *Brucella* phage. J. Infect. Disease. 1951; 8(3):226–32.

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

1. [Safety of work with microorganisms of I–II pathogenicity (danger) groups. SR 1.3.1285-03]. М.; 2003. 82 p.

2. Zykin L.F., Vasil'ev D.A. [L-Forms of Zoonoses Agents]. Ul'yanovsk; 2000. 68 p.

3. Kosilov I.A., Arakelyan P.K., Dimov S.K. et al. [Brucellosis of Agricultural Animals]. Novosibirsk. 1999. 343 p.

4. Mikhailov L.M., Maevsky M.P., Kuznetsov V.I., Kalinovsky A.I., Tatarnikova O.G. [Nutrient media for L-form *Brucella* isolation and cultiva-

tion]. RF Patent 2263142.

5. Mikhailov L.M., Kalinovsky A.I., Andreevskaya N.M., Golubinsky E.P., Mikhailova V.A., Repina L.P. et al. [Method for obtaining *Brucella abortus* strain I-206 L-subcultures]. RF Patent 2263142.

6. Mikhailov L.M., Kalinovsky A.I., Repina L.P. et al. [Epidemiological and epizootiological significance of L-form *Brucella*]. Bul. RAMS. 2002; 3:49–53.

7. Oshchepkov V.G., Kopeikin I.G., Stepanov E.M. et al. [L-transformation of *B. ovis* on artificial nutrient media in the organism of sheep]. In: [Diagnostics and Prophylaxis of Infectious and Invasive Diseases of Agricultural Animals]. Omsk; 1986. P. 21–8.

8. [Infectious diseases prophylaxis. Infections common for both humans and animals. Brucellosis prophylaxis and bacteriological diagnostics. MR 3.1.7.1189-03]. М.; 2003. 38 p.

9. Tolmacheva T.A., Kats L.N. [Biological properties and ultrastructure of brucella in the process of L-transformation and reversion]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1977; 1:90–3.

10. Trilenko P.A. [Brucellosis of Agricultural Animals]. L.; 1976. 279.

**Authors:**

Mikhailov L.M., Kalinovsky A.I., Barannikova N.L., Kuznetsov V.I., Atlas A.G., Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Tatarnikova O.G., Balakhonov S.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russia. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Gordienko L.N., Kulikova E.V. Russian Research Institute of Animal Brucellosis and Tuberculosis of RAAS, Omsk

**Об авторах:**

Михайлов Л.М., Калиновский А.И., Баранникова Н.Л., Кузнецов В.И., Атлас А.Г., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Татарникова О.Г., Балахонов С.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Гордиенко Л.Н., Куликова Е.В. Всероссийский научно-исследовательский институт бруцеллеза и туберкулеза животных Российской академии сельскохозяйственных наук. Омск.

Поступила 13.01.12.

**И.Н.Шарова, Е.С.Казакова, И.Г.Карнаухов, Д.А.Щербаков, С.А.Щербакова, Л.В.Самойлова, А.В.Топорков, В.В.Кутырев**

**ПРИНЦИПЫ ОРГАНИЗАЦИИ И ПРОВЕДЕНИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ  
В МОБИЛЬНОЙ ЛАБОРАТОРИИ ИНДИКАЦИИ ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ  
ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ОСОБО ОПАСНЫХ  
И ДРУГИХ ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫХ ИНФЕКЦИЙ**

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

Определены оптимальная структура и основные принципы организации мобильной лаборатории индикации для осуществления эпизоотологического мониторинга особо опасных и других природно-очаговых инфекций, установлены требования к лаборатории, специалистам и организации исследований, что позволит нормативно закрепить порядок лабораторной диагностики в мобильной лаборатории при проведении эпизоотологического обследования природных очагов опасных инфекционных болезней.

*Ключевые слова:* мобильная лаборатория, индикация, бактериологический анализ, эпидемиологический надзор, эпизоотологический мониторинг, обеспечение биологической безопасности.

**I.N.Sharova, E.S.Kazakova, I.G.Karnaukhov, D.A.Shcherbakov, S.A.Shcherbakova, L.V.Samoylova, A.V.Toporkov, V.V.Kutyrev**

**Principles of Organization and Carrying out of Laboratory Diagnostics  
in the Mobile Indication Laboratory Used for Epizootiological Surveillance  
over Particularly Dangerous and Other Natural Foci Infections**

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

Determined are optimal structure and basic principles of organization of work in the mobile indication laboratory for carrying-out of epizootiological surveillance over particularly dangerous and other natural foci infections. Outlined are the requirements to the laboratory itself, to specialists, and organization of investigations too. All the measures mentioned above will allow to entrench the order of laboratory diagnostics conducted in the mobile laboratory in case of epizootiological surveillance over natural foci of particularly dangerous infectious diseases.

*Key words:* mobile laboratory, indication, bacteriological analysis, epidemiological control, epizootiological monitoring, biological safety control.

Одной из основных задач эпизоотологического мониторинга опасных инфекционных болезней бактериальной и вирусной этиологии является лабораторное исследование проб биологического материала и объектов окружающей среды, отобранных в ходе эпизоотологического обследования территории природного очага. Результаты этих исследований позволяют установить эпидемическую значимость возбудителя, циркулирующего на данной территории, определить границы эпизоотии, оценить интенсивность эпизоотического процесса и риск развития эпидемических осложнений, получить информацию, необходимую для прогнозирования эпизоотической активности очагов и принятия эффективных управленческих решений для проведения профилактических и противоэпидемических мероприятий [1, 4, 6].

Обеспечить необходимое качество лабораторной диагностики, а также соблюдение требований биологической безопасности при проведении исследований в полевых условиях при мониторинге природно-очаговых инфекционных болезней возможно благодаря использованию мобильной лаборатории, оснащенной современным диагностическим оборудованием и инженерно-техническими системами для безопасной работы с ПБА [7]. Однако разра-

ботка и внедрение новых технологий лабораторных исследований, средств и методов защиты персонала и окружающей среды требуют совершенствования нормативно-методического обеспечения лабораторной диагностики, в том числе и для лабораторий, размещенных на транспортных средствах.

Лаборатории, выполняющие диагностические исследования при мониторинге природно-очаговых инфекций, входят в единую систему диагностики опасных инфекционных болезней в структуре органов и учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и других ведомств, осуществляющих эпидемиологический надзор. В целях совершенствования организации лабораторного обеспечения эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями, назрела необходимость стандартизации лабораторной диагностики с учетом международных стандартов ИСО, ИСО/МЭК, определяющих требования к диагностическим лабораториям и введенных в Российской Федерации в качестве ГОСТ Р.

Исходя из этого, определены требования к мобильной лаборатории индикации для осуществления эпизоотологического мониторинга особо опасных и других природно-очаговых инфекций, которые

отвечают общим требованиям к компетентности лабораторий, осуществляющих исследования и испытания, в соответствии со стандартом ИСО/МЭК 17025 ГОСТР – это наличие разрешительных и нормативно-методических документов, требования к специалистам и персоналу, участвующим в выполнении исследований, их подготовке, к организации работ, ведению документации.

Обязательным требованием стандарта ИСО 9001:2000 является обеспечение внутреннего контроля качества лабораторной диагностики. В мобильной лаборатории функционирование системы управления качеством реализуется через ряд процедур включающих: проведение первичной и периодической аттестации аналитического оборудования и поверки средств измерения; контроль качества питательных сред, диагностических препаратов и дезинфицирующих средств; контроль работы бактерицидных облучателей, оборудования для хранения, стерилизации и деструкции объектов и средств, используемых в мобильной лаборатории.

Организация мобильной лаборатории на базе транспортного средства обуславливает необходимость четкого обоснования структуры лаборатории и ее функциональных возможностей. В настоящее время при выборе тактики эпизоотологического обследования учитываются результаты эпидемиологического районирования территории, эпизоотологическая дифференциация природного очага, а также фаза эпизоотического цикла, в которой находится очаг, что определяет приемы, сроки, плотность и последовательность эпизоотологического обследования [2, 3, 5]. Исходя из этого, требует дифференцированного подхода и тактика лабораторного исследования. Методы и объемы лабораторной диагностики при мониторинге территорий, где наиболее вероятно обнаружение возбудителя, будут отличаться от тех, что используются при проведении рекогносцировочного обследования. Этот принцип был основополагающим при определении структурной организации мобильной лаборатории.

Лаборатория индикации для осуществления эпизоотологического мониторинга особо опасных и других природно-очаговых инфекций представлена двумя автономными модулями: блоком индикации и бактериологическим блоком, организованными на базовом шасси автомобиля повышенной проходимости и трехосного прицепа. Размещение блока индикации на базовом шасси автомобиля обусловлено возможностью его использования самостоятельно, например, при проведении исследований по определению границ эпизоотического участка, обследовании территорий, где складывается ситуация, характерная для начала эпизоотического процесса, или мониторинге инфекционных болезней вирусной этиологии, т.е. в случаях, когда более информативными являются методы индикации, а выделение возбудителя маловероятно, затруднено или невозможно. Блок оборудован необходимыми приборами и рабочими местами для

разбора материала, вскрытия животных, энтомологических работ, постановки ПЦР, ИФА, МФА и учета результатов исследований. В этом же блоке выделено помещение для деструкции инфицированных объектов, что позволяет на месте проводить обеззараживание материала и обеспечивать необходимый уровень безопасности для персонала, населения и окружающей среды.

Основная задача, решаемая в бактериологическом блоке, – выделение и изучение свойств культур возбудителей природно-очаговых инфекционных болезней. Его использование перспективно при обследовании территории, где наиболее вероятно обнаружение зараженных носителей, переносчиков или объектов окружающей среды. Блок оборудован рабочими местами для проведения бактериологических исследований. Идентификацию возбудителя методами ПЦР, ИФА и МФА выполняют в блоке индикации, поэтому в ходе обследования эпидемически значимых участков природного очага при осуществлении лабораторной диагностики обязательным является использование обоих модулей, что определило размещение бактериологического блока на базе прицепа.

Для проведения подготовительных работ, необходимых при бактериологических исследованиях, в бактериологическом блоке предусмотрено специальное помещение, оборудованное автоматическим модулем для розлива питательных сред, паровым стерилизатором и сухожаровым шкафом для стерилизации.

Структурная организация мобильной лаборатории, ее материально-техническое оснащение позволили обосновать номенклатуру исследований, определить порядок организации мобильной лаборатории и обеспечить противоэпидемический режим работы, который должен соответствовать требованиям действующих санитарно-эпидемиологических правил, регламентирующих работу с микроорганизмами I–IV групп патогенности. Для безопасной работы с ПБА мобильная лаборатория оборудована автономными системами жизнеобеспечения (энергоснабжения, освещения, водоснабжения, отопления и кондиционирования), вентиляции, снабженной фильтрами тонкой очистки, аварийной сигнализации. Лаборатория разделена на функциональные отсеки, имеет санпропускник с душем, оснащена боксами биологической безопасности II класса, бактерицидными лампами, средствами индивидуальной защиты. В мобильной лаборатории предусмотрена деструкция объектов, содержащих ПБА, и твердых отходов автоклавированием. Для устранения последствий аварий при работе с материалом, подозрительным на зараженность ПБА I–II групп патогенности, в каждом модуле имеются: защитная одежда, гидропульт, запас дезинфицирующих средств, аварийная аптечка.

Таким образом, исходя из задач, решаемых в ходе эпизоотологического обследования, определены оптимальная структура и основные принципы организации мобильной лаборатории индикации для осу-

ществления эпизоотологического мониторинга особо опасных и других природно-очаговых инфекций, в соответствии с ГОСТ и нормативно-методическими документами, регламентирующими работу с микроорганизмами I–IV групп патогенности, установлены требования к лаборатории, специалистам и организации исследований, что позволит нормативно закрепить порядок лабораторной диагностики в мобильной лаборатории при проведении эпизоотологического обследования природных очагов опасных инфекционных болезней.

Работа выполнена по государственному контракту № 71-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. *Иннокентьева Т.И., Попков А.Ф., Вержущий Д.Б., Базанова Л.П., Вершинин Е.А., Корзун В.М.* и др. Совершенствование эпизоотологического мониторинга в природных очагах чумы Сибири. *Пробл. особо опасных инф.* 2002; 1(83):52–8.
2. *Кузнецов А.А., Кутырев В.В., Матросов А.Н., Топорков В.П.* Совершенствование мониторинга за природными очагами чумы на основе анализа эколого-эпизоотологических закономерностей и функционирования. *Пробл. особо опасных инф.* 2004; 2(88):12–6.
3. *Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Осипов В.П., Князева Т.В., Поршаков А.М., Попов Н.В.* и др. 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.
4. *Кутырев В.В., Пакскина Н.Д., Щербакова С.А.* Перспективы совершенствования лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней. *Дез. дело.* 2009; 2:36–7.
5. *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.* Алматы, 2001; 3:178–81.
6. *Онищенко Г.Г., Кузькин Б.П., Кутырев В.В., Щербакова С.А., Пакскина Н.Д., Топорков А.В.* и др. Актуальные направления совершенствования лабораторной диагностики особо опас-

ных инфекционных болезней. *Пробл. особо опасных инф.* 2009; 1(99):40–1.

7. *Шарова И.Н., Карнаухова И.Г., Казакова Е.С., Щербакова С.А., Пчелинцева М.В., Чекашов В.Н.* и др. Разработка мобильной лаборатории индикации для осуществления эпизоотологического мониторинга природно-очаговых и других опасных инфекционных болезней. *Пробл. особо опасных инф.* 2009; 4(102):45–8.

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

1. *Innokent'eva T.I., Popkov A.F., Verzhutsky D.B., Bazanova L.P., Vershinin E.A., Korzun V.M. et al.* [Improvement of epizootological monitoring in Siberian natural plague foci]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2002; (83):52–8.
2. *Kuznetsov A.A., Kutyrev V.V., Matrosov A.N., Toporkov V.P.* [Improvement of monitoring of natural plague foci based on the analysis of ecologic and epizootiological regularities of their functioning]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2004; (88):12–6.
3. *Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Osipov V.P., Knyazeva T.V., Porshakov A.M., Popov N.V., Kouklev E.V., Scherbakova S.A., Toporkov V.P.* [Principles of management of the epizootiological monitoring of combined natural foci of plague and other dangerous infectious diseases in the Lower-Volga region]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2004; (102):17–20.
4. *Kutyrev V.V., Paksina N.D., Shcherbakova S.A.* [Prospective of improvement of laboratory diagnostics in case of particularly dangerous infectious diseases]. *Dez. Delo.* 2009; 2:36–7.
5. *Matrosov A.N., Kuznetsov A.A., Popov N.V., Udobikov A.I., Grigor'eva G.V.* [Epizootic activity and epizootiological zoning of natural plague foci in the territory of the Russian Federation]. *Karantin. Zoonoz. Infek. v Kazakhstane.* Almaty, 2001; 3:178–81.
6. *Onischenko G.G., Kouzkin B.P., Kutyrev V.V., Scherbakova S.A., Paksina N.D., Toporkov A.V.* [Current trends of perfection of laboratory diagnostics of particularly dangerous infectious diseases]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2009; (99):40–1.
7. *Sharova I.N., Karnaukhov I.G., Kazakova E.S., Scherbakov D.A., Pchelintseva M.V., Chekashov V.N., Porshakov A.M., Glazkov A.N., Scherbakova S.A., Toporkov A.V., Kutyrev V.V.* [Development of mobile indication laboratory for carrying out the epizootological monitoring of natural-focal and other dangerous infectious diseases]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2009; (102):45–8.

#### Authors:

*Sharova I.N., Kazakova E.S., Karnaukhov I.G., Shcherbakov D.A., Shcherbakova S.A., Samoylova L.V., Toporkov A.V., Kutyrev V.V.* Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrap@microbe.ru

#### Об авторах:

*Шарова И.Н., Казакова Е.С., Карнаухова И.Г., Щербаков Д.А., Щербакова С.А., Самойлова Л.В., Топорков А.В., Кутырев В.В.* Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Поступила 09.11.11.

УДК 616.981.42:616-07

О.И.Коготкова, А.А.Зуенко, И.В.Жарникова, Т.М.Гридина, П.Б.Новаков, Л.В.Ляпустина,  
Г.И.Лямкин, С.В.Вилинская, А.Н.Куличенко

**ВАЛИДАЦИЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ПРОИЗВОДСТВА  
ДИАГНОСТИКУМА БРУЦЕЛЛЕЗНОГО ЖИДКОГО ДЛЯ РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ,  
СУСПЕНЗИИ ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЦЕЛЕЙ**

*ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь*

Представлены результаты по валидации технологического процесса производства диагностикума бруцеллезного.

*Ключевые слова:* валидация, технологический процесс.

O.I.Kogotkova, A.A.Zuenko, I.V.Zharnikova, T.M.Gridina, P.B.Novakov, L.V.Lyapustina, G.I.Lyamkin,  
S.V.Vilinskaya, A.N.Kulichenko

**Validation of Technological Process of Production of Liquid Brucellosis Diagnosticum  
for Agglutination Reaction, Suspension for Diagnostic Purposes**

*Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol*

Presented are the results of validation of technological process of production of brucellosis diagnosticum.

*Key words:* validation, technological process.

Сложная эпидемиологическая обстановка по бруцеллезу, сложившаяся в настоящее время на территории российской Федерации, существующая тенденция к увеличению заболеваемости данной инфекцией среди людей обуславливает постоянную потребность учреждений санитарно-эпидемиологического надзора и практического здравоохранения в медицинских иммунобиологических препаратах (МИБП) для диагностики бруцеллеза. Производство качественных МИБП является одним из важных условий диагностики и лечения особо опасных инфекций. Для серологической диагностики бруцеллеза широко используют диагностикум бруцеллезный жидкий для реакции агглютинации, который представляет собой убитую взвесь штамма *Brucella abortus* ВА 19 в 12 % растворе натрия хлорида, содержащую фенол, бриллиантовый зеленый и генцианвиолет.

Одним из элементов системы обеспечения качества при производстве МИБП является валидация (аттестация) технологических процессов – документальное подтверждение соответствия оборудования условиям производства, технологического процесса, готового продукта и т.п., действующему регламенту и/или требованиям нормативной документации, доказывающее, что процесс, действительно приводит к ожидаемым результатам [2, 3].

Целью настоящей работы явилось проведение ретроспективной валидации технологического процесса производства диагностикума бруцеллезного жидкого для реакции агглютинации, суспензии для диагностических целей.

Проведена валидация технологического про-

цесса производства семи серий диагностикума бруцеллезного, выпущенных в 2010 г. и изготовленных из производственного штамма *B. abortus* ВА 19. Производство препарата проводили согласно требованиям промышленного регламента (ПР 01897080-03-09) и технических условий (ТУ 9388-001-01897080-2007).

Валидация технологического процесса проведена на примере критических биотехнологических подпроцессов: выращивание производственного штамма *B. abortus* 19 ВА, обеззараживание бакмассы, контроль общей и специфической стерильности бакмассы, приготовление взвеси бакмассы с 0,5 % фенолом [3].

Валидировали следующие технологические параметры: температуру инкубации производственного штамма, концентрацию взвеси бакмассы, температуру обеззараживания бакмассы. Анализ технологических параметров проводили по данным маршрутных карт.

Критериями валидации рассматриваемых параметров служили повторяемость и воспроизводимость. Параметры биотехнологических подпроцессов характеризовали по значению среднего арифметического ( $X_{cp}$ ), стандартного отклонения ( $S_p$ ) и среднего арифметического стандартного отклонения повторяемости ( $S_{гcp}$ ), различия в показателях считали достоверными при уровне статистической значимости различий 95 % ( $p < 0,05$ ) [1, 2].

Нами разработан алгоритм валидации биотехнологии получения МИБП, включающий разработку программы валидации; валидацию и поверку техно-

логического оборудования; проведение самой валидации; регистрацию фактических данных; статистический анализ; оформление протокола и заключения по результатам проведенной валидации.

Анализ технологических подпроцессов, в которых валидируемым параметром является температура, показал, что среднее арифметическое стандартное отклонение повторяемости при валидации подпроцессов выращивания производственного штамма *B. abortus* 19 ВА, обеззараживания бакмассы и контроля общей и специфической стерильности статистически достоверно меньше допустимого интервала разброса значений, предусмотренного промышленным регламентом (ПР). Различия между показателями стандартного отклонения повторяемости для верхней, средней и нижней границы значений температуры статистически недостоверны ( $p < 0,05$ ), что позволяет говорить о повторяемости и воспроизводимости данных подпроцессов.

Среднее арифметическое стандартное отклонение повторяемости при валидации получения взвеси бакмассы, где валидируемым параметром является концентрация, было меньше допустимого интервала разброса значений, предусмотренных ПР. Различия между показателями стандартного отклонения повторяемости для верхней, средней и нижней границы значений концентрации взвеси бакмассы статистически недостоверны ( $p < 0,05$ ), что позволяет говорить о повторяемости и воспроизводимости данного подпроцесса.

Таким образом, разработанный алгоритм валидации технологического процесса производства МИБП свидетельствует об усовершенствовании системы менеджмента качества и стандартизации контроля

качества их производства. Полученные результаты валидации критических подпроцессов производства семи серий диагностикума бруцеллезного свидетельствуют о том, что биотехнологический процесс стабилен, соответствует требованиям действующей нормативной документации. Провалидированные биотехнологические параметры повторяемы и воспроизводимы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. 180 с.
2. Валидация химических и физико-химических показателей качества МИБП: порядок проведения и представление результатов». МУ 3.3.2.1886-04. М.; 2004.
3. Надлежащая практика производства медицинских иммунобиологических препаратов. СП 3.3.2.1288-03. М.; 2003.

#### 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. [Validation of chemical and physico-chemical quality parameters of MIBP: order of carrying out and presenting of the results]. MR 3.3.2.1886-04. M.; 2004.
3. [Good manufacturing practice of medical immunobiological preparations production]. SR 3.3.2.1288-03. M.; 2003.

#### Authors:

Kogotkova O.I., Zuenko A.A., Zharnikova I.V., Gridina T.M., Novakov P.B., Lyapustina L.V., Lyamkin G.I., Vilinskaya S.V., 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., Зуенко А.А., Жарникова И.В., Гридина Т.М., Новаков П.Б., Ляпустина Л.В., Лямкин Г.И., Вилнская С.В., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 15.03.12.

Т.В.Теплякова, Л.Е.Булычев, Т.А.Косогова, Ж.Б.Ибрагимова, И.А.Юрганова, А.С.Кабанов,  
Л.И.Пучкова, Н.И.Бормотов, А.В.Бардашева

## ПРОТИВОВИРУСНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ИЗ БАЗИДИАЛЬНЫХ ГРИБОВ В ОТНОШЕНИИ ОРТОПОКСВИРУСОВ

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

Проведена оценка водных экстрактов из базидиальных грибов в клеточной культуре Vero на вирусах натуральной оспы и осповакцины. Вируснейтрализующий эффект проявили *Inonotus obliquus* (чага), *Ganoderma applanatum* (плоский трутовик), *Fomitopsis officinalis* (лиственничный трутовик).

*Ключевые слова:* базидиальные грибы, водные экстракты, вирусы натуральной оспы и осповакцины, вируснейтрализующий эффект.

T.V.Teplyakova, L.E.Bulychev, T.A.Kosogova, Zh.B.Ibragimova, I.A.Yurganova, A.S.Kabanov, L.I.Puchkova,  
N.I.Bormotov, A.V.Bardasheva

## Antiviral Activity of Extracts from Basidiomycetes for Orthopoxviruses

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

Carried out was evaluation of the effect of water extracts from basidiomycetes in Vero cell culture on variola virus, and vaccinia virus. Antiviral effect demonstrated *Inonotus obliquus* (Chaga), befungin and melanin from chaga, *Ganoderma applanatum* (Artist's Bracket), *Fomitopsis officinalis* (Larch Fungus).

*Key words:* variola virus and vaccinia virus, the aqueous extracts of basidiomycetes, befungin, melanin, antiviral effect.

Семейство *Poxviridae* включает в себя большую группу вирусов, в том числе патогенных для человека: натуральной оспы, оспы обезьян, оспы коров, экстремелии и др. Поиск противовирусных препаратов против вируса натуральной оспы и других ортопоксвирусов является актуальной задачей.

Базидиальные грибы, многие из которых являются съедобными, содержат широкий спектр различных биологически активных соединений (БАВ), проявляющих противоопухолевую, антибластическую активность, цитостатическое действие и противовирусный эффект.

Судя по литературным данным, проведены многочисленные исследования по изучению противовирусных свойств базидиальных грибов в отношении поксвирусов. В США несколько штаммов лиственничного трутовика *Fomitopsis officinalis* были выделены в культуру, и был оценен ингибирующий эффект экстрактов из биомассы гриба на поксвирусах в культуре клеток. Один из штаммов *F. officinalis* I показал высокий антивирусный эффект против вируса коров (*cowpox virus*), а другой – *F. officinalis* IV против вируса осповакцины (*vaccinia virus*) [7]. Композиции из грибов родов *Fomitopsis*, *Piptoporus*, *Ganoderma*, как отмечает автор патента [8], могут быть использованы в профилактике и лечении против разных вирусов, включая поксвирусы.

Задачей настоящего исследования была оценка противовирусной активности водных экстрактов и некоторых препаратов из базидиальных грибов на вирусах осповакцины и натуральной оспы. В качестве основных объектов исследований были определены следующие виды грибов: *Fomitopsis officinalis*,

*Inonotus obliquus*, *Ganoderma applanatum*.

Для изучения противовирусной активности в отношении вируса осповакцины были использованы 2 вида лекарственных грибов, широко применяемых в народной и официальной медицине: лиственничный трутовик *Fomitopsis officinalis* и березовый гриб – чага *Inonotus obliquus*.

Образцы из плодового тела лиственничного трутовика (09-19) и измельченного склероция чаги (08-39) были приготовлены путем выдерживания водных суспензий при 50 °С в термостате в течение 2–3 сут соответственно. Использовали также 5 % водный раствор аптечного препарата из чаги Бефунгин (09-33). Из чаги был получен меланин (08-48) по методике О.В.Королевой и соавт. [3] путем щелочного гидролиза при 0,5 атм. в течение 1 ч с последующим осаждением концентрированной HCl.

Для оценки противовирусной активности грибов в отношении вируса натуральной оспы было приготовлено 7 образцов из трех видов грибов. Образец из чаги (*I. obliquus*) 09-26/1 получен по методике, использованной для образца 08-39. Образец из Бефунгина 09-33/1 готовили по той же методике, что и для вируса осповакцины 09-33.

Из плодового тела гриба *Ganoderma applanatum* (трутовик плоский) приготовлены 2 образца, которые различались способом приготовления. Один получали в виде водного экстракта путем нагревания на водяной бане (09-11/4), другой – смешиванием водного экстракта с этанолом (96 %) и выдерживанием в холодильнике с целью получения суммарных полисахаридов (09-11/4 – полисахарид).

Из гриба *F. officinalis* получено 2 образца: 10-

06/1 – водный экстракт, а 09-19/3 – полисахарид. Образец 09-96 представлял собой готовый препарат гумитон (5 % раствор), содержащий 3,45 % гуминовых кислот. Этот препарат был взят в связи с тем, что чага в своем составе содержит гуминовые кислоты.

Вирусы осповакцины (ВОВ) штамм Л-ИВП и натуральной оспы (ВНО) штамм Индия-3а были получены из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и работали на культуре клеток Vero с титром  $5 \cdot 10^5$  и  $10^5$  БОЕ/мл соответственно.

Эксперименты по противовирусной активности проводили в соответствии с принятыми методиками по профилактической и лечебной схемам. В ходе работы определяли ингибирующую 50 % концентрацию образца ( $IC_{50}$ ), при которой 50 % клеточного монослоя остается защищенным от действия вируса, а также токсическую 50 % концентрацию ( $TC_{50}$ ), при которой 50 % клеточного монослоя повреждается за счет токсического действия самого препарата.  $TC_{50}$  и  $IC_{50}$  были вычислены как средние величины из трех значений, полученных при проведении эксперимента на одном планшете. Индекс селективности (SI) вычислен как отношение  $TC_{50}$  к  $IC_{50}$  [6]. Образцы с  $SI > 10$  считали высокоактивными, а образцы с  $SI < 2$  не активными, образцы с SI между 2 и 10 – среднеактивными.

По данным проведенного исследования, можно сделать заключение, что наибольшую противовирусную активность против вируса осповакцины оказывает образец 08-48 (меланин), полученный из *Inonotus obliquus* (индекс селективности  $SI=12,5$ ). Определенным противовирусным потенциалом обладает препарат 09-33 (Бефунгин) из *Inonotus obliquus* ( $SI=2$ ) и образец 09-19 (экстракт) из *Fomitopsis officinalis* ( $SI=2$ ).

Наибольшей противовирусной активностью в отношении вируса натуральной оспы обладают образцы, полученные из *I. obliquus* 09-26/1 ( $SI > 9$ ), 09-33/1 ( $SI=7,4$ ) и из *F. officinalis* 10-06/1 ( $SI=4$ ). Эффективность образцов возрастает при применении их по схеме профилактики – образец начинает воздействовать на клетки Vero за сутки до внесения вируса. В этом случае индекс селективности в сравнении со случаем, когда вирус и препарат вносили одновременно, увеличивается: для препарата 09-33/1 – с 7,4 до 29,8. Суммарные полисахариды из грибов *F. officinalis* и *G. applanatum* дали более низкие показатели по сравнению с водными экстрактами тех же грибов. Это свидетельствует о том, что вируснейтрализующий эффект в отношении данного вируса оказывает более сложный комплекс веществ, включающий и полисахариды.

Поскольку гуминовые кислоты входят в сложный состав компонентов чаги, противовирусный эффект препарата 09-96 (гумитон), полученный нами, не вызывает удивления и указывает на необходимость его дальнейшего изучения. Бефунгин, представляющий готовый аптечный препарат из чаги, проявил противовирусный эффект в отношении обоих тестируемых

вирусов. Индекс селективности по противовирусной схеме для вируса осповакцины составил 2, для вируса натуральной оспы – 7.

На основании полученных данных можно предположить, что образцы из грибов *I. obliquus* и *F. officinalis*, показавшие противовирусные свойства в отношении двух резко отличающихся по патогенности вирусов из семейства *Poxviridae*: вируса натуральной оспы и вируса осповакцины, возможно, будут эффективны и против других ортопоксвирусов: вируса оспы обезьян, экстромелии, вируса оспы коров и других.

Особый интерес для дальнейших исследований представляет гриб *I. obliquus*, чага, который содержит широкий спектр различных БАВ, основным компонентом является хромоген-полифенолоксикарбонный комплекс (ПФК), близкий по физико-химическим характеристикам к гуминовым кислотам (ГК). В наших исследованиях экстракты из чаги и меланин, полученный из этого гриба, проявляют высокий противовирусный эффект в отношении таких социально значимых вирусов, как вирус простого герпеса 2-го типа, Западного Нила, гриппа, ВИЧ-1 [1, 2, 4, 5].

Полученные данные также подтверждают имеющиеся сведения о том, что препараты из листовничного трутовика проявляют ингибирующий эффект на вирус осповакцины [7]. Это свидетельствует о потенциальной генетической способности грибов вида *F. officinalis* воздействовать на поксвирусы, и делает возможным осуществлять поиск эффективных штаммов против вирусов натуральной оспы в природных местообитаниях Сибири. В более детальном изучении нуждается, по нашему мнению, плоский трутовик *G. applanatum*, у которого все-таки обнаруживается небольшая эффективность. Штаммы этого вида в наших исследованиях проявляют вируснейтрализующий эффект в отношении разных вирусов. Возможно, при приготовлении экстрактов необходима более длительная термическая обработка биомассы из плодового тела гриба. Таким образом, базидиальные грибы *Inonotus obliquus* (чага), *Fomitopsis officinalis* (лиственничный трутовик), *Ganoderma applanatum* (плоский трутовик) являются перспективными продуцентами для дальнейшего изучения с целью разработки на их основе лекарственных препаратов против заболеваний, вызываемых вирусами осповакцины и натуральной оспы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гашикова Н.М., Теплякова Т.В., Проняева Т.Р., Пучкова Л.И., Косогова Т.А., Сергеев А.Н. Результаты исследований по выявлению анти-ВИЧ активности экстрактов из высших базидиальных грибов. Иммунопатол., аллергол., инфектол. 2009; 2:170–1.
2. Кабанов А.С., Косогова Т.А., Шишкина Л.Н., Теплякова Т.В., Скарнович М.О. Мазуркова Н.А. и др. Изучение противовирусной эффективности экстрактов, выделенных из базидиальных грибов, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* в отношении штаммов вируса гриппа разных субтипов. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2011; 1:40–3.
3. Королева О.В., Куликова Н.А., Алексеева Т.Н., Степанова Е.В., Давидчик В.Н., Беляева Е.Ю. и др. Получение меланина из

грибов. Прикладная биохим. и микробиол. 2007; 43(1):69–76.

4. Разумов И.А., Косогова Т.А., Казачинская Е.И., Пучкова Л.И., Щербакоева Н.С., Горбунова И.А. и др. Противовирусная активность водных экстрактов и полисахаридных фракций, полученных из мицелия и плодовых тел высших грибов. Антибиотики и химиотерапия. 2010; 55:9–10.

5. Теплякова Т.В., Гашишкова Н.М., Пучкова Л.И., Проняева Т.Р., Косогова Т.А. Ингибитор репродукции вируса иммунодефицита человека 1 типа. Патент РФ 2375073С1, опубл. 10.12.2009. Бюл. № 34.

6. Duraffour S., Snoeck R., de Vos R., van Den Oord J.J., Crance J.M., Garin D. et al. Activity of the anti-orthopoxvirus compound ST-246 against vaccinia, cowpox and camelpox viruses in cell monolayers and organotypic raft cultures. Antivir. Ther. 2007; 12(8):1205–16.

7. Stamets Paul E. Antipox Properties of *Fomitopsis officinalis* (Vill.: Fr.) Bondartsev et Singer (Agarikon) from the Pacific Northwest of North America. Int. J. Med. Mush. 2005; 7:495–506.

8. Stamets Paul. Antiviral activity from medicinal mushrooms. Patent Number: US2006171958 A1 20060803.

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

1. Gashnikova N.M., Teplyakova T.V., Pronyaeva T.R., Puchkova L.I., Kosogova T.A., Sergeev A.N. [The results of investigation of anti-HIV activity of extracts from higher basidiomycetes]. Immunopatol. Allergol. Infektol. 2009; 2:170–1.

2. Kabanov A.S., Kosogova T.A., Shishkina L.N., Teplyakova T.V., Skarnovich M.O., Mazurkova N.A. et al. [Study of antiviral activity of extracts

obtained from basidial fungi against influenza viruses of different subtypes in experiments *in vitro* and *in vivo*]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2011; 1:40–43.

3. Koroleva O.V., Kulikova N.A., Alekseeva T.N., Stepanova E.V., Davidchik V.N., Belyaeva E.Yu., Tsvetkova E.A. [A comparative characterization of fungal melanin and the humin-like substances synthesized by *Cerrena maxima* 0275]. Prikl. Biokhim. Mikrobiol. 2007; 43(1):69–76.

4. Razumov I.A., Kosogova T.A., Kazachinskaya E.I., Puchkova L.I., Shcherbakova N.S., Gorbunova I.A., Mikhailovskaya I.N., Loktev V.B., Teplyakova T.V. [Antiviral activity of aqueous extracts and polysaccharide fractions from mycelium and fruit bodies of higher fungi]. Antibiot. Khimioter. 2010; 55:9–10.

5. Teplyakova T.V., Gashnikova N.M., Puchkova L.I., Pronyaeva T.R., Kosogova T.A. [Inhibitor of reproduction of human immunodeficiency virus of the 1-st type]. RF Patent 2375073С1.

#### Authors:

Teplyakova T.V., Bulychev L.E., Kosogova T.A., Ibragimova Zh.B., Yurganova I.A., Kabanov A.S., Puchkova L.I., Bormotov N.I., Bardasheva A.V. State Research Centre of Virology and Biotechnology “Vector”. Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia. E-mail: vector@vector.nsc.ru

#### Об авторах:

Теплякова Т.В., Булычев Л.Е., Косогова Т.А., Ибрагимова Ж.Б., Юрганова И.А., Кабанов А.С., Пучкова Л.И., Бормотов Н.И., Бардашева А.В. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл, п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Поступила 12.09.11.

А.В.Фадеева, Г.А.Ерошенко, Н.Ю.Шавина, В.В.Кутырев

АНАЛИЗ SXT КОНСТИНА АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОГО ШТАММА *VIBRIO CHOLERAE* НЕО1/НЕО139 СЕРОГРУППЫ

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

В геноме антибиотикоустойчивого штамма *Vibrio cholerae* серогруппы O50, выделенного в России в 1974 г., выявлено наличие SXT конъюгативного транспозона (SXT констина). Анализ его структуры показал, что он не содержит генов устойчивости к антибиотикам – стрептомицину, сульфаметоксазолу, триметоприму, хлорамфениколу и канамицину и, по-видимому, относится к числу предшественников антибиотикорезистентных SXT констинов, получивших распространение в геномах эпидемических штаммов *V. cholerae* O139 в 1992 г.

**Ключевые слова:** возбудитель холеры, геном, устойчивость к антибиотикам.

A.V.Fadeeva, G.A.Eroshenko, N.Yu.Shavina, V.V.Kutyrev

Analysis of the SXT Constin of Antibiotic-Sensitive *Vibrio cholerae* Strain of Non-O1/ Non-O139 Serogroup

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

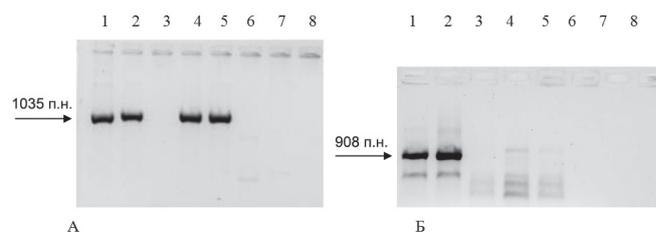
In the genome of antibiotic-sensitive *Vibrio cholerae* strain belonging to O50 serogroup, isolated in the territory of the Russian Federation in 1974, detected is the SXT conjugative trasposone – SXT constin. Analysis if its structure revealed that it does not contain genes of resistance to such antibiotics as streptomycin, sulfamethoxazole, trimethoprim, chloramphenicol, and kanamycin, being, probably, one of the predecessors of antibiotic-resistant SXT constins which spread out within the genomes of epidemic *Vibrio cholerae* O139 strains in 1992.

**Key words:** cholera agent, genome, antibiotic resistance.

SXT конъюгативные элементы, впервые выявленные в геноме вирулентных штаммов *Vibrio cholerae* O139 серогруппы, вызвавших большие эпидемии холеры в Юго-Восточной Азии в 1992 г., вносят значительный вклад в распространение генов антибиотикорезистентности среди штаммов возбудителя этой особо опасной инфекции. Большинство клинических штаммов O139 серогруппы, а также часть штаммов O1 серогруппы биовара эльтор содержат в геноме SXT элементы или констины (от англ. conjugative, self-transmissible, and integrating), маркером которых является ген *int<sub>SXT</sub>* интегразы, обеспечивающий интеграцию этих элементов в хромосому [2]. Установлено, что гены устойчивости к антибиотикам – сульфаметоксазолу (Su), триметоприму (Tm), хлорамфениколу (Cm), стрептомицину (Sm) у штаммов O139 серогруппы, как правило, внедрены в составе сложного транспозоноподобного элемента (17 т.п.н) в ген *rumB* оперона *rumAB* SXT констина. В то же время встречаются SXT транспозоны (подобные R931 с генами устойчивости к канамицину (Kp) из бактерии *Providencia retgerii*), у которых эта сложная транспозоноподобная структура отсутствует. Высказано предположение, что гены антибиотикоустойчивости не являются неотъемлемой частью SXT семейства констинов, которые, возможно, придают какое-то другое (пока неустановленное) селективное преимущество содержащей его бактерии [2].

Нами при анализе коллекции штаммов *V. cholerae* неO1/неO139 серогрупп, выделенных на территории Российской Федерации, был выявлен штамм

серогруппы O50, выделенный в Ростовской области в 1974 г., который в ПЦР давал положительный сигнал на наличие в его геноме гена *intSXT* – маркерного гена SXT констинов (рисунок, А). Проведенный предварительный анализ устойчивости штамма Р-8845 к ряду антибиотиков – Su (25–100 ед.), Tm (25), Cm (25), Sm (25), Kp (50), ампициллину Ap (50) и тетрациклину Tc (25) показал, что он чувствителен ко всем этим антибиотикам. Для подтверждения отсутствия в составе SXT констина штамма Р-8845 генов устойчивости к антибиотикам были использованы праймеры на гены *suII*, *dif18*, *strB*, *floR*, *npt*, сконструированные ранее [1, 2]. Ни с одной из этих пар праймеров в ПЦР не получено положительного сигнала, что свидетельствовало об отсутствии этих генов в составе SXT констина в штамме Р-8845 серогруппы O50 и объясняло отсутствие у него устойчивости к антибиотикам. Для подтверждения отсутствия сложного транспозоноподобного элемента с генами устойчи-

ПЦР детекция генов *int<sub>SXT</sub>* и *rumAB* у штаммов *V. cholerae*:

1–2 – Р8845 (серогруппа O50, Ростовская обл., 1974 г.),  
3 – Р4107 (O41, Ростовская обл., 1975 г.), 4 – AP1 (O139, Индия, 1992 г.),  
5 – SG24 (O139, Индия, 1992 г.), 6 – T23 (O1 эльтор, Индия, 1962 г.),  
7 – 4А (O1 эльтор, Индия, 1962 г.), 8 – отрицательный контроль

ности к антибиотикам были использованы праймеры LEFTF3/RUMA на ген *rumB* и межгенное пространство *rumA* [2]. В результате в ПЦР был получен положительный сигнал амплификации и образовывался амплификат размером 908 п.н., соответствовавший размерам интактного *rumAB* оперона, свидетельствовавший об отсутствии внедрения последовательности ДНК в этот участок SXT констина (рисунок, Б). У вирулентных штаммов O139 серогруппы *V. cholerae* AP1, SG24, устойчивых к стрептомицину, триметоприму, сульфаметоксазолу и содержащих гены *strB*, *dif18*, *suII*, амплификат при использовании праймеров на *rumAB* оперон не образовывался, что связано с внедрением в ген *rumB* этих штаммов протяженной транспозоноподобной последовательности с генами антибиотикоустойчивости.

Таким образом, нами впервые выявлен у штамма неO1/неO139 серогруппы – *V. cholerae* P-8845 серогруппы O50, выделенного на территории Российской Федерации в 1974 г., SXT конъюгативный элемент. В отличие от эпидемических штаммов O139 серогруппы и R931 элемента SXT констин штамма P-8845 не содержит генов устойчивости к антибиотикам Su, Tm, Cm, Sm, Kp, обычно входящих в состав этого семейства сложных конъюгативных транспозонов. По-видимому, SXT-подобный элемент, присутствующий в штамме P-8845, являет-

ся антибиотикочувствительным (*rumAB*<sup>+</sup>) предшественником SXT констин и может быть использован для изучения роли этих элементов в эволюции бактерий.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Анисимова Л.В., Шавина Н.Ю., Виноградова Н.А., Кутырев В.В. Антибиотикоустойчивые штаммы возбудителя чумы и разработка способа их детекции методом полимеразной цепной реакции. Пробл. особо опасных инф. 2011; 1(107):53–7.

2. Hochhut B., Lotfi Y., Mazel D., Faruque S.M., Woodgate R., Waldor M.K. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 constins. Antimicrob. Agents Chemother. 2001; 45:2991–3000.

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

1. Eroshenko G.A., Odinokov G.N., Anisimova L.V., Shavina N.Yu., Vinogradova N.A., Kutyrev V.V. [Antibiotic-resistant strains of plague agent and development of procedure for their detection by PCR method]. Probl. Osobo. Opasn. Infek. 2011; (107):53–7.

**Authors:**

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

**Об авторах:**

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

Поступила 09.07.12.

**К 60-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ВИТАЛИЯ ВАСИЛЬЕВИЧА ЗВЕРЕВА**

3 июня 2012 г. исполнилось 60 лет директору Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова Виталию Васильевичу Звереву, доктору биологических наук, профессору, академику РАМН.

В.В.Зверев является ведущим ученым-вирусологом и иммунологом, крупным специалистом в области вакцинологии и биотехнологии. Он – один из авторов первой национальной программы борьбы против ВИЧ-инфекции, при его участии создана, научно обоснована и внедрена система защиты населения России от новых биологических угроз. Под руководством В.В.Зверева разработано и внедрено в практику 12 диагностических и противовирусных препаратов, разрабатываются теоретические и прикладные аспекты создания нового класса вакцин – активаторов врожденного иммунитета. Он участвовал в выполнении приоритетного исследования по изучению генетических вариантов вируса краснухи, циркулирующих на территории России.

Многогранна научно-общественная деятельность Виталия Васильевича: он является академиком-секретарем Отделения профилактической медицины, членом Президиума РАМН, заместителем пред-



седателя правления Всероссийского научно-практического общества микробиологов, эпидемиологов и паразитологов, председателем экспертной комиссии «Проблемы СПИД», экспертом ВОЗ, главным редактором Журнала микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, членом редколлегий журналов «Вопросы вирусологии» и «Вакцинология», возглавляет кафедру микробиологии, вирусологии и иммунологии ММА им. И.М.Сеченова. Вклад В.В.Зверева в развитие медицинской науки и отечественного здравоохранения получил достойную оценку. Он дважды был награжден премией Правительства Российской Федерации в области науки и техники – за разработку и организацию производства новых высокоэффективных средств диагностики ВИЧ-инфекции и гепатитов А, В, С (1998 г.) и за разработку, научное обоснование и внедрение системы защиты населения Российской Федерации от новых биологических угроз (2006 г.).

*Редколлегия и редакционный совет научно-практического журнала «Проблемы особо опасных инфекций» поздравляют Виталия Васильевича Зверева с юбилеем и желают ему новых творческих успехов на благо отечественной науки и здравоохранения.*