

# 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 4(114)**

**декабрь · 2012**

**САРАТОВ**

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

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

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

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

*Журнал включен в Реферативный журнал и Базы данных ВИНИТИ. Сведения о журнале ежегодно публикуются в международной справочной системе по периодическим 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

ISSN 0370-1069



9 770370 106008 >

December 2012, Issue 114

## 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: <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. Декабрь 2012. Вып. 114, 1–100  
Редактор Е.С.Герасимова. Технический редактор Т.К.Меркулова. Перевод на английский Т.Б.Караваяевой, А.П.Рыжовой, А.Ю.Мощиной

Подписано в печать 07.12.12. Формат 60×88 1/8. Бумага мелованная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 12,25. Гарнитура Таймс. Заказ 1592  
Журнал отпечатан в ООО «ИППО/ЛТ-XXI век». 410012, Саратов, Б. Казачья, 79/85

## Обзоры

Карнаухов И.Г., Топорков В.П., Топорков А.В. О критериях отнесения инфекционных заболеваний к болезням, требующим проведения мероприятий по санитарной охране территории..... 5

Попов В.П., Орлов Д.С., Безсмертный В.Е. Эпизоотологическая и эпидемиологическая обстановка в природных очагах туляремии на территории Центрального Федерального округа Российской Федерации в 1992–2011 гг..... 10

## Эпидемиология, биобезопасность

Базанова Л.П., Никитин А.Я. Агрегированность чумного микроба в организме блох (Siphonaptera) с различной векторной способностью..... 15

Батурин А.А., Антонов В.А., Смелянский В.П., Жуков К.В., Чернобай В.Ф., Колякина Н.Н. Роль птиц как потенциальных резервуаров вируса Западного Нила на территории Российской Федерации..... 18

Дугаржапова З.Ф., Чеснокова М.В., Родзиковский А.В. Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по сибирской язве на территориях Российской Федерации, сопредельных с Монголией..... 22

Манин Е.А., Лямкин Г.И., Тихенко Н.И., Русанова Д.В., Антоненко А.Д., Брюханова Г.Д. Совершенствование эпидемиологического надзора за бруцеллезом с использованием ГИС-технологий..... 26

Никифоров А.К., Абрамова Е.Г., Еремин С.А., Ляпин М.Н. Оценка эффективности обеспечения биологической безопасности работ со штаммами фиксированного вируса бешенства при производстве антирабического иммуноглобулина..... 29

## Микробиология

Будыка Д.А., Бондаренко А.И., Фисун А.А., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф., Гостищева С.Е., Руднев С.М. Качественные показатели микробных клеток штамма *Yersinia pestis* EV в зависимости от их морфологических особенностей при разных температурных условиях биотехнологии приготовления препарата вакцины чумной..... 33

Коннов Н.П., Заднова С.П., Кузнецов О.С. Исследование ультраструктуры двух фенотипически различных клонов холерного вибриона методами трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии..... 36

Кульшань Т.А., Краснов Я.М., Лозовский Ю.В., Смирнова Н.И. Молекулярное типирование методом MLVA типичных и генетически измененных природных штаммов *Vibrio cholerae* биовара элтор..... 39

Мазрухо А.Б., Монахова Е.В., Дуванова О.В., Мишанкин Б.Н., Кругликов В.Д. Изучение генетической детерминированности твиназной активности холерных вибрионов..... 44

Одинок Г.Н., Никифоров К.А. Выявление новых вариативных ДНК локусов, отличающих штаммы средневекового биовара от штаммов других биоваров возбудителя чумы..... 47

Павлова А.И., Ерошенко Г.А., Одинок Г.Н., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Анализ генетической изменчивости штаммов *Yersinia pestis* средневекового биовара из природных очагов чумы Российской Федерации и Монголии..... 49

Пименов Е.В., Оборин В.А., Ивонин А.Г. Исследование механизмов взаимодействия бактерий вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ с эритроцитами человека..... 54

## Reviews

Karnaukhov I.G., Toporkov V.P., Toporkov A.V. Concerning Criteria for Assigning Infections to the Group of Diseases That Require Implementation of Measures for the Provision of Sanitary Protection of the Territories..... 5

Popov V.P., Orlov D.S., Bezsmertny V.E. Epizootiological and Epidemiological Situation in Tularemia Natural Foci in the Territory of the Central Federal District of the Russian Federation from 1992 to 2011..... 10

## Epidemiology, Biosafety

Bazanov L.P., Nikitin A.Ya. Plague Microbe Aggregation in the Organism of Fleas (Siphonaptera) with Different Vector Ability..... 15

Baturin A.A., Antonov V.A., Smelyansky V.P., Zhukov K.V., Chernobay V.F., Kolyakina N.N. The Role of Birds as Potential Reservoirs of West Nile Virus in the Territory of the Russian Federation..... 18

Dugarzhapova Z.F., Chesnokova M.V., Rodzikovsky A.V. Epizootiological and Epidemiological Situation on Anthrax in the Territories of Russia Bordering Mongolia..... 22

Manin E.A., Lyamkin G.I., Tikhenko N.I., Rusanova D.V., Antonenko A.D., Bryukhanova G.D. Improvement of the Epidemiological Surveillance over Brucellosis Using GIS-Technologies..... 26

Nikiforov A.K., Abramova E.G., Eremin S.A., Lyapin M.N. Evaluation of the Effectiveness as to the Provision of Biological Safety of Works with Fixed Rabies Virus in the Process of Anti-Rabies Immunoglobulin Manufacturing..... 29

## Microbiology

Budyka D.A., Bondarenko A.I., Fisun A.A., Abzaeva N.V., Ivanova G.F., Gostishcheva S.E., Rudnev S.M. Qualitative Indicators of Microbial Cells of *Yersinia pestis* EV Strain Depending on Their Morphological Traits in Different Temperature Conditions of Manufacturing of Plague Vaccine Preparation..... 33

Konnov N.P., Zadnova S.P., Kuznetsov O.S. Examination of the Ultrastructure of Two Phenotypically Different Clones of *V. cholerae* by Means of Transmission and Scanning Electron Microscopy..... 36

Kul'shan' T.A., Krasnov Ya.M., Lozovsky Yu.V., Smirnova N.I. Molecular MLVA Typing of Typical and Genetically Altered Natural Strains of *Vibrio cholerae* El Tor Biovar..... 39

Mazrukho A.B., Monakhova E.V., Duvanova O.V., Mishan'kin B.N., Kruglikov V.D. Analysis of Genetic Determination of *Vibrio cholerae* Tweenase Activity..... 44

Odinokov G.N., Nikiforov K.A. Detection of New Variable DNA Loci That Distinguish Medieval Biovar Strains of Plague Agent from the Strains of Other Biovars..... 47

Pavlova A.I., Eroshenko G.A., Odinkov G.N., Koukleva L.M., Shavina N.Yu., Krasnov Ya.M., Kutyrev V.V. Analysis of Genetic Variability of *Yersinia pestis* Strains (Medieval Biovar) Isolated in Natural Plague Foci of the Russian Federation and Mongolia..... 49

Pimenov E.V., Oborin V.A., Ivonin A.G. Investigation of Mechanisms of Interaction of *Yersinia pestis* EV NIEG Vaccine Strain Bacteria with Human Red Blood Cells..... 54

Савельев В.Н., Савельева И.В., Васильева О.В., Бабенышев Б.В., Ковалев Д.А., Грижебовский Г.М., Антоненко А.Д., Курбанов Ш.Х., Бутаев Т.М., Куличенко А.Н. Эволюция *Vibrio cholerae* eltor и обнаружение их генотипических вариантов на Кавказе .....

58

Шашкова А.В., Агафонов Д.А., Черкасов А.В., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Фенотипический и молекулярно-генетический анализ генетически измененного токсигенного штамма *Vibrio cholerae* 301 биовара эльтор, изолированного в 2011 году в России .....

61

## Иммунология, профилактика

Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Лобовикова О.А., Свинцов Р.А., Комиссаров А.В., Киреев М.Н., Никифоров А.К. Культуральный антиген в технологии получения антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади .....

65

Кругликов В.Д. Разработка критериев отбора пробиотических бактерий для расширения спектра доступных противохолерных средств .....

69

Фирстова В.В., Павлов В.М., Кравченко Т.Б., Зырина Е.В., Борзилов А.И., Дятлов И.А. Изменение эффекторной активности Т-лимфоцитов мышей, иммунизированных против туляремии, при стимуляции *in vitro* тулярином.....

73

Шмелькова Т.П., Ключева С.Н., Бугоркова С.А., Кравцов А.Л., Громова О.В., Волох О.А., Еремин С.А., Никифоров А.К., Шуковская Т.Н. Оценка иммунобиологических свойств О1 и О139 антигенов холерных вибрионов.....

77

## Диагностика

Волынкина А.С., Куличенко А.Н. Генетический мониторинг вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки на юге Европейской части России в 2011 г. ....

80

Грачиева О.В., Харченко Г.А., Рассказов Д.Н., Садретдинов Р.А. Диагностика микроциркуляторных нарушений у детей с инфекционной патологией.....

86

Найденова Е.В., Осина Н.А., Куклев В.Е., Ясечкин Ю.И., Бугоркова Т.В., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Щербак С.А., Кутырев В.В. Внедрение в практику новых препаратов для генной диагностики лихорадки денге и холеры .....

89

Саяпина Л.В., Абдрашитова А.С., Лобач Р.Н., Комратов А.В., Малакхаева А.Н., Ляшова О.Ю., Валова Т.В., Храмов М.В., Gefan N.G. Диагностическая эффективность иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих сибиреязвенных вегетативных адсорбированных по данным медицинских испытаний .....

92

## Информация

О XI заседании Координационного совета по проблемам санитарной охраны территорий государств-участников СНГ от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней (17 октября 2012 г., Саратов) .....

97

Резолюция XI Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ «Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера» (17 октября 2012 г., Российская Федерация, Саратов).....

98

О Межведомственном совещании по проблемам санитарно-эпидемиологической охраны территории Российской Федерации.....

99

Savel'ev V.N., Savel'eva I.V., Vasil'eva O.V., Babenyshev B.V., Kovalev D.A., Grizhebovsky G.M., Antonenko A.D., Kurbanov Sh.Kh., Butaev T.M., Kulichenko A.N. Evolution of *Vibrio cholerae* El Tor and Detection of Their Gene-Variants in the Caucasus

Shashkova A.V., Agafonov D.A., Cherkasov A.V., Zadnova S.P., Smirnova N.I. Phenotypic and Molecular-Genetic Analysis of Genetically Modified Toxigenic *Vibrio cholerae* El Tor Strain 301, Isolated in 2011 in Russia

## Immunology, Prophylaxis

Generalov S.V., Abramova E.G., Matveeva Zh.V., Zhulidov I.M., Lobovikova O.A., Svintsov R.A., Komissarov A.V., Kireev M.N., Nikiforov A.K. Cultural Antigen in the Technology for Anti-Rabies Immunoglobulin Obtainment from Equine Blood Serum

Kruglikov V.D. Development of Criteria for Probiotic Bacteria Selection for Broadening the Spectrum of Available Anti-Cholera Drugs

Firstova V.V., Pavlov V.M., Kravchenko T.B., Zyrina E.V., Borzilov A.I., Dyatlov I.A. Alteration of Effector Activity of T-Lymphocytes in Mice Immunized against Tularemia, Using *in vitro* Stimulation by Tularin

Shmel'kova T.P., Klyueva S.N., Bugorkova S.A., Kravtsov A.L., Gromova O.V., Volokh O.A., Eremin S.A., Nikiforov A.K., Shchukovskaya T.N. Evaluation of Immunobiological Properties of Cholera Vibrio O1 and O139 Antigens

## Diagnostics

Volynkina A.S., Kulichenko A.N. Genetic Monitoring of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in the South of the European Part of Russia

Grachieva O.V., Kharchenko G.A., Rasskazov D.N., Sadretdinov R.A. Diagnostics of Microcirculatory Disorders in Children with Infectious Pathology

Naidenova E.V., Osina N.A., Kouklev V.E., Yashechkin Yu.I., Bugorkova T.V., Shul'gina I.V., Lobovikova O.A., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. Introduction of New Preparations for Gene Diagnostics of Dengue Fever and Cholera

Sayapina L.V., Abdrashitova A.S., Lobach R.N., Komratov A.V., Malakhaeva A.N., Lyashova O.Yu., Valova T.V., Khramov M.V., Gefan N.G. Diagnostic Efficiency of Adsorbed Anthrax Vegetative Fluorescent Immunoglobulins Demonstrated in the Medical Trials

## Information

Information about the Session of Coordination Council on the Problems of Sanitary Protection of the Territories of the CIS Member-States from Importation and Spread of Particularly Dangerous Infectious Diseases (October 17, 2012; Saratov)

Resolution of the 11th Inter-State Scientific-and-Practical Conference of CIS Member States "Modern Technologies for the Improvement of Preventive Measures and Response to the Emergency Situations of Sanitary-and-Epidemiological Character in the Sphere of Public Healthcare" (October 17, 2012; The Russian Federation, Saratov)

Information about the Interdepartmental Meeting on the Matters of Sanitary-and-Epidemiological Protection of the Territories of the Russian Federation

И.Г.Карнаухов, В.П.Топорков, А.В.Топорков

**О КРИТЕРИЯХ ОТНЕСЕНИЯ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ К БОЛЕЗНЯМ, ТРЕБУЮЩИМ ПРОВЕДЕНИЯ МЕРОПРИЯТИЙ ПО САНИТАРНОЙ ОХРАНЕ ТЕРРИТОРИИ***ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

Рассмотрены изменения в перечне инфекционных болезней, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории, в международных и российских нормативных документах за длительный период, начиная с 1951 г. Проанализированы основные критерии отнесения инфекционных болезней к категории «санохранных». Выделены две группы критериев отнесения инфекционных болезней к группе инфекций, требующих проведения мероприятий по санитарной охране в рамках России или каких-либо межгосударственных объединений.

*Ключевые слова:* санитарная охрана территории, санитарные правила, инфекционные болезни, эпидемиологический надзор, чрезвычайная ситуация в области общественного здравоохранения, новые инфекции

I.G.Karnaukhov, V.P.Toporkov, A.V.Toporkov

**Concerning Criteria for Assigning Infections to the Group of Diseases That Require Implementation of Measures for the Provision of Sanitary Protection of the Territories***Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov*

Considered are the changes introduced into the list of infections, which require implementation of measures for the provision of sanitary protection of the territories, formalized in the international and state regulatory documents. Analyzed are the basic criteria for assigning infections to the category of – “requiring sanitary control”. Distinguished are the two groups of criteria for assigning infectious diseases to the group of infections that require implementation of measures for the provision of sanitary protection of the territories, either on the country-wide level or within the frames of interstate alliances.

*Key words:* sanitary protection of the territories, sanitary regulations, infectious diseases, epidemiological surveillance, emergency situation in the sphere of public healthcare, emerging diseases.

За последние 60 лет в ходе развития санитарной охраны территории России менялось как содержание этого понятия, так и перечень нозологических форм инфекционных болезней, в отношении которых регламентировалось проведение соответствующих мероприятий, что находило отражение как в международных, так и в российских нормативных документах. В 1951 г. после ревизии всех санитарных конвенций были приняты международные санитарные правила, которые касались только шести карантинных болезней: чумы, холеры, желтой лихорадки, натуральной оспы, сыпного и возвратного тифов. Принятые санитарные правила должны были обеспечивать противоэпидемическую защиту национальных границ государств путем предупреждения выноса и завоза карантинных болезней в условиях оказания минимальных помех ритму международных сообщений [7].

В дальнейшем номенклатура регламентируемых инфекций сократилась до трех – холера, желтая лихорадка и чума, что нашло отражение в международных медико-санитарных правилах 1969 г. в период их действия после 1980 г. [2]. Это было связано с тем, что в 1980 г. 33-я сессия Генеральной Ассамблеи ВОЗ провозгласила победу над оспой, а также с достигнутыми успехами в борьбе с сыпным и возвратным тифами.

Появление новых опасных инфекционных бо-

лезней, таких как контагиозные вирусные геморрагические лихорадки и ТОРС, привело к принятию новых международных медико-санитарных правил – ММСП (2005 г.) [3], определивших новый объект надзора и контроля – чрезвычайную ситуацию в области общественного здравоохранения международного значения, включающую проявления таких инфекционных болезней, как оспа, полиомиелит, грипп, вызванный вирусом нового подтипа, ТОРС, а также, при определенных обстоятельствах, холеры, легочной чумы, желтой лихорадки, вирусных геморрагических лихорадок Марбург, Ласса, Эбола, лихорадок Западного Нила, Денге, Рифт-Валли, менингококковой болезни (всего 14 нозологических форм). Перечень инфекционных болезней в ММСП (2005 г.) является гибким, то есть предусматривает возможность включения других вновь возникающих опасных инфекций.

Изменение числа регламентированных инфекционных болезней в международных документах показано на рис. 1.

Правила по санитарной охране территории СССР 1973 г. регламентировали проведение санитарно-карантинных мероприятий в отношении чумы, холеры, натуральной оспы, желтой лихорадки, сыпного и возвратного тифа, малярии, сибирской язвы, бруцеллеза, ящура, сапа, мелиоидоза, бешенства, пситта-

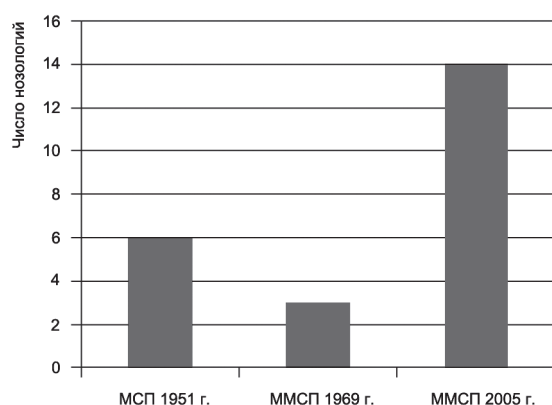


Рис. 1. Изменение числа регламентированных инфекционных болезней в международных документах

коза (всего 14 нозологических форм инфекционных болезней).

Правила по санитарной охране территории СССР от 1983 г. распространялись на чуму, холеру, желтую лихорадку, вирусные геморрагические лихорадки Ласса, Эбола, Марбург, малярию, лихорадки Денге, Чикунгунья, долины Рифт, Западного Нила, энцефаломиелиты лошадиные – западный американский, восточный американский, венесуэльский, энцефалиты – японский, калифорнийский, Сент-Луис, долины Муррея (всего 18 нозологических форм).

Правила по санитарной охране территории Российской Федерации 1995 г. распространялись на девять нозологических форм инфекционных болезней: чуму, холеру, желтую лихорадку, лихорадки Ласса, Эбола, Марбург, малярию, лихорадку Денге, японский энцефалит.

Необходимо отметить, что в отношении такой социально значимой инфекции, как ВИЧ/СПИД, также предусматривалось проведение санохранных мероприятий, хотя эта инфекция и не вошла в перечень санитарных правил. Так, статья 10 Федерального закона от 30 марта 1995 г. № 38-ФЗ «О предупреждении распространения в Российской Федерации заболевания, вызываемого вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ-инфекции)» определяет порядок въезда на территорию Российской Федерации иностранных граждан и лиц без гражданства и направлена на ограничение случаев нахождения в России лиц, не являющихся гражданами Российской Федерации, при этом имеющих социально значимые заболевания (в том числе ВИЧ/СПИД). А в соответствии с постановлением Правительства РФ от 1 ноября 2002 г. № 789 «Об утверждении Положения о выдаче иностранным гражданам и лицам без гражданства разрешения на временное проживание» иностранный гражданин представляет в органы внутренних дел сертификат об отсутствии у заявителя (членов его семьи) ВИЧ-инфекции и документ, выданный полномочным органом иностранного государства или полномочным учреждением здравоохранения Российской Федерации, подтверждающий, что заявитель (члены его семьи) не болен наркоманией и не страдает ни

одним из инфекционных заболеваний, которые представляют опасность для окружающих.

Правила по санитарной охране территории Российской Федерации от 2003 г. действовали в отношении 9 нозологических форм инфекционных болезней: чумы, холеры, желтой лихорадки, Аргентинской геморрагической лихорадки (Хунин), Боливийской геморрагической лихорадки (Мачупо), лихорадок Ласса, Эбола, Марбург, малярии.

Правила по санитарной охране территории Российской Федерации от 2008 г. [4] требуют проведения мероприятий в отношении 16 нозологических форм инфекционных болезней: оспы, полиомиелита, гриппа, вызванного новым подтипом вируса, ТОРС, чумы, холеры, желтой лихорадки, лихорадок Ласса, Эбола, Марбург, малярии, Крымской геморрагической лихорадки, лихорадок Западного Нила, Денге, Рифт-Валли и менингококковой болезни. Правила предусматривают, как и ММСП (2005 г.), возможность включения в этот перечень других новых опасных инфекционных болезней.

Положение о порядке осуществления санитарно-карантинного контроля в рамках Таможенного союза регламентирует проведение мероприятий в отношении 24 форм инфекционных болезней: оспы, полиомиелита, гриппа, вызванного новым подтипом вируса, ТОРС, чумы, холеры, желтой лихорадки, лихорадок Ласса, Эбола, Марбург, Западного Нила, Денге, Рифт-Валли, Крымской геморрагической лихорадки, малярии, менингококковой болезни, сибирской язвы, бруцеллеза, сапа, мелиоидоза, эпидемического сыпного тифа, туберкулеза, лихорадок Хунин и Мачупо.

Изменение количества нозологических форм инфекционных болезней, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории, в России проиллюстрировано на рис. 2.

Мы видим, что перечень регламентируемых инфекционных болезней как в международных, так и в российских нормативных документах неоднократно изменялся как в сторону уменьшения, так и в сторону увеличения их количества, что часто было обусловлено эпидемиологической конъюнктурой на конкретном историческом этапе. Необходимо подчеркнуть, что перечень инфекционных болезней,

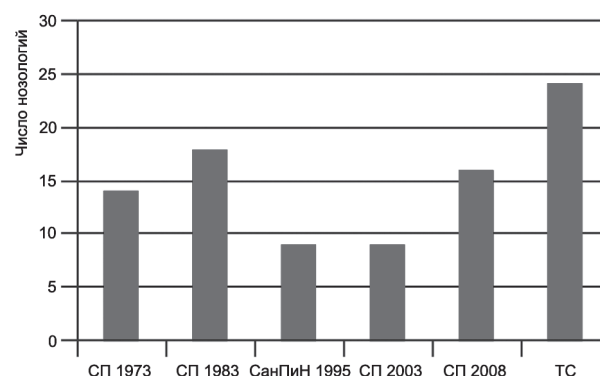


Рис. 2. Изменение количества нозологических форм инфекционных болезней, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории, в России

требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации, это не просто формальный момент, зафиксированный в соответствующих нормативных документах, но и важный практический фактор, определяющий необходимость наличия диагностических препаратов, соответствующего лабораторного оборудования и подготовленных специалистов на каждую нозологическую форму. Чем определяется включение той или иной нозологической формы инфекционной болезни в перечень инфекций, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории?

В международном практическом руководстве ВОЗ 1990 г. [1], подготовленном по предложению неофициального совещания ВОЗ по вопросам разработки стратегий контроля чрезвычайных ситуаций, вызванных эпидемиями инфекционных болезней, П.Брес обозначил чрезвычайную эпидемическую ситуацию как ситуацию, которая может быть определена только в контексте социально-экономических, политических и эпидемиологических условий, в которых она возникает, т.к. именно они определяют актуальность, меры противодействия и необходимость международного сотрудничества. Для определения момента, когда болезнь может рассматриваться как создающая чрезвычайную ситуацию для системы общественного здравоохранения, были предложены следующие критерии (характерные признаки): существование риска распространения среди населения и риска большого числа случаев, тяжелые нарушения здоровья, риск экономического урона, невозможность национального здравоохранения справиться с ситуацией, опасность международного распространения. ММСП (2005 г.) дает алгоритм отнесения события, в том числе и вспышки инфекционной болезни, к чрезвычайной ситуации в области общественного здравоохранения международного значения. Алгоритм оценки события включает такие критерии, как серьезность влияния события на здоровье населения, необычность или неожиданность события, риск распространения в международных масштабах и риск ограничений для международных перевозок и торговли.

Оценим с позиции указанных критериев некоторые из инфекционных болезней, включенных в перечень СП 3.4.2318-08 и в перечень Таможенного союза. Например, лихорадка долины Рифт. Данное заболевание эндемично для ряда стран Африканского континента [6]. На территории России лихорадка долины Рифт не регистрируется, неизвестны даже завозные случаи. Поэтому, даже в случае завоза на территорию России, возникновение вспышки этого заболевания как чрезвычайной ситуации в соответствии с критериями ММСП (2005 г.) представляется невероятным, учитывая трансмиссивный механизм передачи инфекции. Не представляет интереса лихорадка долины Рифт и с точки зрения национального эпидемиологического надзора. То же самое можно сказать и о лихорадках Хуни и Мачупо, включенных в перечень инфекций, требующих про-

ведения мероприятий по санитарной охране в рамках Таможенного союза. Геморрагическая лихорадка Хуни – зоонозная природно-очаговая вирусная инфекционная болезнь, эндемичная для ряда районов Аргентины. Геморрагическая лихорадка Мачупо – зоонозная природно-очаговая вирусная инфекционная болезнь, эндемичная для ряда районов Боливии. Случаи выноса этих болезней за пределы эндемичных территорий не регистрируются.

В то же время хорошо известно существование значительного числа других экзотических лихорадок, являющихся зоонозными природно-очаговыми инфекционными болезнями, с достаточно высокими показателями летальности (лихорадки Цуцугамуши, Инко, Тягиня, Гуароа, Бвамба, Буньямвера и др.), не включенных ни в один из регламентированных перечней инфекционных болезней [6].

Такие болезни, как сап, мелиоидоз, эпидемический сыпной тиф в настоящее время не регистрируются на территории России и не способны даже в случае завоза вызвать чрезвычайную ситуацию в соответствии с критериями ММСП (2005 г.). В то же время, сап и мелиоидоз относятся к особо опасным инфекционным болезням, поскольку их возбудители включены во II группу патогенности.

КГЛ и ЛЗН, безусловно, являются актуальными для национального эпидемиологического надзора, поскольку за последнее десятилетие регистрируется расширение ареала распространения возбудителей и эпидемических проявлений этих инфекций на территории России. Актуальными инфекциями являются малярия, лихорадка Денге, завозные случаи которых ежегодно имеют место в России, а также ежегодно регистрируемые сибирская язва, бруцеллез, менингококковая болезнь. Спорадические проявления и вспышки данных болезней на территории России вряд ли могут представлять собой чрезвычайную ситуацию в соответствии с критериями ММСП (2005 г.), поскольку проявления этих болезней не являются в России необычными или неожиданными, при этом отсутствует риск распространения этих болезней в международных масштабах, а также риск ограничений для международных перевозок и торговли. Необходимо отметить, что есть и другие инфекции, сходные по своим характеристикам с упомянутыми выше, но не вошедшие в перечень Таможенного союза, например туляремия.

Такие инфекции, как натуральная оспа и ТОРС, в настоящее время на территории России и в мире, в целом, не регистрируются. Однако, даже единичные случаи возникновения этих болезней, в соответствии с критериями ВОЗ будут представлять собой чрезвычайную ситуацию.

Грипп, вызванный новым подтипом вируса, потенциально может вызвать чрезвычайную ситуацию при наличии определенных свойств вируса, таких как способность к пандемическому распространению и высокая патогенность.

Полиомиелит относится к инфекциям, споради-

ческие проявления которых расцениваются как чрезвычайная ситуация. Он актуален и для национального эпидемиологического надзора, в 2010 г. в Российской Федерации, впервые с 1996 г., зарегистрировано 14 случаев полиомиелита, вызванного «диким» полиовирусом, в результате завоза из Таджикистана.

Чума и холера – особо опасные инфекционные болезни, актуальные как с точки зрения эпидемиологического надзора на территории России, так и способные при определенных условиях вызвать чрезвычайную ситуацию в соответствии с критериями ММСП (2005 г.).

И наконец, есть ряд таких болезней, как желтая лихорадка, контагиозные вирусные геморрагические лихорадки Ласса, Марбург, Эбола, которые не регистрируются на территории России, но их завоз может представлять чрезвычайную ситуацию.

Таким образом, все инфекционные болезни, включенные в перечень Таможенного союза, по распространению в мире и в России, по значимости для национального эпидемиологического надзора, по способности вызвать чрезвычайную ситуацию в области общественного здравоохранения можно условно разделить на пять групп, представленных в табл. 1.

Если говорить о значимости инфекционных болезней для национального эпидемиологического надзора и способности болезни вызвать чрезвычайную ситуацию в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера, то перечень таких инфекций регламентирован постановлением Главного государственного врача Российской Федерации от 24.02.2009 г. № 11 «О представлении внеочередных донесений о чрезвычайных ситуациях в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера». Указанное постановление содержит перечень из более 40 инфекционных болезней, актуальных для эпидемиологического надзора и способных, в зависимости от количества заболевших, вызвать чрезвычайную ситуацию санитарно-эпидемиологического характера в области общественного здравоохранения (но не международного значения). Четыре инфекционных болезни из этого перечня – оспа, полиомие-

лит, грипп, вызванный новым подтипом вируса, и ТОРС – способны в соответствии с критериями ВОЗ вызвать чрезвычайную ситуацию в области общественного здравоохранения международного значения. Поскольку более половины инфекционных болезней, перечисленных в указанном постановлении, не включены в перечень болезней, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории в рамках России и Таможенного союза, то из этого вытекает вывод, что способность инфекционной болезни вызвать чрезвычайную ситуацию в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера (но не международного значения) и актуальность болезни для национального эпидемиологического надзора не являются единственными критериями для включения болезни в перечень инфекций, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории.

Необходимо отметить, что определенные критерии отнесения инфекционных болезней к группе инфекций, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации, были предложены Ю.М.Федоровым и А.М.Кокушкиным [5] еще в 1999 г., до появления ММСП (2005 г.). Это такие критерии, как:

- отсутствие убиквитарного распространения и необычность эпидемических проявлений болезни для данной территории;
- высокая патогенность возбудителя инфекционной болезни;
- биологическая и социальная обеспеченность реализации механизмов эпидемического распространения болезни;
- высокая восприимчивость людей к возбудителю болезни на данной территории;
- отсутствие практического опыта диагностики и борьбы с болезнью на данной территории;
- высокая социально-экономическая значимость последствий эпидемических проявлений болезни.

В то же время не совсем понятно скольким критериям должна удовлетворять инфекционная болезнь для отнесения ее к группе, требующей проведения мероприятий по санитарной охране территории – одно-

Таблица 1

| Группы инфекционных болезней, значимых для санитарной охраны                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                              |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Основные характеристики                                                                                                                                                                                                | Инфекционные болезни                                                                                                                                                         |
| Регистрируемые в мире, не регистрируемые на территории России, не способные на текущий момент вызвать на территории России чрезвычайную ситуацию (в соответствии с критериями ММСП, 2005 г.)                           | Аргентинская геморрагическая лихорадка (Хунин), Боливийская геморрагическая лихорадка (Мачупо), лихорадка долины Рифт (Рифт-Валли), сап, мелиоидоз, эпидемический сыпной тиф |
| Регистрируемые в мире и в России, актуальные для национального эпидемиологического надзора, но их проявления в России на текущий момент не являются чрезвычайной ситуацией (в соответствии с критериями ММСП, 2005 г.) | Крымская геморрагическая лихорадка, лихорадка Западного Нила, лихорадка Денге, малярия, менингококковая болезнь, сибирская язва, бруцеллез, туберкулез                       |
| Не регистрируются в настоящее время ни в мире, ни в России, но способные вызвать чрезвычайную ситуацию (в соответствии с критериями ММСП, 2005 г.) в случае их возникновения                                           | Натуральная оспа, ТОРС, грипп, вызванный новым подтипом вируса                                                                                                               |
| Регистрируемые в мире, актуальные для национального эпидемиологического надзора с позиции возможного заноса, способные вызвать чрезвычайную ситуацию (в соответствии с критериями ММСП, 2005 г.)                       | Холера, чума, полиомиелит                                                                                                                                                    |
| Регистрируемые в мире, не регистрируемые в России, но способные в случае заноса на территорию России вызвать чрезвычайную ситуацию (в соответствии с критериями ММСП, 2005 г.)                                         | Контагиозные вирусные геморрагические лихорадки Ласса, Марбург, Эбола, желтая лихорадка                                                                                      |

Таблица 2

| Критерии и признаки для рассмотрения вирусных инфекций с точки зрения их значимости для санитарной охраны территории    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Основные критерии                                                                                                       | Основные признаки для анализа                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Занос инфекции приводит к существенным социально-экономическим последствиям                                             | Тяжесть заболевания и летальность<br>Контагиозность и способность к эпидемическому распространению<br>Необходимый уровень защиты в зависимости от группы патогенности                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Занос инфекции может привести к формированию вторичных очагов                                                           | Ареал инфекции, наличие очагов на территории России<br>Механизмы, пути и факторы передачи, устойчивость возбудителя во внешней среде                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Эффективность противоэпидемических и ограничительных мероприятий при управлении эпидемическим распространением инфекции | Длительность вирусемии, носительство (человек)<br>Природный резервуар вируса на эндемичных территориях (хозяева и переносчики)<br>Занос по путям естественной (сезонной) миграции хозяев и переносчиков<br>Занос в результате внешнеэкономических связей (численность населения эндемичных территорий, интенсивность грузовых и пассажирских перевозок)<br>Умышленный занос ООВИ<br>Степень риска формирования вторичных очагов ООВИ на неэндемичных территориях<br>Меры по предупреждению заноса ООВИ и ликвидации заносного очага на неэндемичной территории<br>Особенности противоэпидемических мероприятий по отношению к больным ООВИ, переболевшим и контактировавшим<br>Целесообразность ограничения миграций населения и импорта<br>Эффективность лечебно-профилактических средств<br>Возможности клинической и лабораторной диагностики, включая субвидовое типирование вирусов для установления происхождения и уровня патогенности занесенного возбудителя ООВИ |

му из перечисленных, или несколькими, или всем.

Более подробные критерии и признаки для отнесения особо опасных вирусных инфекций к перечню «санохраных» были предложены А.М.Титенко (2005 г.) в его докторской диссертации – три критерия и 16 признаков (табл. 2).

Таким образом, на текущий момент целесообразно выделить две группы критериев отнесения инфекционных болезней к группе инфекций, требующих проведения мероприятий по санитарной охране в рамках России или каких-либо межгосударственных объединений. Первая группа – это критерии ММСП (2005 г.) по отнесению события к чрезвычайной ситуации в области общественного здравоохранения международного значения. То есть те инфекционные болезни, которые могут вызвать чрезвычайную ситуацию в соответствии с критериями ММСП (2005 г.), однозначно требуют проведения мероприятий по санитарной охране территории. Вторая группа – это национальные критерии отнесения инфекционной болезни к группе инфекций, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории. И эта группа критериев требует, на наш взгляд, более детальной проработки и комплексного анализа с учетом предложений Ю.М.Федорова (2004 г.) и А.М.Титенко (2005 г.) и, возможно, нормативного закрепления с тем, чтобы при очередном пересмотре перечня инфекционных болезней, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории в рамках России или каких-либо межгосударственных объединений, иметь более четкие критерии, позволяющие включать или не включать инфекции в такой перечень.

Работа выполнена по государственному контракту № 50-Д от 04.06.2012 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 годы)».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Брес П. Действия служб общественного здравоохранения в чрезвычайных ситуациях, вызванных эпидемиями: практическое руководство. ВОЗ. Женева; 1990. 293 с.
2. Международные медико-санитарные правила. Третье аннотированное издание. Женева; 1985. 118 с.
3. Международные медико-санитарные правила 2005 г. ВОЗ. Женева; 2007. 82 с.
4. Санитарная охрана территории Российской Федерации. СП 3.4.2318-08. М.; 2008. 39 с.
5. Федоров Ю.М., Кокушкин А.М. Критерии отнесения инфекционных заболеваний к категории инфекций, в отношении которых необходимо проведение мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации. Мед. паразитол. 1999; 4:7–9.
6. Черкасский Б.Л. Инфекционные и паразитарные болезни человека. Справочник эпидемиолога. М.; 1994. 617 с.
7. Шляхов Э.Н., Барабаш М.А., Сандул Г.Н. Некоторые современные эпидемиологические тенденции карантинных инфекций и принципы планирования мероприятий по санитарной охране территорий. Здравоохранение. 1980; 2:37–9.

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

1. Bres P. [Response Actions of Public Health Services in Emergency Situations Caused by Epidemics: Practice Guidelines]. WHO. Geneva; 1990. 293 p.
2. [International Health Regulations. 3<sup>rd</sup> Annotated Edition]. Geneva; 1985. 118 p.
3. [International Health Regulations (2005)]. WHO. Geneva; 2007. 82 p.
4. [Sanitary Protection of the Territories of the Russian Federation]. SR 3.4.2318-08. M.; 2008. 39 p.
5. Fedorov Yu.M., Kokushkin A.M. [Criteria for assigning infectious diseases to the category of infections that require implementation of measures for the provision of sanitary protection of the territories of the Russian Federation]. Med. Parazitol. 1999; 4: 7–9.
6. Cherkassky B.L. [Human Infectious and Parasitic Diseases. Epidemiologist Handbook]. M.: 1994. 617 p.
7. Shlyakhov E.N., Barabash M.A., Sandul G.N. [Some modern epidemiological trends as related to quarantine infections and planning principles for implementation of measures for provision of sanitary protection of the territories]. Zdravookhranenie. 1980; 2: 37–9.

## Authors:

Karnaukhov I.G., Toporkov V.P., Toporkov A.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusapi@microbe.ru

## Об авторах:

Карнаухов И.Г., Топорков В.П., Топорков А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusapi@microbe.ru

Поступила 31.07.12.

В.П.Попов<sup>1</sup>, Д.С.Орлов<sup>2</sup>, В.Е.Безсмертный<sup>1</sup>

## ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКАЯ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ОБСТАНОВКА В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ ТУЛЯРЕМИИ НА ТЕРРИТОРИИ ЦЕНТРАЛЬНОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 1992–2011 гг.

<sup>1</sup>ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора, Москва; <sup>2</sup>МГУ им. М.В.Ломоносова, географический факультет, Москва

Дана краткая характеристика эпизоотической и эпидемической активности природных очагов туляремии на территории Центрального федерального округа России за 1992–2011 гг. Применение ГИС-технологий позволило создать ретроспективную карту мест заражения жителей округа туляремией в 2005 г. и выделить наиболее эпидемически опасные районы.

**Ключевые слова:** туляремия, природные очаги, ЦФО, эпизоотическая активность, эпидемическая активность, кадастр, программа Mapinfo 10.5.

V.P.Popov<sup>1</sup>, D.S.Orlov<sup>2</sup>, V.E.Bezsmertny<sup>1</sup>

## Epizootiological and Epidemiological Situation in Tularemia Natural Foci in the Territory of the Central Federal District of the Russian Federation from 1992 to 2011

<sup>1</sup>Rospotrebnadzor Plague Control Center, Moscow; <sup>2</sup>M.V.Lomonosov MSU, Geographical Department, Moscow

Outlined is a brief characteristics on epizootic and epidemic activity of tularemia natural foci in the territory of the Central Federal district of the Russian Federation over a period of 1992–2012. Implementation of GIS-technologies has made it possible to design retrospective map of the sites of the district population infectioning in 2005, and to distinguish the regions that are of a great epidemic significance.

**Key words:** tularemia, natural foci, Central Federal district (CFD), epizootic activity, epidemic activity, cadastre, Mapinfo 10.5 software product.

На территории Центрального федерального округа (ЦФО) имеются очаги лесного, пойменно-болотного, луго-полевого и степного типов туляремии, приуроченные к различным эколого-географическим ландшафтам.

За 1992–2011 год лабораториями особо опасных инфекций Центров эпидемиологии и гигиены ЦФО из различных объектов окружающей среды изолировано 719 культур *Fr. tularensis*. Наибольшее количество культур изолировано от мелких млекопитающих – 219 (30,46 %), из различных водных источников – 185 (25,73 %), иксодовых клещей – 129 (17,94 %), гамазовых клещей – 50 (7,95 %), из экскрементов грызунов – 41 (5,7 %), гнезд грызунов – 26 (3,63 %), от шкурок грызунов – 21 (2,94 %), из погрызов грызунов – 20 (2,78 %), от вшей и блох грызунов выделено по 10 (1,4 %). Единичные (1–2) культуры возбудителя туляремии изолированы из почвы, фуража, соломы, погадок, слепня и ласки. В эпизоотический процесс вовлекались обыкновенные и рыжие полевки, лесные, полевые и желтогорлые мыши, водяная полевка, мышшь-малютка, обыкновенная бурозубка, серая крыса и домовая мышь.

Наиболее активные очаги луго-полевого типа находятся в Калужской, Липецкой, Смоленской и Тульской областях, на территории которых от мелких млекопитающих было изолировано 167 культур или 76,25 %. В Тульской области при исследовании добытых мелких млекопитающих 69 культур возбу-

дителя туляремии были выделены от их эктопаразитов (гамазовые клещи, вши, блохи), а также 41 культура от экскрементов грызунов. Всего одна культура туляремии за эти годы выделена от грызуна в 1993 г. в Курской области. В Белгородской и Костромской областях не удалось выделить ни одной культуры возбудителя туляремии. Из имеющихся на территории Москвы 20 очагов туляремии самым активным оказался очаг в окрестностях деревни Чернево (район Южное Бутово). В 1995 г. здесь из озерной воды было изолировано 4 культуры возбудителя туляремии, в 1997 г. – 18 культур (12 – из подснежных гнезд грызунов, 2 – из воды и по одной – от трупа обыкновенной полевки, полевой мыши, от вшей грызунов и погадки хищных птиц). Там же в 2002 г. выделено 4 культуры туляремии (3 – из подснежных гнезд грызунов, 1 – от трупа обыкновенной полевки).

Невысокая эпизоотическая активность отмечена в природных очагах туляремии пойменно-болотного типа, что связано с низкой численностью основного носителя – водяной полевки. Две культуры возбудителя туляремии были изолированы от водяных полевок, добытых в 1995 г. на реке Савала Новохоперского района Воронежской области, а последняя культура в области изолирована в 1997 г. из воды реки Воронеж в г. Рамонь. Следует отметить, что в настоящее время численность водяной полевки находится на очень низком уровне не только в ЦФО, но и в других федеральных округах России. Если суммировать все

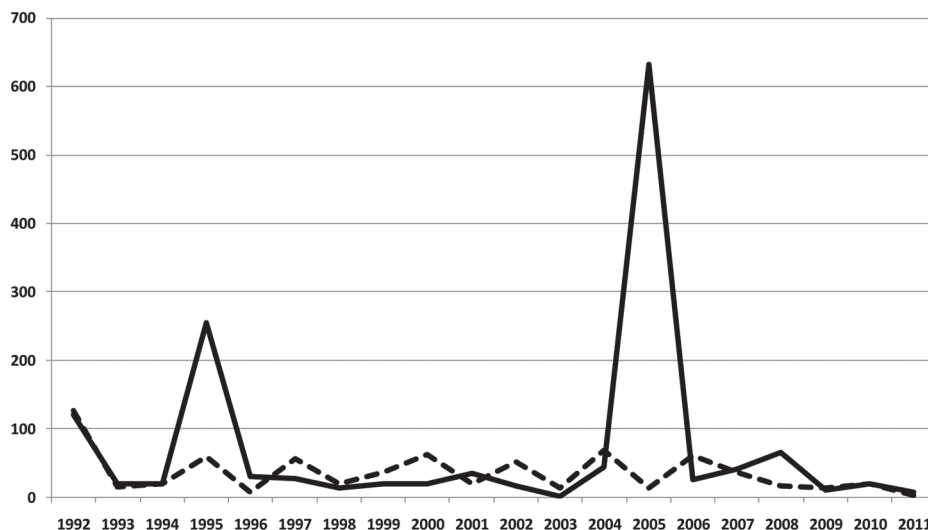


Рис. 1. Диаграмма заболеваемости туляремией и выделения культур возбудителя туляремии с 1992 по 2011 год на территории Центрального федерального округа Российской Федерации:  
 — количество случаев,  
 --- количество выделенных культур

культуры, выделенные от мелких млекопитающих, их эктопаразитов, а также из объектов, связанных с их жизнедеятельностью, то их количество составит 390 культур туляремии или 56,13 % от всех выделенных за это время.

Необходимо отметить активную роль воды в поддержании эпизоотической активности природных очагов туляремии. На территории 13 областей ЦФО из различных водных источников за эти годы изолировано 185 культур (25,73 %) возбудителя туляремии, из них 158 во Владимирской, Ивановской, Московской, Смоленской и Ярославской областях.

В ЦФО от иксодовых клещей *Dermacentor reticulatus* выделено 129 культур (17,94 %), значительная часть (112) которых изолирована от клещей, добытых в Брянской, Ивановской, Рязанской и Смоленской областях.

С 1992 по 2011 год на территории ЦФО отмечено несколько подъемов эпизоотической и эпидемической активности природных очагов туляремии, когда эпизоотии одновременно имели место в 7–9 областях, а заболеваемость людей регистрировалась в 11–15. Наиболее активные эпизоотии туляремии с выделением значительного количества культур возбудителя туляремии были в 1992 (127 культур), 1995 (59 культур), 1997 (56 культур), 2000 (65 культур), 2002 (52 культуры), 2004 (69 культур) и 2006 гг. (61 культура). Исключение составил 2005 г., когда эпизоотии выявлены в 2 областях, а заболевшие туляремией люди зарегистрированы в 13. С 2008 г. в ЦФО наметился значительный спад эпизоотической и эпидемической активности природных очагов (рис. 1).

Многолетний мониторинг эпизоотической активности природных очагов туляремии в России показал, что очаги туляремии в ЦФО являются самыми активными, это подтверждается значительным количеством выделенных культур возбудителя туляремии (455 культур из 1117 по России за последние 15 лет).

За период 1992–2011 гг. в ЦФО зарегистрировано 1420 больных туляремией, что составляет более 46 % от числа заболевших туляремией в Российской

Федерации. В отдельные годы удельный вес заболевших в ЦФО от общей заболеваемости туляремией по России составлял: в 1992 г. – 58 %, 1995 г. – 67 %, в 2001 г. – 52,4 %, в 2005 г. – 71,8 %, в 2008 г. – 66,7 %. Таким образом, природные очаги туляремии ЦФО можно отнести к эпидемически опасным очагам в Российской Федерации.

Самые заметные подъемы эпидемической активности очагов в ЦФО были в 1995 г. (зарегистрировано 255 случаев туляремии) и в 2005 г. (632 больных). В 1995 г. эпизоотии туляремии в ЦФО были выявлены в 9 областях, в то время как больные туляремией зарегистрированы в 15. Значительная часть заболевших туляремией связана с двумя групповыми вспышками инфекции – в пос. Юбилейный (пригород г. Вязьма) Смоленской области, где заболел 91 чел. и в Москве – 19 чел. (район Ховрино). Причиной вспышки в пос. Юбилейный послужила авария водопровода, в результате чего был загрязнен резервуар, который использовался жителями как колодец и из которого выделена культура туляремии. В Москве групповое заболевание людей связано с употреблением сырого молока, поступившего в продажу из Шаховского района Московской области в бочковой таре без предварительной пастеризации. Другая часть (15 чел.) москвичей заразилась при посещении соседних областей. В Ярославской области заболело 50 чел., 46 из которых оказались жителями Ярославля. Основной путь заражения – трансмиссивный при отдыхе и работе на дачных участках. Еще 30 чел. заразились туляремией в Рязанской области, преимущественно трансмиссивным путем, в Клепиковском, Касимовском, Сасовском, Спасском, Пронском, Шацком районах в очагах пойменно-болотного типа. Из 13 чел., заболевших туляремией в Ивановской области, 6 занимались отловом ондатр, среди которых регистрировались эпизоотии. В Тамбовской области, на фоне нарастающей эпизоотической активности природных очагов, заразились туляремией 12 чел. В других областях ЦФО заболеваемость туляремией за год составила от 1–2 до 4–6 чел.



Рис. 2. Места заражения туляремией жителей Москвы в 2005 г.:

★ – места заражения туляремией,  
— – граница ЦФО

Годом самой высокой заболеваемости туляремией как в Центральном федеральном округе, так и в Российской Федерации, стал 2005 г., когда из 881 случая заболевания туляремией в России – 632 (72 %) зарегистрировано в 13 субъектах Центрального федерального округа, но если в большинстве областей это были единичные случаи (1–5 чел.), то в Московской области заболело 166 чел., Рязанской – 135, во Владимирской – 40, в Воронежской – 35 и в Москве – 237.

При анализе эпидкарт заболевших туляремией жителей Москвы выяснилось, что они заразились на территории 15 субъектов: 159 чел. – в Московской, 42 чел. – Рязанской, 13 чел. – во Владимирской, 4 чел. – в Воронежской областях. В других областях (Калужской, Курской, Липецкой, Тамбовской, Тверской, Ярославской) ЦФО регистрировалось от 1 до 3 заразившихся жителей Москвы. За пределами ЦФО заразились 5 жителей столицы – по одному в Волгоградской (Урюпинск), Новгородской, Саратовской (Трещиха), Челябинской (Копейск) областях и в Усильском районе Республики Башкортостан.

Жители Москвы заразились в 21 районе Московской области. Наибольшее число (81 чел.) – в Шатурском, 29 чел. – в Орехово-Зуевском районах.

В остальных районах области число заразившихся не превышало 1–3 чел. В Рязанской области из 42 жителей Москвы, 28 заразились в Клепиковском районе. Во Владимирской области заразились 13 москвичей в 6 районах. В Лискинском, Острогском и Панинском районах Воронежской области заразились туляремией 4 жителя Москвы.

В 2005 г. на территории 8 районов Московской области заразились туляремией 166 жителей Подмосковья, из которых 89 чел. в Шатурском, 48 – в Орехово-Зуевском и 6 чел. в Егорьевском районах. В других районах (Раменский, Пушкинский, Дмитровский, Коломенский, Павлово-Посадский) отмечены единичные случаи заражения туляремией. В указанных районах заразились, в основном, местные жители и лишь в отдельных случаях это были приезжие из других районов области. Наибольшее количество заразившихся туляремией (34 чел.) зарегистрировано в г. Рошаль Шатурского района, из них местных жителей – 31 чел. Вне пределов области заразились туляремией 3 чел. во Владимирской (Гусь-Хрустальный район), Тверской (Рамешковский район) и Ленинградской (Выборгский район) областях.

Одной из областей ЦФО, где почти ежегодно регистрируется заболеваемость туляремией, является Рязанская область. В 2005 г. здесь заразились туляре-



Рис. 3. Места заражения туляремией жителей ЦФО и Нижегородской области в 2005 г.:

● – места заражения жителей ЦФО, ▲ – места заражения жителей Нижегородской области, — — граница ЦФО

мией 135 чел. в 7 районах: 70 чел. – в Клепиковском, 22 – в Рязанском, 23 – в Спасском, по 4 чел. – в Касимовском и Шацком, по 1 чел. – в Шиловском и Кадомском районах. Еще 4 чел. заразились за пределами области – по одному в Шатурском и Егорьевском районах Московской области, а также Тельгушевском районе Республики Мордовия и Балаковском районе Саратовской области. Из 135 заболевших туляремией 126 – жители Рязани.

Подобная ситуация была отмечена и для Воронежской области, где в 24 населенных пунктах 11 районов заразились туляремией 35 чел., 29 из которых оказались жителями Воронежа. Во Владимирской области 40 местных жителей заболели туляремией в Гусь-Хрустальном, Вязниковском, Муромском, Гороховецком, Камешковском и Юрьев-Польском районах. В 14 населенных пунктах Гусь-Хрустального района заболело 26 чел., в других районах число заболевших составляло от 1 до 3 чел.

На основании поступивших в Противочумный центр эпидкарт заболевших туляремией был сделан кадастр и ретроспективная карта заражения людей туляремией в 2005 г. в ЦФО (рис. 2). Для определения географических координат мест заражения использована Большая энциклопедия географических

баз в масштабе 1:20000 (ИНГИТ все регионы России, 7 версия). Обработка полученных данных проведена в программе Mapinfo 10.5.

Необходимо также упомянуть, что в 33 населенных пунктах Гороховецкого района Владимирской области заразились туляремией 96 городских жителей Нижегородской области (из Нижнего Новгорода и Дзержинска). Таким образом, из 881 случая заболевания туляремией в России на территории ЦФО заразились 728 чел. (82,6 %) в 315 населенных пунктах (рис. 3).

Значительная часть населенных пунктов Московской, Рязанской и Владимирской областей, где заразились жители этих областей, расположены в зоне подтаежных ландшафтов на территории Мещерской провинции, где располагаются Шатурский, Орехово-Зуевский и Егорьевский районы Московской области, Гусь-Хрустальный район Владимирской области, а также Клепиковский, Рязанский и Спасский районы Рязанской области. В 173 населенных пунктах этих районов заразились более 448 чел., из которых 279 чел. (62,3 %) жители Москвы и Рязани.

В дальнейшем сделанная в программе Mapinfo 10.5 ретроспективная карта мест заражения туляремией жителей ЦФО в 2005 г. была совмещена с кар-

той «Агроклиматические ресурсы нечерноземной зоны РСФСР», где имеются выделы с указанием влагообеспеченности вегетационного периода сельскохозяйственных культур. Так, наиболее эпидемически опасные места заражения людей в Московской, Владимирской и Рязанской областях совпали с территориями, где относительный показатель увлажнения почвы колеблется от 1,3–1,5 и выше 1,7 – это избыточно-влажные, переувлажненные и заболоченные почвы, на которых располагаются очаги туляремии пойменно-болотного типа.

На основании анализа результатов исследований можно сделать вывод о том, что основной метод заражения людей туляремией за последние 20 лет – трансмиссивный, а основной контингент заболевших туляремией – жители городов. Также отмечено, что применение ГИС-технологий позволило выявить

наиболее эпидемически опасные районы ЦФО, приуроченные к переувлажненным и заболоченным почвам. Накопленный опыт работы с применением программы Mapinfo 10.5 можно использовать для выявления участков стойкого проявления туляремии на территории других федеральных округов Российской Федерации.

**Authors:**

*Popov V.P. Bezsmertny V.E.* Plague Control Center. 10, Pogodinskaya St., B. 4, Moscow, 119121, Russia. E-mail: protivochym@nlm.ru

*Orlov D.S.* M.V.Lomonosov MSU, Geographical Department. Moscow.

**Об авторах:**

*Попов В.П., Безсмертный В.Е.* Противочумный центр. 119121, Москва, Погодинская ул., 10, с. 4. E-mail: protivochym@nlm.ru

*Орлов Д.С.* МГУ им. М.В.Ломоносова. Москва.

Поступила 29.10.12.

Л.П.Базанова, А.Я.Никитин

**АГРЕГИРОВАННОСТЬ ЧУМНОГО МИКРОБА В ОРГАНИЗМЕ БЛОХ (*SIPHONAPTERA*) С РАЗЛИЧНОЙ ВЕКТОРНОЙ СПОСОБНОСТЬЮ**

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

Для характеристики взаимоотношений 12 видов и подвидов блох (*Siphonaptera*) и чумного микроба (*Yersinia pestis* subsp. *pestis*) использованы показатели: доля насекомых с «блоком», «глыбками» и их отношение, названное индексом агрегированности микроба. Образование блока преджелудка отмечено у 10, а формирование «глыбок» – у всех исследованных видов и подвидов отряда *Siphonaptera*, причем различия между активными и неактивными переносчиками по последнему показателю недостоверны. Блохи, у которых в опыте не формировался «блок», способны к передаче возбудителя чумы, в том числе с генерализацией инфекционного процесса у зверьков, что может обеспечить непрерывность трансмиссии микроба. Высокое значение показателя «частота блокообразования» не отражает наличие коэволюции во взаимоотношениях микроба и его переносчика.

**Ключевые слова:** чумной микроб, блоха, агрегированность, «блок» преджелудка, бактериальные «глыбки».

L.P.Bazanov, A.Ya.Nikitin

**Plague Microbe Aggregation in the Organism of Fleas (*Siphonaptera*) with Different Vector Ability**

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

The following factors have been used to characterize 12 species and subspecies of fleas (*Siphonaptera*) and plague microbe (*Yersinia pestis* subsp. *pestis*): the proportion of fleas with “blocks”, “blockules” and their ratio, called the index of microbe aggregation. The block formation is registered in 10, whereas formation of blockules are registered in all of the studied species and subspecies of *Siphonaptera*, the difference between active and passive transmitters according to the last characteristics being unreliable. The fleas, among of which “blocked” ones are not revealed in the experiments, are capable to transmit the causative agent of plague, sometimes with generalization of infectious process in animals, that can provide for continuous transmission of microbe without formation of “blocks” in the proventriculus. Thus, the high value of “rate of block formation” does not reflect the existence of coevolution in the interactions between microbe and its transmitter.

**Key words:** plague microbe, flea, aggregation, “block” of proventriculus, bacterial “blockules”.

Эффективность передачи чумного микроба блохами связывают с феноменом блокообразования в организме насекомого [3, 4, 5, 10]. Предшествующее образованию «блока» формирование конгломератов («глыбок») у блох трактуется как физическое состояние агрегированности чумного микроба [3]. Особи с «глыбками» в желудке могут освободиться от них, а могут дожить до естественного конца жизни, являясь своеобразными хранителями микроба – «здоровыми» носителями возбудителя чумы [5]. Полагают, что при отсутствии блокообразования подобный исход инфицирования эктопаразита не обеспечивает передачу патогена по классической схеме: грызун–блоха–грызун [5, 7]. Роль таких насекомых сводят к обсеменению во время дефекации окружающей среды живыми бактериями, защищенными от воздействия неблагоприятных условий внешними мембранными образованиями [5]. Вместе с тем на блохах *Frontopsylla caucasica*, *F. luculenta*, *Nosopsyllus mokrzeckyi*, *Ns. laeviceps*, *Xenopsylla conformis*, *Ctenophthalmus pollex*, *Citellophilus tesquorum*, *Amphalius runatus* показано, что при формировании у них бактериальных «глыбок» и отсутствии полных

«блоков» преджелудка возможна передача возбудителя чумы зверькам, в некоторых случаях с агональной бактериемией [2, 9]. Следовательно, для обеспечения процесса циркуляции возбудителя в природном очаге чумы не всегда обязательно блокообразование. В этой связи возникает вопрос: можно ли трактовать процесс блокообразования как результат коэволюции микроба и переносчика?

Цель работы – сравнительный анализ формирования «глыбок» и «блоков» чумного микроба в организме блох с различной векторной активностью, прокормителями которых являются животные с неодинаковой эпизоотической ролью в природном очаге чумы.

Проанализированы данные экспериментов с блохами восьми родов, культивируемыми в условиях инсектария или добытыми непосредственно из природных популяций, а также с искусственно полученными гибридами двух подвидов *C. tesquorum* (*altaicus* и *sungaris*). В опытах использовали штаммы *Y. pestis* subsp. *pestis*. Методы проведения опытов, а также получения гибридных блох отражены в ранее опубликованных работах [1, 2, 6, 9]. Характер взаи-

моотношений возбудителя чумы с блохами оценивали по доле особей с бактериальными «глыбками» и полными «блоками» в расчете на одну подкормку и индексу агрегированности микроба (отношение доли блох с «блоками» к доле насекомых с «глыбками»), а также частоте передачи патогена подопытным животным и числу зверьков с генерализованной формой инфекции. Статистическая обработка проведена стандартными методами.

Из многочисленных экспериментов следует, что при подкормках блох на естественных хозяевах формирование бактериальных «глыбок» происходит у всех исследованных видов блох из Тувинского природного очага чумы, даже в случае отсутствия полных «блоков». У блох *C. tesquorum altaicus*, *F. elatoides*, *Neopsylla mana*, *Oropsylla alaskensis* и *Rhadinopsylla li transbaicalica*, паразитирующих на основном носителе – длиннохвостом суслике, отмечен более высокий уровень блокообразования, чем у *F. hetera*, *Paradoxopsyllus scalonae*, *P. scorodumovi*, *P. dashidorzhi*, *Amphipsylla primaris* – эктопаразитов монгольской и даурской пищух, а также плоскочерепной полевки, играющих второстепенную роль в эпизоотическом процессе. Средняя за одну подкормку доля особей с «блоком» составляет соответственно у этих групп (1,5±0,133) и (0,69±0,106). Однако доля особей с «глыбками» у эктопаразитов основного носителя, наоборот, оказывается меньше (16,8±0,65), чем у блох второстепенных носителей (27,1±0,82). Несмотря на небольшое число сравниваемых видов, различия по доле особей с «глыбками» среди блох основного и второстепенного носителей чумы статистически значимы ( $t=2,73$ ;  $df=8$ ;  $P<0,05$ ). Индекс агрегированности микроба, который для блох основного носителя составил 0,109, а для второстепенных – 0,025, показывает, что у эктопаразитов длиннохвостого суслика в эксперименте на 100 особей с «глыбками» приходится от 2 до 28 особей (в среднем 11), а у блох монгольской пищухи – от 1 до 2 особей с «блоком». У блохи *A. primaris* формируется до 8 «блоков» на 100 особей с «глыбками», также меньше, чем у блох суслика. Следовательно, у эктопаразитов основного носителя в Тувинском природном очаге наблюдается более высокий индекс агрегированности микроба и уровень блокообразования, по сравнению с блохами второстепенных носителей, хотя среди последних

выше доля особей с «глыбками».

Проведен анализ особенностей формирования чумным микробом бактериальных «глыбок» и «блоков» преджелудка у блох, паразитирующих на основных и второстепенных носителях в сибирских очагах чумы сусликового типа (Тувинском и Забайкальском), а также у насекомых, исторически не имевших контакта с возбудителем на этих территориях (*Xenopsylla cheopis* и искусственно полученные гибриды двух подвидов *C. tesquorum*). У блох суслика доля особей с «блоком» преджелудка (2,1 %) в три раза выше, чем у паразитов пищухи (0,7 %), однако у *X. cheopis* и гибридов данные показатели (5,4 и 5,3 % соответственно) почти в два с половиной раза выше, чем у блох суслика. Следовательно, способность к высокой частоте блокообразования не обязательно наблюдается у эктопаразитов основного носителя чумы и не является доказательством коэволюционного характера формирования подобных отношений в паразитарной триаде. Не только насекомые с «блоком» преджелудка, но и значительная часть популяции возбудителя гибнет, если блоха не сможет в течение непродолжительного времени найти потенциального прокормителя. Подобный характер отношений ведет к неустойчивости паразитарной системы и требует ряда условий (например, массовости грызунов, их чувствительности к микробу), позволяющих ей существовать. Эти данные согласуются с мнением авторов [8], которые на примере анализа расселения и векторной активности трех наиболее эффективных из известных на сегодняшний день в мире переносчиков (*X. cheopis*, *X. brasiliensis* и *X. vexabilis*) пришли к выводу о связи высокой частоты «блокирования» с исторической молодостью рассматриваемых паразитарных систем.

Осуществлен сравнительный анализ индекса агрегированности микроба у блох с разной векторной активностью (таблица). Обработаны материалы 28 опытов с имаго высокоактивных переносчиков – *X. cheopis* и гибридов двух подвидов *C. tesquorum*, активного переносчика – *C. tesquorum altaicus* и малоактивного – *F. luculenta* [4, 6]. В организме высокоактивных переносчиков (гибридов и *X. cheopis*) формирование «глыбок» почти всегда сопровождается блокообразованием и чаще обеспечивает агональную бактериемию у зверьков, а значит и дальнейшую

Индекс агрегированности чумного микроба у блох с различной векторной активностью

| Вид блох                                             | Векторная активность [источник данных] | Индекс агрегированности | Данные, характеризующие векторную активность блох в экспериментах, взятых в анализ |               |      |                                      |
|------------------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------|------|--------------------------------------|
|                                                      |                                        |                         | Количество мышей, использованных для подкормок                                     | Число передач |      | Передачи с генерализацией инфекции * |
|                                                      |                                        |                         |                                                                                    | абс.          | %    |                                      |
| <i>Xenopsylla cheopis</i>                            | Высокоактивные [5]                     | 1,0                     | 82                                                                                 | 44            | 53,7 | 100                                  |
| Гибриды двух подвидов <i>Citellophilus tesquorum</i> | Высокоактивные [11]                    | 1,8                     | 36                                                                                 | 19            | 52,8 | 100                                  |
| <i>Citellophilus tesquorum</i>                       | Активные [5]                           | 0,1                     | 203                                                                                | 106           | 52,2 | 26,4                                 |
| <i>Frontopsylla luculenta</i>                        | Малоактивные [5]                       | 0                       | 69                                                                                 | 29            | 42,0 | 6,9                                  |

\*От числа заболевших животных.

трансмиссию возбудителя. Именно для этих насекомых характерен максимальный индекс агрегированности микроба – 1,0 и 1,8 соответственно. У активного переносчика (*C. tesquorum altaicus*) данный показатель достоверно ниже – 0,1. При мало различимом числе передач ими чумного микроба (53,7; 52,8 и 52,2 % соответственно) генерализация инфекции наблюдалась у первых двух в 100 % случаев, у последнего – в 26,4 % (от числа заболевших животных). Вместе с тем даже малоактивный переносчик – *F. luculenta*, у которого не обнаружено в опытах «блоков» преджелудка, в связи с чем индекс агрегированности чумного микроба равен нулю, способен заражать экспериментальных животных. Формирование «глыбок» в некоторых опытах отмечали у (34,0–35,5) % этих насекомых, а передачу возбудителя устанавливали, в основном, серологическим методом. Семь процентов зараженных возбудителем чумы белых мышей, использованных для подкормок блох в ранний период после их инфицирования (третьи сутки), погибло с агональной бактериемией [9].

Анализ степени агрегированности чумного микроба в организме блох (наличие «глыбок», «блока») позволил выявить ряд закономерностей в их взаимоотношениях. Образование агрегированных форм существенно зависит как от роли хозяев – прокормителей блох в эпизоотическом процессе, так и от векторной активности самих переносчиков. Формирование «глыбок» происходит у всех исследованных видов блох, причем различия между активными и неактивными переносчиками по данному показателю, в целом, незначительны. Блохи, у которых в опыте не образуется «блок» также способны к передаче возбудителя чумы, причем иногда с генерализацией инфекционного процесса у подопытных зверьков, что может обеспечить непрерывность трансмиссии микроба. Особенно высокий индекс агрегированности возбудителя чумы, превышающий единицу, наблюдается у высокоактивных переносчиков чумы, исторически не контактировавших с возбудителем на исследуемых территориях.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Базанова Л.П., Никитин А.Я., Маевский М.П., Капустин Ю.М. Изменчивость и агрегированность возбудителя чумы как способ его сохранения в организме *Citellophilus tesquorum altaicus* (Siphonaptera). Пробл. особо опасных инф. 2004; 2(88):29–33.

2. Базанова Л.П., Токмакова Е.Г., Маевский М.П. Значение блокированных и неблокированных блох *Citellophilus tesquorum altaicus* (Ioff, 1936) в передаче чумной инфекции. Пробл. особо опасных инф. 2003; 86:14–20.
3. Брюханова Г.Д., Бейер А.П., Гризбековский Г.М., Ефременко В.И., Щедрин В.И., Смирнова Е.Б. Значение агрегированности чумного микроба в передаче его блохами. Мед. паразитол. и паразитарн. бол. 1999; 3:37–40.
4. Ващенко В.С. Блохи (Siphonaptera) – переносчики возбудителей болезней человека и животных. Л.: Наука, 1988; 160 с.
5. Кутырев В.В., Коннов Н.П., Волков Ю.П. Возбудитель чумы: ультраструктура и локализация в переносчике. М.: Медицина; 2007. 224 с.
6. Никитин А.Я., Базанова Л.П., Нечаева Л.К., Корзун В.М., Хабаров А.В., Козец Л.И. Экспериментальное изучение гибридов от скрещивания блохи *Citellophilus tesquorum* двух подвидов передавать возбудителя чумы. Мед. паразитол. и паразитарн. бол. 1995; 4:14–7.
7. Сергиев В.П. Направленное управление паразитами поведением членистоногих – переносчиков. Мед. паразитол. и паразитарн. бол. 2010; 2:49–53.
8. Сунцов В.В., Сунцова Н.И. Чума. Происхождение и эволюция эпизоотической системы (экологические, географические и социальные аспекты). М.; 2006; 247 с.
9. Базанова Л.П., Воронина Г.А., Токмакова Е.Г. Role of fleas *Frontopsylla luculenta luculenta* (Jordan et Rothschild, 1923) from the Transbaikalian natural plague focus in the epizootic process. Scientific Journal. 2006; 14:66–74.
10. Hinnebusch B.J. The evolution of flea-borne transmission in *Yersinia pestis*. Curr. Issues Mol. Biol. 2005; 7:197–212.

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

1. Bazanova L.P., Nikitin A.Ya., Maevsky M.P., Kapustin Yu.M. [Variability and aggregation of the plague agent as a principle of its conservation in the organism of *Citellophilus tesquorum altaicus* (Siphonaptera)]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2004; (88):29–33.
2. Bazanova L.P., Tokmakova E.G., Maevsky M.P. [The role of blocked and unblocked fleas *Citellophilus tesquorum altaicus* (Ioff, 1936) in transmission of plague infection]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2003; (86):14–20.
3. Bryukhanova G.D., Beier A.P., Grizhebovsky G.M., Efremenko V.I., Shchedrin V.I., Smirnova E.B. [The significance of plague microbe aggregation in transmission by fleas]. Med. Parazit. Bol. 1999; 3:37–40.
4. Vashchenok V.S. [Fleas (Siphonaptera) – Transmitters of Disease Causative Agents of Humans and Animals]. L.; 1988. 160 p.
5. Kutyrev V.V., Konnov N.P., Volkov Yu.P. [The Causative Agent of Plague: Ultrastructure and Localization in the Transmitter]. M.; 2007. 224 p.
6. Nikitin A.Ya., Bazanova L.P., Nechaeva L.K., Korzun V.M., Khabarov A.V., Kozets L.I. [Experimental study of the ability of hybrids obtained by crossing two subspecies of the flea *Citellophilus tesquorum* to transmit the plague pathogen]. Med. Parazit. Bol. 1995; 4:14–7.
7. Sergiev V.P. [Targeted parasite control of arthropod vector's behavior]. Med. Parazit. Bol. 2010; 2:49–53.
8. Suntsov V.V., Suntsova N.I. [Plague. Origin and Evolution of Epizootic System (Ecological, Geographical and Social Aspects)]. M.; 2006. 247 p.

#### Authors:

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

#### Об авторах:

Базанова Л.П., Никитин А.Я. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. 664047, Иркутск, ул. Трилисера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Поступила 06.06.12.

А.А.Батурин<sup>1</sup>, В.А.Антонов<sup>1</sup>, В.П.Смелянский<sup>1</sup>, К.В.Жуков<sup>1</sup>, В.Ф.Чернобай<sup>2</sup>, Н.Н.Колякина<sup>2</sup>

## РОЛЬ ПТИЦ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ РЕЗЕРВУАРОВ ВИРУСА ЗАПАДНОГО НИЛА НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

<sup>1</sup>ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград;

<sup>2</sup>ГОУ ВПО «Волгоградский государственный социально-педагогический университет», Волгоград

В обзоре представлены материалы по эпизоотологии ЛЗН у птиц с учетом их миграций. Описаны особенности протекания ЛЗН у диких и синантропных птиц. Рассмотрены экологические связи птиц с комарами, клещами и ВЗН. Охарактеризованы основные направления осенних перелетов птиц, а также данные мониторинга ЛЗН у птиц в различных регионах РФ.

**Ключевые слова:** лихорадка Западного Нила, вирус Западного Нила, дикие и синантропные птицы, миграции, комары, клещи, эпизоотия, вирусная популяция.

A.A.Baturin<sup>1</sup>, V.A.Antonov<sup>1</sup>, V.P.Smelyansky<sup>1</sup>, K.V.Zhukov<sup>1</sup>, V.F.Chernobay<sup>2</sup>, N.N.Kolyakina<sup>2</sup>

## The Role of Birds as Potential Reservoirs of West Nile Virus in the Territory of the Russian Federation

<sup>1</sup>Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd; <sup>2</sup>Volgograd State Socio-Pedagogical University, Volgograd

Submitted are the materials on epizootiology of West Nile Fever in birds, taking into account their migration. Described are the characteristics of WNF in wild and synanthropic birds. Ecological relationships between birds, mosquitoes, ticks and West Nile virus are analyzed. Main autumn bird migratory directions are characterized and the data on WNF monitoring in birds in different geographical regions of Russia are presented.

**Key words:** West Nile fever, West Nile virus, wild and synanthropic birds, migrations, mosquitoes, ticks, epizootics, virus population.

Лихорадка Западного Нила (ЛЗН) – природно-очаговая арбовирусная инфекция с трансмиссивным механизмом передачи возбудителя.

Впервые вирус лихорадки Западного Нила был обнаружен в крови больной женщины в 1937 г. (Уганда, Африка) [20]. Начиная с 1996 г. вирус активно «зашагал» по планете. На сегодняшнем этапе природные очаги ЛЗН зарегистрированы далеко за пределами Африки – в тех регионах, в которых он не был ранее известен – в Евразии и на Американском континенте. В настоящее время на территории Евразии ареал распространения вируса охватывает средиземноморский регион Европы, европейскую часть России, часть Западной Сибири и Юго-Восточной Азии. В последние 20 лет заболеваемость ЛЗН отмечена в большинстве стран СНГ (Республиках Армения, Беларусь, Таджикистан, Азербайджан, Казахстан, Молдова, Туркменистан, Украина и т.д.) [13].

Вирус Западного Нила (ВЗН) принадлежит семейству *Flaviviridae*, роду *Flavivirus*, антигенному комплексу японского энцефалита [14, 19]. Вспышки заболевания начиная с 1996 г., в основном, были вызваны I генотипом вируса. Ситуация кардинально изменилась в 2010–2011 гг., когда крупные вспышки ЛЗН, отмеченные в Европе и на территории Ближнего Востока, были обусловлены II генотипом вируса [2, 12].

Среди гомойотермных хозяев ВЗН основное значение имеют птицы. Основными переносчиками ВЗН в схеме циркуляции вируса: «комар – птица – комар» являются комары родов *Culex* и *Aedes*, реже

*Anopheles*. По данным Роспотребнадзора, в России ВЗН выделен из комаров *Culex modestus*, *Cx. pipiens* (неавтогенная форма *Cx. pipiens f. pipiens* и автогенная форма *Cx. pipiens f. molestus*), *Anopheles hyrcanus*, комплекс *Anopheles maculipennis* и *Coquillettidia richiardii*. К числу потенциальных переносчиков относятся и *Aedes vexans*, вследствие его высокой численности в южных регионах. Род *Culex* является орнитофильным и, в то же время, очень агрессивным по отношению к человеку. Виды данного рода имеют серьезное эпидемиологическое значение в городах, где они круглогодично размножаются в сырых подвалах. Наибольшая численность комаров рода *Culex* наблюдается в июле-августе. В этот же период происходит подъем заболеваемости среди людей, которому обычно предшествуют эпизоотии среди диких, а затем домашних и синантропных птиц [9].

ВЗН был изолирован от большого количества водоплавающих и наземных видов птиц в различных регионах РФ. У диких птиц, как правило, отсутствуют клинические признаки ЛЗН. Предполагается, что это обусловлено генетически за счет адаптации в результате длительных межпопуляционных взаимодействий в системе: комары–вирус–птица. Заражение диких птиц вызывает вирусемию, которая обнаруживается на протяжении 3–5 дней при титрах вируса у разных видов птиц от 1,6 до 4,0 (грачи) lg ЛД<sub>50</sub>/0,03 мл. Этого достаточно для заражения комаров при кровососании их на птицах. Вирус удается обнаружить в фекалиях зараженных цыплят до 4–5 дней, а у зараженных уток – до 7–10 дней. Во внутренних органах птиц ви-

рус обнаруживается до 7–10 дней, по некоторым данным – до 30–180 дней [6]. Доказано, что вирус может присутствовать в органах зараженных уток и голубей в течение 20–100 дней [4, 5].

Имеются экспериментальные данные о наличии хронической почечной инфекции у птиц. У 28 (34 %) из 82 экспериментально инфицированных птиц, относящихся к шести видам, были отмечены положительные результаты ОТ-ПЦР, направленной на выявление РНК вируса во внутренних органах в течение более 6 недель после инфицирования [18]. Таким образом, перелетные птицы способствуют появлению вируса в зонах Евразии с умеренным климатом во время весенних миграций.

Антропоургические очаги ЛЗН носят, как правило, вторичный характер. Адаптация птиц к вирусу в синантропных экосистемах отсутствует. Это служит причиной гибели отдельных особей, а иногда и массового падежа с явлением энцефалита у синантропных птиц. Такая эпизоотия обычно предшествует началу эпидемии, поэтому ворон и цыплят кур используют в качестве «сторожевых, маркерных животных». По результатам их обследования судят о начале и развитии эпизоотии, а затем и эпидемии. Полевые наблюдения подтверждаются экспериментальными исследованиями. У синантропных птиц при экспериментальном заражении может развиваться выраженная клиническая картина заболевания, часто с летальным исходом [6].

Кроме того, в циркуляции ВЗН и сохранении его в природных очагах в неблагоприятные периоды участвуют иксодовые, гамазовые и аргасовые клещи в схеме циркуляции вируса: «клещ – птица – клещ». Изоляция вируса как от птиц, добываемых в непосредственной близости от населенных пунктов, так и паразитирующих на них клещей, является доказательством наличия межпопуляционных связей в сложной системе: дикие птицы – вирус – комары – синантропные птицы – клещи. Если учитывать круглогодичное сохранение вирусной популяции в клещах, то экологическая схема циркуляции вируса приобретает вид: клещи – вирус – птицы наземного комплекса (преимущественно синантропные) – комары – вирус – дикие птицы околотоводного и водного комплекса [6]. Из известных в отечественной фауне клещей, являющихся паразитами птиц, следует отметить следующие виды: *Argas reflexus*, *A. macrostigmatus*, *A. vulgaris*, *A. latus*, *A. tridentatus*, *A. persicus*, *A. beclensishevi*, *Ixodes berlesei*, *I. signatus*, *I. putus*, *I. frontalis*, *I. unicavatus*. Личинки и нимфы каждого из этих клещей прокармливаются более чем на 40 видах птиц [7]. Основное значение в циркуляции ВЗН на юге Европейской части России, по данным Роспотребнадзора, имеют клещи *Hyalomma marginatum* и *Ornithodoros coniceps*.

Инфицированные птицы могут выделять значительное количество вируса в экскрементах, что способствует прямой передаче вируса от птицы к птице или через внешнюю среду [16].

ВЗН многократно был изолирован от птиц, при-

надлежащих к различным семействам, отрядам, родам и видам в различных частях ареала распространения в нашей стране. Особенно часто ВЗН выделяется от ворон, галок, горлиц, пустельги, уток, лысух, дроздов.

На территорию Российской Федерации птицы заносят вирус из стран Африки, Юго-Западной и Юго-Восточной Азии. Из Африки занос вируса в европейскую часть России, по-видимому, осуществляют птицы, придерживающиеся осенью южного и юго-западного направления перелета: озерная чайка, перепел, ласточки, утки, кулики, грачи, скворцы и многие другие птицы. Юго-западное направление осеннего перелета свойственно и птицам Западной Сибири: гуси, утки, кулики, чайки, воробьинообразные. В Восточной Сибири осенний перелет направлен в сторону юго-востока к зимовкам, расположенным в Юго-Восточной Азии [10]. Можно предположить, что в азиатскую часть нашей страны ВЗН заносят птицы, придерживающиеся осенью юго-восточного направления перелета. Кочующие птицы способствуют дальнейшему распространению вируса, расширяя его ареал в Российской Федерации.

Таким образом, перелетные птицы являются главным фактором, поддерживающим существование эпидемических очагов ЛЗН. Не исключено, что различия в путях миграции видов орнитофауны и определяют факт существования очагов инфекции, сформированных разными генотипами на сопредельных территориях как в Европе, так и России. Даже в Волгоградской и Астраханской областях отличаются как видовой состав, так и пути миграции перелетных птиц. Некоторые широко распространенные виды птиц в одних местах перелетные, а в других – оседлые. Так, серая ворона из северных областей России улетает на зимовку в южные области, а на юге эта птица оседлая. Черный дрозд в европейской части России – перелетная птица, а в городах Западной Европы – оседлая. Домовый воробей в европейской части России живет круглый год, а из Средней Азии улетает зимовать в Индию [10].

В российских очагах, в дельтах Кубани и Терека основное значение в распространении ВЗН имеют голенастые, лысуха и некоторые виды уток.

В дельте Волги в циркуляцию вируса вовлекается 56 видов птиц. В приморской части дельты особое значение имеют птицы водно-околотоводного комплекса, в первую очередь голенастые (у 45 % выявляются антитела к ВЗН), а также большой баклан, лысуха, камышница, чомга, в меньшей степени – чайки и крачки. В культурном ландшафте дельты Волги отмечено наибольшее количество очагов ЛЗН, где в этот процесс вовлекается около 20 видов птиц, прежде всего грачи, вороны и голуби [5, 9].

По данным обследования в ОТ-ПЦР, зараженность птиц ВЗН в природных биоценозах оказалась наивысшей в среднем поясе дельты Волги среди бакланов, вдвое ниже среди лысух, в 5 раз ниже у цапель, крачек и чаек. В антропогенных биоценозах среднего и верхнего поясов дельты Волги выявлена

высокая зараженность среди врановых и других птиц наземного комплекса. Кроме того, у врановых птиц обнаружена высокая заклещеванность (до 300 экз. на птице) личинками и нимфами *H. marginatum* [8].

Зараженность птиц наземного комплекса в синантропных биоценозах не превысила 5 %. Положительные пробы были выявлены у черной вороны и обыкновенной кукушки. При этом из вороны и собранных с нее клещей *H. marginatum* было изолировано 2 штамма вируса ЛЗН. По данным частичного секвенирования 5'-концевой области генома, все положительные пробы и полученные штаммы были отнесены к 1-му генотипу вируса ЛЗН [1].

Высокая частота получения положительных результатов при обследовании птиц методом ОТ-ПЦР, возможно, является следствием хронической инфекции ЛЗН с длительным сохранением вируса в организме инфицированных особей [1].

В Волгограде и Волгоградской области, как отмечает ряд авторов, происходит увеличение численности врановых птиц. Птицы семейства врановых особенно восприимчивы к ВЗН, и заболевание у них протекает очень тяжело с высокой смертностью [17]. Из 299 видов птиц, известных в Волгоградской области, врановые представлены 8 видами: сойка (малочисленна 1–5 пар/км<sup>2</sup>), сорока (обычна 6–9 пар/км<sup>2</sup>), кедровка (редка 0,1–0,9 пар/км<sup>2</sup>), галка (обычна 6–9 пар/км<sup>2</sup>), грач (очень многочислен 100 и более пар/км<sup>2</sup>), черная ворона (редка 0,1–0,9 пар/км<sup>2</sup>), серая ворона (очень многочисленна 100 и более пар/км<sup>2</sup>), ворон (малочислен 1–5 пар/км<sup>2</sup>) [15].

На урбанизированных территориях Волгограда выявлено присутствие 81 вида птиц. Видовой состав птиц в биотопах, характеризующихся высокой степенью застройки, значительно беднее (12–19 видов). Доминирующими являются синантропные виды: голубь сизый, ворона серая, воробей домовый.

Городские местообитания с различной степенью антропогенной трансформации весьма существенно отличаются по показателям относительной численности, суммарной биомассы, разнообразия сообществ. Максимальная плотность характерна для районов многоэтажной застройки (379,1–365,7 особей/км<sup>2</sup>), где преобладают виды синантропного комплекса.

По данным исследований Калмыцкого государственного университета, в пределах административных границ населенных пунктов Республики Калмыкия встречается около 109 видов птиц, относящихся к 14 отрядам и 37 семействам, что составляет 36 % всего постоянного видового состава. Это воробьинообразные – 71 вид, ржанкообразные – 10 видов, соколообразные – 8 видов и некоторые другие. На территории Элисты достоверно гнездится 44 вида птиц. На зимовках встречается 22 вида, а в периоды сезонных миграций 28 видов птиц. В Республике Калмыкия с 2000 по 2006 год из 521 пробы от птиц водного и околотоводного комплексов положительными на ВЗН оказались 35 проб [11].

В Краснодарском крае при обследовании 1193

проб от птиц антиген ВЗН был обнаружен в 117 пробах. Антитела к ВЗН были выявлены у 34 видов птиц (Славянский, Темрюкский, Майкопский районы, Сочи) [11].

В Ростовской области лабораториями ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» и ФКУЗ РостНИПЧИ при обследовании объектов внешней среды в 2001–2006 гг. были выявлены антитела к ВЗН у птиц. Случаев массового падежа птиц в сезон 2009–2010 гг. на территории Ростовской области не зарегистрировано [11].

До 2010 г. на территории Воронежской области заболеваемость людей лихорадкой Западного Нила не регистрировалась. В 2010 г. отмечена вспышка ЛЗН, при которой заболело 27 чел. Однако случаев массовых заболеваний и падежа среди животных, в том числе птиц, за последние годы не отмечено [11].

В Ставропольском крае в течение последних шести лет на наличие вируса ЛЗН исследовано 1140 проб головного мозга и 1048 проб печени диких птиц и мелких грызунов. Антиген вируса ЛЗН выявлен в 35 пробах суспензий головного мозга и 36 пробах печени диких птиц и мелких грызунов. Среди птиц наибольшее число положительных проб выявлено у грачей [11].

Водоплавающие птицы, заселяющие Челябинскую область, входят в состав одной из макропопуляций птиц, обитающих на территории России, условно именуемой Западно-Сибирской-Каспийско-Нильской. Главное русло пролета этих птиц приурочено к долинам рек Обь, Тобол, Урал и дельты Волги. Для водных птиц Урала и Зауралья преобладающими зимовками служат районы Каспия, Черного и Средиземного морей. На Каспийском море зимуют: серый гусь, кряква, серая утка, красноголовый нырок, лысуха. К синантропным видам птиц на территории Челябинской области отнесены: голубь, сорока, галка, ворона и воробей.

В 2010 г. на территории Челябинской области зарегистрирован первый случай ЛЗН среди людей. Однако инфекционные заболевания животных, схожие с ЛЗН, не выявлялись. Случаи массового падежа птиц (дикие и синантропные) за последние годы на территории области также не зарегистрированы. Мониторинговое обследование птиц на ЛЗН не проводится [11].

На территории Барабинской и Кулундинской низменностей юга Западной Сибири в летне-осенний период 2002 г. с помощью ИФА было установлено наличие антигенов ВЗН в образцах внутренних органов 3 грачей и 2 чирков. Такой же результат был получен и при детекции РНК ВЗН методом ОТ-ПЦР [14]. В 2003–2004 гг. ВЗН выявлен у представителей семи различных видов птиц – грач, серая ворона, галка, обыкновенный скворец, полевой воробей, обыкновенная овсянка, полевой лунь. Эти находки свидетельствуют о продолжающейся активной циркуляции ВЗН в популяциях как мигрирующих, так и оседлых птиц в этом регионе. Все птицы, у которых были обнаружены маркеры ВЗН, относились к обычным или много-

численными видами. Некоторые из них (грачи, серые вороны, обыкновенные скворцы) могут быть связаны с синантропными биоценозами, что создает предпосылки для интродукции вируса в человеческую популяцию. Секвенированные в эти годы нуклеотидные последовательности филогенетически были наиболее близки к другим современным вариантам ВЗН, циркулирующим на юге Европейской части России [3].

Таким образом, главным фактором, поддерживающим существование эпидемических очагов ЛЗН, являются перелетные птицы. В связи с этим на эндемичных территориях Российской Федерации необходимо проведение системы мониторинга птиц как потенциальных резервуаров ВЗН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альховский С.В., Львов Д.Н., Самохвалов Е.И., Прилипов А.Г., Львов Д.К., Аристова В.А. и др. Обследование птиц дельты Волги (Астраханская область, 2001 г.) на наличие вируса лихорадки Западного Нила методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции. *Вопр. вирусол.* 2003; 1:14–7.
2. Антонов В.А., Смоленский В.Ю., Путинцева Е.В., Липницкий А.В., Смелянский В.П., Яковлев А.Т. и др. Эпидемиологическая ситуация по лихорадке Западного Нила в 2011 году на территории Российской Федерации и прогноз ее развития. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 1(111):17–21.
3. Кононова Ю.В., Терновой В.А., Щелканов М.Ю., Протопопова Е.В., Золотых С.И., Юрлов А.К. и др. Генотипирование вируса Западного Нила в популяциях диких птиц наземного и древесно-кустарникового комплексов на территориях Барабинской лесостепи и Кулундинской степи (2003–2004 гг.). *Вопр. вирусол.* 2006; 4:19–23.
4. Краснова Е.М., Львов Д.К., Жуков А.Н., Штром Л.В., Русакова Н.В., Фролова Г.И. и др. Эпидемиологический мониторинг лихорадки Западного Нила в Волгоградской области. *Вопр. вирусол.* 2001; 4:27–31.
5. Львов Д.К., Писарев В.Б., Петров В.А., Григорьева Н.В. Лихорадка Западного Нила: по материалам вспышек в Волгоградской области в 1999–2002 гг. *Волгоград*; 2004. 102 с.
6. Львов Д.К., Джаркенов А.Ф., Львов Д.Н., Аристова В.А., Ковтунов А.И., Громашевский В.Л. и др. Изоляция вируса лихорадки Западного Нила от большого баклана *Phalacrocorax carbo*, вороны *Corvus corone* и собранных с нее клещей *Hyalomma marginatum* в природных и синантропных биоценозах в дельте Волги (Астраханская область, 2001 г.). *Вопр. вирусол.* 2002; 5:7–12.
7. Львов Д.К., Ильичев В.Д. Миграции птиц и перенос возбудителей инфекции. М.; 1979.
8. Львов Д.К., Ковтунов А.И., Яшкуллов К.Б., Громашевский В.Л., Джаркенов А.Ф., Щелканов М.Ю. и др. Особенности циркуляции вируса Западного Нила (*Flaviviridae*, *Flavivirus*) и некоторых других арбовирусов в экосистемах дельты Волги, Волго-Ахтубинской поймы и сопредельных аридных ландшафтах (2000–2002 гг.). *Вопр. вирусол.* 2004; 3:45–51.
9. Львов Д.К. Лихорадка Западного Нила. *Вопр. вирусол.* 2000; 2:4–9.
10. Михеев А.В. Перелеты птиц. 2-е изд. М.; 1981. 232 с.
11. Онищенко Г.Г., редактор. Сборник материалов по вспышке лихорадки Западного Нила в Российской Федерации в 2010 году. *Волгоград*; 2011. 244 с.
12. Платонов А.Е., Карань Л.С., Шопенская Т.А., Федорова М.В., Колясникова Н.М., Русакова Н.М. и др. Генотипирование штаммов вируса лихорадки Западного Нила, циркулирующих на юге России, как метод эпидемиологического расследования: принципы и результаты. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2011; 2:29–37.
13. Путинцева Е.В., Липницкий А.В., Алексеев В.В., Смелянский В.П., Мананков В.В., Погасий Н.И. и др. Распространение лихорадки Западного Нила в мире и Российской Федерации в 2010 году. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 1(107):38–42.
14. Терновой В.А., Щелканов М.Ю., Шестопалов А.М., Аристова В.А., Протопопова Е.В., Громашевский В.Л. и др. Выявление вируса Западного Нила у птиц на территории Барабинской и Кулундинской низменностей (Западно-Сибирский пролетный путь) в летне-осенний период 2002 г. *Вопр. вирусол.* 2004; 3:52–6.
15. Чернобай В.Ф. Птицы Волгоградской области. *Волгоград*; 2004. 287 с.
16. Kipp A.M., Lehman J.A., Bowen R.A., Fox P.E., Stephens M.R., Klenk K. et al. West Nile virus quantification in feces of experimentally infected American and fish crows. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 75:688–90.
17. Reed K.D., Meece J.K., Henkel J.S., Shukla S.K. Birds, Migration and Emerging Zoonoses: West Nile Virus, Lyme Disease, Influenza A and Enteropathogens. *Clinical Medicine & Research.* 2003; 1:5–12.
18. Reisen W.K., Fang Y., Lothrop H.D., Martinez V.M., Wilson J., O'Connor P. et al. Overwintering of West Nile virus in southern California. *J. Med. Entomol.* 2006; 43:344–55.
19. Savage H.M., Ceianu C., Nicolescu G., Karabatsos N., Lanciotti R., Vladimirescu A. et al. Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes. *Am. J. Trop. Med.* 1999; 61:600–11.
20. Smithburn K.C., Hughes T.P., Burke A.W., Paul J.H. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1940; 20:471–92.

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

1. Al'khovskiy S.V., L'vov D.N., Samokhvalov E.I., Prilipov A.G., L'vov D.K., Aristova V.A. et al. Investigation of birds at the Volga delta (Astrakhan region) on the presence of West Nile virus by means of reverse trans-PCR. *Vopr. Virusol.* 2003; 1:14–7.
2. Antonov V.A., Smolenskiy V.Yu., Putintseva E.V., Lipnitskiy A.V., Smelyanskiy V.P., Yakovlev A.T. et al. [West Nile Fever epidemic situation in the Russian Federation territory in 2011 and prognosis of its development]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; (111):17–21.
3. Kononova Yu.V., Ternovoy V.A., Shchelkanov M.Yu., Protopyopova E.V., Zolotykh S.I., Yurlov A.K. et al. [West Nile virus genotyping among wild birds belonging to ground and tree-brush bird populations in the territories of the Baraba forest-steppe and Kulunda steppe (2003–2004)]. *Vopr. Virusol.* 2006; 4:19–23.
4. Krasnova E.M., L'vov D.K., Zhukov A.N., Shtrum L.V., Rusakova N.V., Frolova G.I. et al. [Epidemiological monitoring of West Nile Fever in the Volgograd region]. *Vopr. Virusol.* 2001; 4:27–31.
5. L'vov D.K., Pisarev V.B., Petrov V.A., Grigoryeva N.V. [West Nile Fever: Following the Outbreaks in the Volgograd Region in 1999–2002]. *Volgograd*; 2004. 102 p.
6. L'vov D.K., Dzharckenov A.F., L'vov D.N., Aristova V.A., Kovtunov A.I., Gromashevskiy V.L. et al. [Isolation of West Nile virus from great cormorant *Phalacrocorax carbo*, crow *Corvus corone* and ticks *Hyalomma marginatum* collected from the crow in natural and synanthropic biocenosis in the Volga delta (Astrakhan region, 2001)]. *Vopr. Virusol.* 2002; 5:7–12.
7. L'vov D.K., Il'ichev V.D. [Birds Migration and Transfer of Infectious Agents]. M.; 1979.
8. L'vov D.K., Kovtunov A.I., Yashkulov K.B., Gromashevskiy V.L., Dzharckenov A.F., Shchelkanov M.Yu. et al. [Circulation features of West Nile virus and other arboviruses in the ecosystems of the Volga delta, Volgo-Akhtubinskaya bottomland and adjoining arid landscapes (2000–2002)]. *Vopr. Virusol.* 2004; 3:45–51.
9. L'vov D.K. [West Nile Fever]. *Vopr. Virusol.* 2000; 2:4–9.
10. Mikheev A.V. [Migration of Birds]. M.; 1981. 232 p.
11. Onishchenko G.G., editor. [Collection of Materials on West Nile Fever Outbreak in the Russian Federation in 2010]. *Volgograd*; 2011. 244 p.
12. Platonov A.E., Karan' L.S., Shopenkaya T.A., Fedorova M.V., Kolyasnikova N.M., Rusakova N.M. et al. [Genotyping of West Nile fever virus strains circulating in Southern Russia as an epidemiological investigation method: principles and results]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2011; 2:29–37.
13. Putintseva E.V., Lipnitskiy A.V., Alekseev V.V., Smelyanskiy V.P., Manankov V.V., Pogasiy N.I. et al. [Dissemination of the West Nile Fever in the Russian Federation and in the World in 2010]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; (107):38–42.
14. Ternovoy V.A., Shchelkanov M.Yu., Shestopalov A.M., Aristova V.A., Protopyopova E.V., Gromashevskiy V.L. et al. [Detection of West Nile virus in birds in the territories of Baraba and Kulunda steppe (West-Siberian flight route) in summer-autumn 2002]. *Vopr. Virusol.* 2004; 3:52–56.
15. Chernobay V.F. [Birds of the Volgograd Region]. *Volgograd*; 2004. 287 p.

## Authors:

Baturin A.A., Antonov V.A., Smelyanskiy V.P., Zhukov K.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russia. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Chernobay V.F., Kolyakina N.N. Volgograd State Socio-Pedagogical University. Volgograd.

## Об авторах:

Батурин А.А., Антонов В.А., Смелянский В.П., Жуков К.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Чернобай В.Ф., Колякина Н.Н. Волгоградский государственный социально-педагогический университет. Волгоград.

Получила 11.05.12.

З.Ф.Дугаржапова, М.В.Чеснокова, А.В.Родзиковский

## ЭПИЗООТОЛОГО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО СИБИРСКОЙ ЯЗВЕ НА ТЕРРИТОРИЯХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, СОПРЕДЕЛЬНЫХ С МОНГОЛИЕЙ

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

Проведена оценка эпизоотологической и эпидемиологической ситуации по сибирской язве на сопредельных с Монголией территориях республик Алтай, Бурятия и Тыва, Забайкальского края за 1985–2010 гг. Республики Бурятия и Тыва, Забайкальский край относятся к территориям с выраженным эпизоотолого-эпидемиологическим неблагополучием, Республика Алтай – к относительно благополучной. В связи с большой протяженностью границ, наличием почвенных очагов, расширением торгово-экономического сотрудничества, увеличением пассажиро- и грузопотока необходимо совместное сотрудничество по мониторингу почвенных очагов и прогнозированию эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по сибирской язве.

*Ключевые слова:* сибирская язва, стационарно неблагополучный пункт, заболеваемость, эпидемиология, эпизоотология.

Z.F.Dugarzhapova, M.V.Chesnokova, A.V.Rodzikovsky

### Epizootiological and Epidemiological Situation on Anthrax in the Territories of Russia Bordering Mongolia

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

Carried out is the analysis of epizootiological and epidemiological situation on anthrax in the Republics of Altai, Buryatia and Tuva and the Trans-Baikal Region bordering Mongolia for the period of 1985–2010. The Republics of Buryatia and Tuva, and the Trans-Baikal Region are the territories with unsafe epizootiological and epidemiological situation, while the Altai Republic is relatively safe territory in this regard. Long extension of frontiers, intensification of trade and economic cooperation, passenger and cargo traffic increase, and existence of soil foci predetermine the necessity of inter-state partnership in monitoring these foci and making forecast on anthrax epizootiological and epidemiological situation.

*Key words:* anthrax, specified potentially hazardous area, morbidity, epidemiology, epizootiology.

Сибирская язва – сапрозоонозная особо опасная болезнь, сохраняющая социально-экономическую значимость в связи с тяжестью ее течения, стойкостью почвенных очагов, широким распространением во многих странах мира [5]. Предположительно, эта инфекционная болезнь возникла в эпоху плейстоцена в Центральной Азии и впоследствии с кочевыми народами распространилась и укоренилась на территории Сибири [1], чему способствовали природно-климатические условия региона, особенности землепользования, занятия охотой и скотоводством.

Сибирь – одна из наиболее неблагополучных по сибирской язве территорий Российской Федерации. Протяженность границ южных регионов Сибири с Монголией составляет 3441 км. На приграничных территориях Сибири исторически проходили «Великий чайный путь» и скотопрогонные трассы, вдоль которых сконцентрированы очаги сибиреязвенной инфекции. В четырех приграничных субъектах имеются 24 пункта пропуска государственной границы (2 аэропорта, 19 международных автомобильных и 3 железнодорожных).

В Монголии эпизоотическое неблагополучие выражено в северных и центральных регионах страны. В аймаках Сэлэнгэ, Хэнтий, Баян-Олгий, Ховсгол, граничащих с Российской Федерацией, постоянно отмечаются случаи заболевания животных и людей сибирской язвой. В 2004–2007 гг. значительно воз-

росла заболеваемость животных и людей в стране. В аймаке Дорнод в 2007 г. отмечалась эпизоотия сибирской язвы с эпидемическими осложнениями, соответственно увеличилось выделение культур сибиреязвенного микроба до 69 [7, 8].

Цель работы – оценка эпизоотологической и эпидемиологической ситуации по сибирской язве на сопредельных с Монголией территориях республик Алтай, Бурятия и Тыва, Забайкальского края за 1985–2011 гг.

### Материалы и методы

Сбор данных по эпизоотологии и эпидемиологии сибирской язвы проведен за 27-летний период (1985–2011 гг.) в четырех субъектах Сибири (республики Алтай, Бурятия, Тыва и Забайкальский край) по статистическим и отчетным формам Роспотребнадзора и Россельхознадзора. Сведения о количестве и видовом составе сельскохозяйственных животных (СХЖ) Сибири получены из электронных источников информации Федеральной службы государственной статистики [2]. Проведен анализ кадастров стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов приграничных субъектов Российской Федерации [4].

Причины и условия возникновения sporadических случаев и трех вспышек сибирской язвы в Республике Бурятия (1999 и 2008 гг.), в Забайкальском

крае (1996 г.) оценивались при анализе карт эпидемиологического обследования очага зоонозной инфекции (ф. 391/у), историй болезни (ф. 027/у) и донесений о вспышечной заболеваемости. Эпизоотологические и эпидемиологические данные оценивались на основе статистических методов эпидемиологического анализа [6].

### Результаты и обсуждение

В Сибири учтено 6689 стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов (СНП), из которых 13,4 % расположены в приграничных субъектах Сибири (899). В Республике Бурятия находится 41,0 % СНП (369), Забайкальском крае – 38,0 % (342), Республике Тыва – 14,8 % (133) и Республике Алтай – 6,1 % (55). Показатели плотности СНП в убывающей последовательности отмечаются в республиках Бурятия (1,05 на тыс. км<sup>2</sup>), Тыва (0,78), Забайкальском крае (0,76) и Республике Алтай (0,59).

За 1985–2011 гг. сибирская язва зарегистрирована в трех приграничных с Монголией субъектах Российской Федерации (таблица), в Республике Алтай последний случай установлен в 1961 г. За этот период на юге Сибири сибирская язва среди животных зарегистрирована в 21 СНП (2,3±0,7) %, из них в 11 (1,3±0,4) % пунктах отмечались эпидемические осложнения. Наиболее высокая эпизоотическая (7,5±2,2) % и эпидемическая (3,0±1,0) % активность СНП наблюдалась в Республике Тыва. В Республике Бурятия и Забайкальском крае эпизоотически активны 1,5–1,6 % СНП. За исследуемый период сибирская язва отмечалась в 10 вновь выявленных СНП, из них 5 в Республике Тыва в 1988 и 2001 гг. (с. Тээли, м. Шат Бай-Тайгинского района и с. Ак-Эрик, п. Бурлун-Аксы, м. Бажи Эрзинского района). В 2008 г. произошла вспышка сибирской язви в двух новых СНП Ассули и Тогсохо Баргузинского района Республики Бурятия. В трех СНП Забайкальского края (с. Угдан и с. Новая Читинского района, с. Сахюрта Агинского района) эпизоотии отмечались в 1996 и 2002 гг.

Следует отметить, что за анализируемый период эпизоотическая и эпидемическая активность СНП юга Сибири была различной. В 14,3 % случаев сибирская язва проявилась через 30–39 лет в республиках Бурятия и Тыва. В естественных резервуарах СНП Иркана Республики Бурятия и Кулусутай Забайкальского края возбудитель сибирской язви со-

хранился более 80 лет.

С учетом индекса эпизоотичности по М.Г.Таршису (ИЭТ) [3] Республика Тыва (ИЭТ 0,0114) относится к зоне потенциально высокого риска заражения возбудителем сибирской язви, Республика Бурятия (0,0010) и Забайкальский край (0,0014) входят в зону среднего риска.

На эпизоотологическую ситуацию по сибирской язве оказывали влияние социально-экономические факторы. В период экономического кризиса 90-х годов в сибирском регионе в 2,6 раза снизилось общее поголовье СХЖ, в Республике Бурятия и Забайкальском крае в 5–6 раз уменьшилось поголовье МРС. Отмечалось снижение заболеваемости скота, и в течение ряда лет сибирская язва не регистрировалась. Затем в трех субъектах юга Сибири заболели сибирской язвой 138 голов СХЖ в 21 СНП. Бактериологическое лабораторное подтверждение получено в (14,0±2,9) % случаев, у 19 голов СХЖ выделена культура *Bacillus anthracis*. Среднегодовой уровень (1985–2011 гг.) заболеваемости СХЖ по Сибири составил (0,087±0,003) ‰. Наиболее высокая заболеваемость, превышающая региональное значение, отмечена в Республике Бурятия – (0,473±0,358) ‰, Забайкальском крае – (0,232±0,157) ‰. Весь заболевший скот принадлежал владельцам индивидуальных и фермерских хозяйств, в которых животные не были привиты против сибирской язви.

За исследуемый период в субъектах юга Сибири в 88,4 % случаев регистрировались вспышечные заболевания СХЖ, преимущественно в Республике Бурятия (71,3 %), где зарегистрированы три крупные эпизоотии сибирской язви. В местности Иркана Северо-Байкальского района в декабре 1994 – январе 1995 гг. зарегистрирована эпизоотия сибирской язви, когда пало и вынужденно забито семь голов КРС. В 1999 г. в Кяхтинском районе республики пало и вынужденно забито 17 голов СХЖ (16 КРС и 1 лошадь). В июне 2008 г. эпизоотия в Баргузинском районе началась с падежа овец (51), с последующим вовлечением КРС (4), лошадей (3) и свиней (4). Эпизоотии сибирской язви регистрировались в Ононском районе Забайкальского края в 1996 г. (20 голов КРС) и в Сретенском районе в 2002 г. (6 голов КРС). В Республике Тыва преобладала спорадическая заболеваемость (68,8 %), за исключением Эрзинского района, когда в 2001 и 2003 гг. пали 9 голов СХЖ.

Эпизоотологическую ситуацию по сибирской язве на юге Сибири определяет в большей степени КРС (54,3±4,2) %, что объясняется значительным преобладанием количества его поголовья. Высокая доля заболевшего МРС (38,5±4,1) % обусловлена бесконтрольным пастбищным выпасом. Заболевания лошадей и свиней выражены в меньшей степени (по 3,6 %).

Сезонные эпизоотические проявления сибирской язви длились с первой декады мая по последнюю декаду июля. Случаи заболевания СХЖ в зим-

Эпизоотическая и эпидемическая активности СНП в приграничных с Монголией субъектах Сибири (1985–2011 гг.)

| Субъекты           | СНП | Плотность СНП, тыс. км <sup>2</sup> | Активные СНП  |         |              |         |
|--------------------|-----|-------------------------------------|---------------|---------|--------------|---------|
|                    |     |                                     | эпизоотически |         | эпидемически |         |
|                    |     |                                     | абс. ч.       | %       | абс. ч.      | %       |
| Республика Алтай   | 55  | 0,59                                | 0             | 0       | 0            | 0       |
| Республика Бурятия | 369 | 1,05                                | 6             | 1,6±0,5 | 5            | 1,4±0,5 |
| Республика Тыва    | 133 | 0,78                                | 10            | 7,5±2,2 | 4            | 3,0±1,0 |
| Забайкальский край | 342 | 0,76                                | 5             | 1,5±0,4 | 2            | 0,6±0,2 |
| Всего              | 899 | 0,87                                | 21            | 2,3±0,7 | 11           | 1,2±0,4 |

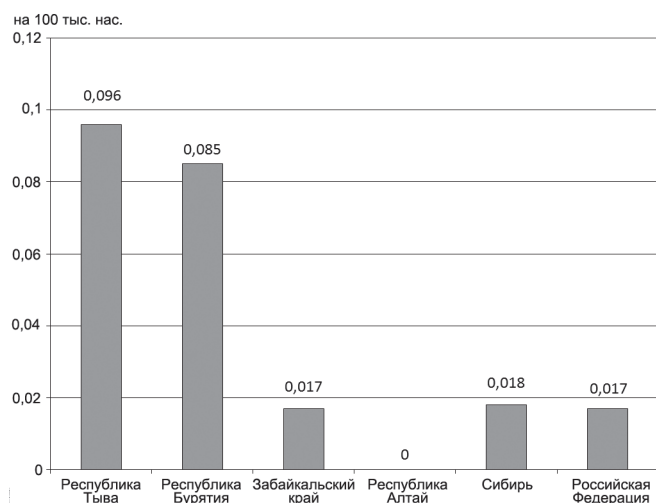
ний период в местности Иркана связаны с использованием инфицированных спорами *B. anthracis* кормов, которые были заготовлены на территории затопляемого паводковыми водами сибирезвонного скотомогильника.

За 27 лет наблюдений на юге Сибири заболели 37 человек. Наиболее высокий уровень заболеваемости отмечается в республиках Тыва ( $0,096 \pm 0,009$ ) $^{\circ}_{\text{на 100 тыс. нас.}}$  и Бурятия ( $0,085 \pm 0,011$ ) $^{\circ}_{\text{на 100 тыс. нас.}}$ , превышающий средне-сибирский ( $0,018 \pm 0,007$ ) $^{\circ}_{\text{на 100 тыс. нас.}}$  в 5,6 и 4,7 раза, а среднефедеральный уровень ( $0,017 \pm 0,003$ ) $^{\circ}_{\text{на 100 тыс. нас.}}$  – в 6,0 и 5,0 раз соответственно (рисунок). На юге Сибири преобладала вспышечная заболеваемость ( $86,5 \pm 27,9$ ) %.

Эпизоотии сибирской язвы повлекли эпидемические осложнения в 1996 г. в Забайкальском крае (4 случая) и Республике Тыва (3 случая), в 1999 г. (14 случаев) и 2008 г. (8 случаев) – в Республике Бурятия.

Все заболевшие не привиты против сибирской язвы. К группе риска относилось сельское население (95,8 %) в возрасте 20–29 (27,0 %) и 40–49 (24,3 %) лет. Заболевания лиц в возрасте 15–19 лет (5,4 %), занимавшихся разделкой туш, погрузкой и транспортировкой мяса и мясопродуктов, зарегистрированы в Республике Бурятия. В Республике Тыва отмечены четыре случая заболевания детей до 14 лет (10,8 %), заражение которых произошло при оказании ими помощи в разделке туш скота при вынужденном убое. Мужчины (91,9 %) болели в 11,3 раза чаще, чем женщины. Инфицирование трех женщин в Республике Бурятия произошло при кулинарной обработке зараженного мяса и мясопродуктов. Среди непрофессиональных групп населения гораздо чаще болели безработные (40,5 %) и владельцы частных хозяйств (35,1 %), из-за активного участия в вынужденном убое. Подобные эпидемиологические закономерности позволяют отнести регистрируемую заболеваемость сибирской язвой к непрофессиональной группе приусадебного типа животноводческого подтипа [5].

Диагноз сибирской язвы установлен на основании клинических проявлений с учетом эпидемио-



Заболеваемость сибирской язвой в приграничных с Монголией субъектах Российской Федерации за 1985–2011 гг. (на 100 тыс. населения)

логического анамнеза. Длительность инкубационного периода составила от 1 до 8 дней, в среднем ( $4,0 \pm 1,9$ ) сут. По клиническим проявлениям преобладала кожная форма болезни (МКБ-10 A22.0) в 89,2 % (33 чел.), у трех человек – генерализованная сибирезвонная септицемия (A22.7), у одного – желудочно-кишечная (A22.2). Один больной умер от генерализованной формы болезни, летальность составила 5,4 %. Лабораторно подтверждены 16 случаев (43,2 %) заболевания. Клинический диагноз подтвержден бактериологически в 5,4 % случаев (культуры *B. anthracis* выделены от двух больных в Республике Бурятия и Забайкальском крае), положительной антраксиновой пробой – 29,7 %, ПЦР и МФА – по 5,4 %.

Достоверно установлено, что источниками заражения сибирской язвой людей явились КРС (94,6 %) и МРС (2,7 %). В одном случае (2,7 %) источник инфекции выявить не удалось. Основными причинами возникновения заболеваний были вынужденный убой скота в частных хозяйствах без ветеринарного освидетельствования, разделка туш и снятие шкур (94,6 %); употребление мяса, мясопродуктов и контакт с кожсырьем (по 2,7 %).

Соотношение заболеваний СХЖ и людей в среднем составляло 3,7:1, наблюдалась корреляционная связь между заболеваемостью животных и людей ( $r_s = 0,77$ ;  $p < 0,01$ ).

При районировании сибирского региона с учетом последовательного ранжирования среднепоказателей заболеваемости сибирской язвой животных и людей, индекса эпизоотичности по Таршису и плотности СНП, республики Бурятия, Тыва и Забайкальский край отнесены к территориям с выраженным эпизоотолого-эпидемиологическим неблагополучием по сибирской язве. Ввиду отсутствия заболеваний СХЖ и людей за изученный период, малого количества СНП и низкой их плотности, Республика Алтай является территорией относительного благополучия по сибирской язве.

Проведенный анализ ситуации на сопредельных с Монголией территориях четырех субъектов Российской Федерации показал выраженное эпизоотолого-эпидемиологическое неблагополучие по сибирской язве в республиках Бурятия и Тыва и Забайкальском крае; преобладание вспышечной заболеваемости среди животных и людей; превалирование заболеваний КРС в фермерских хозяйствах и личных подворьях; риск заражения животных не только в старых СНП, но и во вновь выявленных. Причиной эпидемических осложнений был бесконтрольный вынужденный убой инфицированного скота, разделка туш и снятие шкур, что обуславливало преобладание кожной формы болезни среди непрофессиональных групп населения.

Большая протяженность границ между Монголией и Российской Федерацией, наличие почвенных очагов сибирезвонной инфекции на приграничных территориях и бывших скотопроектных трассах, расширение торгово-экономического со-

трудничества, увеличение пассажиро- и грузопотока требуют совместных работ по оценке эпизоотолого-эпидемиологической опасности на сопредельных территориях в целях проведения мониторинга почвенных очагов сибирской язвы и прогнозирования эпизоотологической и эпидемиологической ситуаций за этой особо опасной болезнью.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Краминский В.А., Соркин Ю.И. Некоторые вопросы палеоэпизоотологии и палеоэпидемиологии сибирской язвы. Пробл. особо опасных инф. 1970; 1(11):70–7.
2. Поголовье основных видов скота в хозяйствах всех категорий, тысяч голов. Сибирский федеральный округ [http://www.gks.ru/scripts/db\\_inet/dbinet.cgi?pl](http://www.gks.ru/scripts/db_inet/dbinet.cgi?pl) (дата обращения 10.12.2011).
3. Таршиц М.Г. Эпизоотологический прогноз и противоэпизоотический план. М.: Россельхозиздат; 1972. 110 с.
4. Черкасский Б.Л., редактор. Кадастр стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации. М.: ОАО «ИнтерСЭН»; 2005. 829 с.
5. Черкасский Б.Л. Эпидемиология и профилактика сибирской язвы. М.: ОАО «ИнтерСЭН»; 2002. 384 с.
6. Шаханина И.А., Кучеровская Т.П., Черкова Т.П. Применение различных методов эпидемиологического анализа при оценке сезонности и территориального распространения инфекционных болезней. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1990; 5:43–7.
7. Adiyasuren Z., Burmaa Kh., Undraa B., Narmandakh R., Uranshagai N. Dynamics and epidemiological situation of human anthrax morbidity in Mongolia. Scientific Journal. Ulaanbaatar; 2008. 16:11–7.
8. Batbaatar E., Bolormaa G., Erdenechimeg M. Epidemiological

and epizootological features of anthrax cases, registered during 2002–2006 in Mongolia. Scientific Journal. Ulaanbaatar; 2007. 15:15–9.

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

1. Kraminsky V.A., Sorokin Yu. I. [Some questions of paleoepizootiology and paleoepidemiology of anthrax]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 1970; (11):70–7.
2. [Major live stock (thousands heads) in all categories of farms. Siberian Federal District] (cited 10.12.2011) Available from: [http://www.gks.ru/scripts/db\\_inet/dbinet.cgi?pl](http://www.gks.ru/scripts/db_inet/dbinet.cgi?pl)
3. Tarshis M.G. [Epizootologic Prognosis and Anti-Epizootic Plan]. M.; 1972. 110 p.
4. Cherkassky B.L., editor. [Cadaster of the Specified Potentially-Hazardous Areas (as Related to Anthrax) in the Territory of the Russian Federation]. M.; 2005. 829 p.
5. Cherkassky B.L. [Epidemiology and Prevention of Anthrax]. M.: 2002. 384 p.
6. Shakhaniina I.A., Kuchеровskaya T.P., Cherkova T.P. [Applying different methods of epidemiological analysis in assessment of seasonality and territorial expansion of infectious diseases]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1990; 5:43–7.

## Authors:

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

## Об авторах:

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

Поступила 13.01.12.

Е.А.Манин, Г.И.Лямкин, Н.И.Тихенко, Д.В.Русанова, А.Д.Антоненко, Г.Д.Брюханова

## СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА БРУЦЕЛЛЕЗОМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИС-ТЕХНОЛОГИЙ

*ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь*

Предложена методика использования программного продукта ArcGIS 10 в эпидемиологическом надзоре за бруцеллезом в Ставропольском крае (СК). Разработана структура баз данных по эпидемиологии и эпизоотологии бруцеллеза в субъекте Российской Федерации. Разработаны две базы данных (Эпидемиология бруцеллеза в СК, Эпизоотология бруцеллеза в СК), совместимые с ArcGIS 10. Проведено районирование территории СК по риску инфицирования бруцеллезом (РИБ) с использованием программы Arc GIS 10.

*Ключевые слова:* бруцеллез, ГИС-технологии, базы данных, эпидемиологический надзор за бруцеллезом, риск инфицирования бруцеллезом.

E.A.Manin, G.I.Lyamkin, N.I.Tikhenko, D.V.Rusanova, A.D.Antonenko, G.D.Bryukhanova

## Improvement of the Epidemiological Surveillance over Brucellosis Using GIS-Technologies

*Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol*

Put forward is the method of usage of Arc GIS 10 software product for epidemiological surveillance over brucellosis in the Stavropol region (SR). Designed is the structure of databases on epidemiology and epizootiology of brucellosis in the constituent entity of the Russian Federation. Constructed are two databases (Epidemiology of brucellosis in the SR and Epizootiology of brucellosis in the SR) compatible with Arc GIS 10. Carried out is the zoning of the SR territories based on assessment of the risk of infecting with brucellosis, using Arc GIS computer program.

*Key words:* brucellosis, GIS-technologies, databases, epidemiological surveillance over brucellosis, risk of infecting with brucellosis.

Заболеваемость бруцеллезом в Российской Федерации на протяжении последних лет не имеет тенденции к снижению и стабилизировалась на уровне 400–500 случаев впервые выявленного бруцеллеза. В ряде административных субъектов Северо-Кавказского, Южного и Сибирского федеральных округов вследствие эпизоотического неблагополучия бруцеллез остается широко распространенной инфекцией и причиной значительных экономических потерь в животноводческой отрасли сельского хозяйства, что усугубляется заболеванием людей, которое нередко приводит к потере трудоспособности и инвалидности [2].

Сохраняющаяся напряженная эпидемическая обстановка по бруцеллезу в Российской Федерации обуславливает необходимость дальнейшего совершенствования эпидемиологического надзора за данной инфекцией, внедрения новых методов оценки эпизоотолого-эпидемического состояния на основе современных информационных технологий.

В Российской Федерации к настоящему времени разработаны методики применения ГИС при эпиднадзоре за чумой, ГЛПС, брюшным тифом, сибирской язвой [1, 4].

За рубежом эпидемиологический анализ с использованием ГИС проводился в ФРГ (мониторинг пространственного распределения заболеваемости кишечными инфекциями с учетом структуры водоснабжения) [5], Испании (прогнозирование ареала популяций иксодовых клещей) [6], Украине (разработаны электронные карты распространения 7-й

пандемии холеры в мире и на территории Украины), Казахстане (создана электронная база данных по фенотипическим и генотипическим признакам атипичных штаммов чумного микроба) [3].

Целью работы явилось совершенствование эпидемиологического надзора за бруцеллезом в СК на основе создания системы хранения информации (базы данных по эпизоотологии и эпидемиологии бруцеллеза), визуализации этой информации на карте СК и дальнейший ее анализ с использованием программы Arc GIS 10.

### Материалы и методы

Материалом для исследования служили данные Управления Роспотребнадзора по СК о заболеваемости бруцеллезом людей, Управления ветеринарии в СК о заболеваемости бруцеллезом сельскохозяйственных животных, а также данные Территориального органа Федеральной службы Государственной статистики по СК об основных социально-демографических показателях за период 2006–2011 гг.

Аналізу были подвергнуты 347 эпидемиологических карт больных бруцеллезом людей в СК и сведения о 398 пунктах, неблагополучных по бруцеллезу животных в СК за период 2006–2011 гг.

Статистический анализ данных проводили с использованием общепринятых методов.

В работе использовали электронные карты России и Ставропольского края. Наложение данных на карту и их дальнейший эпидемиологический

анализ осуществляли с использованием программы ArcGIS 10 фирмы ESRI (США).

В процессе статистической обработки и создания баз данных, были использованы программные продукты Microsoft Office Excel и Microsoft Office Access 2007. Текстовый и графический материал оформлен на персональном компьютере IBM Pentium IV в программных продуктах «Microsoft Office 2007».

### Результаты и обсуждение

В качестве модели для применения ГИС-технологий в эпидемиологическом надзоре за бруцеллезом был выбран Ставропольский край, являющийся одним из наиболее неблагополучных регионов Северо-Кавказского федерального округа Российской Федерации по данной инфекции, в котором в последние 5 лет наблюдается тенденция к росту заболеваемости.

В 2011 г. в крае заболело 76 чел. (и.п. – 2,73, превышающий общероссийский показатель в 8 раз), выявлены 91 неблагополучный пункт по бруцеллезу крупного рогатого скота (КРС) и 6 – по бруцеллезу мелкого рогатого скота (МРС).

Приступая к решению задачи по совершенствованию эпиднадзора за бруцеллезом с использованием ГИС, нами проведен сбор данных и анализ эпизоотолого-эпидемиологической обстановки по бруцеллезу в СК за 2006–2011 гг.

Для упорядочения и хранения эпизоотолого-эпидемиологической информации, находившейся в большинстве случаев на бумажных носителях, и обеспечения быстрого доступа к ней нами выбраны электронные базы данных программного продукта Microsoft Office Access, которые были структурированы и наполнены данными по эпидемиологии и эпизоотологии бруцеллеза в СК.

В результате нами были разработаны две базы данных по бруцеллезу в СК. База данных «Эпидемиология бруцеллеза в СК» содержит такие эпидемиологически значимые показатели, как пол, возраст, дата выявления заболевания (число, месяц, год), место заболевания (район, населенный пункт), категория населения (сельское, городское) профессия, тяжесть заболевания, факторы передачи, пути заражения, источник инфекции.

База данных «Эпизоотология бруцеллеза в СК» содержит следующие эпизоотологические данные: дата регистрации заболевания (месяц, год), категория хозяйства, место заболевания (район, населенный пункт), вид животного (КРС, МРС), количество заболевших животных.

Обработка информации, содержащейся в базах данных, осуществлялась по средствам интегрированных функций запроса и создания отчетов, позволяющих быстро находить, анализировать, а также выводить полученные данные в виде доступных для пользователя отчетов на монитор персонального компьютера.

Для визуализации хранящейся в базах данных информации на карте СК и проведения пространственно-временного анализа эпизоотолого-эпидемиологических данных по бруцеллезу нами был использован программный продукт ArcGIS 10. Эта программа позволила не только визуализировать данные на карте края в виде отдельно обозначенных точек, соответствующих координатам мест регистрации заболеваний людей бруцеллезом и неблагополучным по бруцеллезу пунктам животных, но и проводить многомерный эпизоотолого-эпидемиологический анализ, накладывая тематические слои с данными друг на друга, основываясь на «привязанной» к каждой точке информации по эпизоотологии и эпидемиологии бруцеллеза, содержащейся в базах.

Отображение информации, хранящейся в базах данных, и последующий ее анализ возможен с использованием следующих 4 способов:

первый – нанесение на электронную карту СК точек, которые соответствуют координатам местности, где зарегистрированы случаи заболевания людей бруцеллезом и неблагополучные пункты по заболеваемости животных за исследуемый период;

второй (более привычный для пользователя) – отображение информации в виде атрибутивных таблиц определенного слоя;

третий – отображение информации в виде диаграмм, которые наглядно показывают соотношение между различными данными как на всей территории края, так и для каждого из 26 районов в отдельности;

четвертый (районирование) – отображение информации градуированными цветами на основе расчета показателей риска инфицирования бруцеллезом (РИБ) производимого по методике О.В.Кедровой и соавт.

Картографирование и дифференциация административных территорий края по уровню заболеваемости осуществлялась с использованием функции программы ArcGIS 10 – распределение по квантильным группам. В результате территория края была разделена на 4 группы: с низкими, средними, высокими и очень высокими показателями РИБ.

К административным территориям с низкими показателями РИБ (0–0,69) отнесены Советский район, города Ставрополь, Невинномысск, Минеральные воды, Железноводск, Пятигорск, Кисловодск; со средним РИБ (0,70–2,28) – Грачевский, Изобильненский, Ипатовский, Кочубеевский, Красногвардейский, Новоалександровский, Минераловодский, Предгорный, Шпаковский районы; с высоким РИБ (2,29–5,22) – Александровский, Андроповский, Апанасенковский, Буденновский, Георгиевский, Кировский, Петровский, Труновский районы; с очень высоким РИБ (5,23–16,16) – Арзгирский, Благодарненский, Курский, Левокумский, Нефтекумский, Новоселицкий, Степновский, Туркменский административные районы.

Таким образом, разработаны методика использования ГИС-технологий в эпидемиологическом над-

зоре за бруцеллезом (на примере Ставропольского края) и приложение на основе ArcGIS 10 – «Эпидемиологический надзор за бруцеллезом в Ставропольском крае», обеспечивающее автоматизацию процессов сбора, хранения, обработки данных по бруцеллезу на административных территориях края и возможность сопоставлять их с оперативной эпидемиологической информацией.

Впервые разработана структура электронных баз данных по эпидемиологии и эпизоотологии бруцеллеза в субъекте Российской Федерации. Созданы базы данных «Эпидемиология бруцеллеза в СК» и «Эпизоотология бруцеллеза в СК» совместимые с ArcGIS 10 и наполнены эпизоотолого-эпидемиологической информацией за период с 2006 по 2011 год.

Проведено районирование территории СК по риску инфицирования бруцеллезом с применением квантильного анализа программы ArcGIS 10, выделены административные районы с низкими, средними, высокими и очень высокими показателями РИБ. Районирование территории СК позволяет принимать управленческие решения по вопросам дифференцированного планирования профилактических мероприятий.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дубянский В.М. Оценка вероятности выявления эпизоотий чумы при минимальном уровне интенсивности эпизоотического процесса, рассчитанном путем его моделирования. Пробл. особо опасных инф. 2011; 2(108):19–21.
2. Лямкин Г.И., Тихенко Н.И., Манин Е.А., Русанова Д.В., Головнёва С.И., Вилинская С.В., Куличенко А.Н. Об эпидемической ситуации и заболеваемости бруцеллезом в Российской Федерации в 2011 г. и прогноз на 2012 г. Пробл. особо опасных инф. 2012; 1(111):26–9.

3. Мека-Меченко Т.В., Некрасова Л.Е., Садовская В.П., Дубянский В.М., Лукхнова Л.Ю., Бегимбаева Э.Ж. Географическая информационная система (ГИС) в микробиологическом мониторинге чумы. Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане. Алматы, 2011; 1–2 (23–24):120–6.

4. Черкасский Б.Л., Форстман Д.В., Локтионова М.Н., Шабейкин А.А., Фаизов Т.Х. Опыт использования ГИС-технологий для изучения закономерностей пространственно-временного распределения стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов. Эпидемиол. и инф. бол. 2005; 6:19–23.

5. Dangendorf F., Herbst S., Reintjes R., Kistemann T. Spatial patterns of diarrhoeal illnesses with regard to water supply structures – a GIS analysis. Int. J. Hyg. Environ. Health. 2002; 205(3):183–91.

6. Peña A. E. Epidemiological surveillance of tick populations: A model to predict the colonization success of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). Eur. J. Epidemiol. 1997; 13(5):573–80.

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

1. Dubyanskii V.M. [Evaluation of probability of plague epizootics detection at the minimal level of epizootic process intensity measured using its modeling]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2011; (108):19–21.
2. Lyamkin G.I., Tikhenko N.I., Manin E.A., Rusanova D.V., Golovneva S.I., Vilinskaya S.V., Kulichenko A.N. [Brucellosis epidemiological situation and its morbidity in the Russian Federation in 2011, and prognosis for 2012]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2012; (111):26–9.
3. Meka-Mechenko T.V., Nekrasova L.E., Sadovskaya V.P., Dubyansky V.M., Lukhnova L.Yu., Begimbaeva E.Zh. [Usage of geo-information system (GIS) in microbiological plague monitoring]. Karant. Zoonoz. Infek. v Kazakhstane. Almaty, 2011; 1–2 (23–24):120–6.
4. Cherkassky B.L., Fortsman D.V., Loktionova M.N., Shabeikin A.A., Faizov T.Kh. [Experience in usage of GIS technologies for studies of regularities in spatiotemporal distribution of potentially hazardous areas as concerned with anthrax]. Epidemiol. Infek. Bol. 2005; 6:19–23.

#### Authors:

Manin E.A., Lyamkin G.I., Tikhenko N.I., Rusanova D.V., Antonenko A.D., Bryukhanova G.D. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

#### Об авторах:

Манин Е.А., Лямкин Г.И., Тихенко Н.И., Русанова Д.В., Антоненко А.Д., Брюханова Г.Д. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 24.07.12.

А.К.Никифоров, Е.Г.Абрамова, С.А.Еремин, М.Н.Ляпин

**ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ОБЕСПЕЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ РАБОТ  
СО ШТАММАМИ ФИКСИРОВАННОГО ВИРУСА БЕШЕНСТВА  
ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА***ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

Проведен анализ работы со штаммами фиксированного вируса бешенства в условиях производства антирабического иммуноглобулина. Дана оценка эффективности разработанной системы биологической безопасности, обеспечивающей безопасное производство антирабического иммуноглобулина на протяжении 12 лет.

*Ключевые слова:* биологическая безопасность, фиксированный вирус бешенства, оценка риска

A.K.Nikiforov, E.G.Abramova, S.A.Eremin, M.N.Lyapin

**Evaluation of the Effectiveness as to the Provision of Biological Safety of Works  
with Fixed Rabies Virus in the Process of Anti-Rabies Immunoglobulin Manufacturing***Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov*

Analyzed is the performance of works with the strains of fixed rabies virus under the conditions of anti-rabies immunoglobulin manufacturing. Evaluated is the effectiveness of the established system for the provision of biological safety, which has allowed for safe manufacturing of anti-rabies immunoglobulin within the period of 12 years.

*Key words:* biological safety, fixed rabies virus, risk assessment.

В классических работах R.M.Pike и S.E.Sulkin [9–12, 14] сообщалось о 4079 случаях лабораторного заражения при работе с возбудителями инфекционных болезней, которые привели к 168 смертельным исходам, произошедшим между 1930 и 1978 гг. Однако в 2000 г. A.L.Harding и K.B.Byers [6] отмечают, что улучшение качества лабораторного оборудования, совершенствование технических средств контроля и возросшее внимание к микробиологической технике безопасности смогли внести существенный вклад в снижение случаев лабораторного инфицирования за последние два десятилетия.

Особое место в укреплении лабораторной биологической безопасности отводится разработке регламентирующих документов, публикациям, посвященным указанной теме. Многие опубликованные работы освещают практические приемы и методы, которые позволяют предотвратить случаи внутрилабораторного заражения [4, 13]. Наше сообщение относится к указанной категории публикаций и базируется на двенадцатилетнем опыте работы со штаммами фиксированного вируса бешенства (*virus fixe*), используемыми при производстве антирабического иммуноглобулина.

Цель исследования – оценка эффективности обеспечения биологической безопасности работ со штаммами фиксированного вируса бешенства при производстве антирабического иммуноглобулина.

**Материалы и методы**

Материалом для исследования служили нормативные документы (методические указания, регламент производства, стандартные операционные процеду-

ры), регламентированные лабораторные методики, а также используемое при работе с фиксированным вирусом бешенства технологическое оборудование и квалификационные требования, предъявляемые к персоналу лаборатории. В работе использовали аналитический метод с инструментальной оценкой рисков.

**Результаты и обсуждение**

В 1999 г. согласно решению межведомственной комиссии Совета безопасности Российской Федерации по охране здоровья населения (№ 1 от 24.10.2000 г.) и поручению Главного государственного санитарного врача Российской Федерации (№ 2510/12020-99-26 от 09.11.99 г.) институт «Микроб» приступил к организации технологической линии по масштабному производству гетерологичного антирабического иммуноглобулина. В процессе производства иммуноглобулина предусмотрено использование штаммов фиксированного вируса бешенства – штамма Москва 3253 для иммунизации лошадей-продуцентов и штамма CVS для постановки регламентированных контрольных тестов.

Одной из основополагающих задач вновь созданной в 1999 г. лаборатории профилактических иммуноглобулинов являлась разработка нормативных документов, регламентирующих правила работы с производственными штаммами фиксированного вируса бешенства. Таким документом стали методические указания «Безопасность работы с производственными штаммами фиксированного вируса бешенства» (МУ 3.3.1.1099-02, 2002). Разработке подобных документов предшествует процедура оценки опасности внутрилабораторного заражения с позиций оценки рисков [4, 5, 7]. Результатом ее выпол-

нения является определение степени опасности для обоснования и выработки комплекса адекватных мероприятий по обеспечению безопасности работ с конкретным возбудителем в конкретных условиях, включая производственные.

На начальных этапах работы необходимо было четко сформулировать и оценить риски, с которыми могут столкнуться сотрудники, выполняющие стандартные технологические операции по изготовлению органотканевого рабического антигена.

Оценка риска представляет собой аналитический процесс, результаты которого позволяют выбрать подходящие практические методики, оборудование и определить требования к помещениям, которые способны предотвратить или минимизировать риск внутрилабораторного заражения до приемлемого уровня.

Основными факторами, которые были учтены при оценке риска и выборе мер предосторожности при работе с *virus fixe*, являются группа патогенности возбудителя и степень опасности лабораторных процедур.

Одним из эффективных инструментов для проведения оценки микробиологического риска является перечень критериев, лежащих в основе формирования групп риска при работе с патогенными биологическими агентами.

По классификации Всемирной организации здравоохранения, возбудители инфекционных заболеваний дифференцируются на четыре группы риска [6]. Однако простая ссылка на группу риска для фиксированных штаммов вируса бешенства была недостаточна для проведения оценки опасности.

Помимо критериев, отражающих степень опасности возбудителя инфекции, были приняты во внимание следующие дополнительные факторы: степень аттенуации штамма и его периферическая активность; потенциальные последствия возможного инфицирования; естественные пути передачи возбудителя; возможные пути инфицирования, вызванные манипуляциями в лабораторных условиях (парентеральный, воздушно-капельный); устойчивость вируса к факторам внешней среды; концентрация агента и объем материалов, которые предполагается использовать в работе; наличие на рабочем месте эффективных препаратов для местной обработки и постэкспозиционной профилактики.

Ранее были даны определения «фиксированный вирус бешенства» и «фиксация» [1]. Фиксированный вирус бешенства – это аттенуированный вирус уличного бешенства. Аттенуация была достигнута многократным пассированием на лабораторных животных, в результате чего вирус утратил способность поражать периферические нервы. Однако мы не осветили в полном объеме указанные выше вопросы, а именно: фиксированный вирус бешенства *Rabies virus* относится к роду *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae*; способен вызывать заболевание только при интрацеребральном способе введения; полностью утратил способность накапливаться в слюне инфицирован-

ного животного. В связи с этим у штаммов фиксированного вируса бешенства отсутствует возможность естественного пути передачи. Помимо этого, он устойчив во внешней среде [3].

Понятие «аттенуированный» в отношении штаммов фиксированного вируса бешенства позволяет отнести их к III группе патогенности в соответствии с Санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». Однако степень аттенуации требует уточнения, в частности, в вопросах использования названных штаммов при производстве антирабического иммуноглобулина.

Проведя углубленный литературный поиск, мы смогли документально доказать, что штамм фиксированного вируса бешенства Москва 3253 в течение многих лет применялся для приготовления антирабических вакцин с целью профилактики бешенства у людей [2]. Вакцину изготовляли из мозговой суспензии овец, инфицированных штаммом Москва 3253, и инактивировали добавлением фенола с экспозицией в течение 24 ч. Более того, в ответ на разлитую послевоенную эпизоотию бешенства было принято решение интенсифицировать антирабическое лечение и вводить пациентам данный тип вакцины неинактивированным. На протяжении четырех лет (с 1946 по 1949 год) препарат вакцины, представлявший собой 5 % вирусосодержащую неинактивированную мозговую суспензию, вводили пациентам подкожно в клетчатку живота ежедневно на протяжении 40 дней в суммарном объеме, достигавшем 240 мл [3]. Учитывая данные аргументы, совместно со специалистами Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Кольцово, Новосибирская обл.) и лаборатории бешенства и оспы ГИСК им. Л.А.Тарасевича (НЦ ЭСМП, Москва) было принято коллегиальное решение об отнесении производственных штаммов фиксированного вируса бешенства к III группе патогенности, а фиксацию – к способам аттенуации.

Вторым по значимости критерием при оценке степени риска являются лабораторные манипуляции. В начале работы была определена степень опасности при экспериментах, связанных с заражением и вскрытием лабораторных животных, которые осуществляли на принципах моделирования и оценки принципиальной опасности и риска с позиций технического регулирования. Нами было установлено, что методики заражения и вскрытия лабораторных животных при работе с фиксированным вирусом бешенства весьма специфичны и требуют подробного рассмотрения с позиций биологической безопасности.

Критические этапы при проведении производственных процедур по приготовлению рабического антигена, выявленные при оценке рисков, связаны с интрацеребральным заражением лабораторных

животных, трепанацией черепа и получением вирусосодержащей мозговой суспензии [8]. Основная опасность при манипуляциях, связанных с внутримозговым введением маточной культуры фиксированного вируса бешенства, обусловлена возможностью аэрозольного загрязнения воздушной среды лабораторного помещения. Кроме того, данный этап работы опасен тем, что во время проведения манипуляций животное может травмировать кожные покровы экспериментатора (укус, царапина). При изготовлении органотканевого рабического антигена для иммунизации продуцентов предусмотрены работы, связанные с использованием больших объемов инфицированного материала, что, согласно правилам СП 1.3.1285-03, оценивается как повышенная степень опасности и регламентирует использование дополнительных средств защиты персонала от возможного аэрозольного заражения.

На стадии трепанации черепной коробки кролика также присутствует опасность получения сотрудником травмы острым режущим инструментом или осколком кости, а на стадии приготовления мозговой суспензии высок риск создания аэрозоля.

В процессе разработки стандартных операционных процедур особое внимание было уделено указанным выше методикам с целью минимизации риска возникновения аварийной ситуации. Во-первых, во время работ по заражению лабораторных животных было регламентировано использование I типа противочумного костюма. Во-вторых, строго регламентировано количество персонала, выполняющего те или иные манипуляции с животными и их органами. В-третьих, при интрацеребральном заражении кроликов предусмотрена обязательная фиксация животного на станке, ограничивающая его подвижность, и использование специально разработанного пробойника для облегчения прохождения иглы шприца через черепную коробку. Фиксация животного в станке позволяет снизить риск получения травмы экспериментатором, а использование пробойника предупреждает забивание иглы костной тканью и снижает риск разбрызгивания инфицированного материала из шприца.

Для выполнения операции трепанации черепной коробки кролика был разработан специальный станок, обеспечивающий надежную фиксацию черепной коробки, что в значительной мере снижает риск получения травмы экспериментатором.

Вопрос в отношении возможности инфицирования персонала фиксированным вирусом бешенства воздушно-капельным путем при проведении манипуляций в лабораторных и производственных условиях в доступной литературе не изучался, что с методологических позиций безопасности требует рассмотрения сценария по наиболее неблагоприятному варианту. Для защиты сотрудников от аэрозоля, содержащего вирус бешенства, который может возникать при приготовлении мозговой суспензии, данный технологический этап был локализован в контролируемые условия бокса биологической безопасности

1БП2-ОС, подключенного к системе вентиляции, оснащенной фильтрами тонкой очистки воздуха и используемого в качестве прототипа бокса биологической безопасности III класса.

Не менее важным условием обеспечения безопасной работы при производстве антирабического иммуноглобулина, несомненно, являются требования к уровню квалификации персонала. К работе с фиксированными штаммами вируса бешенства допускаются специалисты, прошедшие профессиональную переподготовку с основами безопасной работы с патогенными биологическими агентами, регулярно повышающие квалификацию и имеющие соответствующий сертификат. Персонал допускается к работе с ПБА приказом директора учреждения после проведенной комиссионно проверки знаний действующей нормативно-методической, инструктивной документации и практических навыков. Кроме того, у всех сотрудников подразделения регулярно проверяют знания санитарных правил по безопасности работ с микроорганизмами I–IV групп патогенности, методических указаний и стандартных операционных процедур.

Производство антирабического иммуноглобулина в РосНИПЧИ «Микроб», организованное в 1999 г., начиналось с отработки технологических этапов получения препарата и выпуска экспериментальных серий. Серийный выпуск производственных серий препарата был налажен в 2004 г. С каждым годом происходило наращивание темпов и объемов производства, что, естественно, сопровождалось увеличением объемов изготовления органотканевого рабического антигена с использованием инфицированного материала и возрастанием количества инфицированных интрацеребрально животных (таблица).

Несмотря на десятикратное увеличение масштаба производственных работ по выпуску антирабического иммуноглобулина, за двенадцать лет наблюдений не было ни одного случая аварии при работе с

**Объемы производственных работ по изготовлению органотканевого рабического антигена и препарата иммуноглобулина антирабического**

| Год           | Кол-во инфицированных интрацеребрально фиксированным вирусом бешенства и вскрытых кроликов | Объем изготовленного органотканевого рабического антигена, л | Объем произведенного препарата иммуноглобулина антирабического, л |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 2000          | 505                                                                                        | 30,3                                                         | 30,0 *                                                            |
| 2001          | 1246                                                                                       | 74,76                                                        | 45,0 *                                                            |
| 2002          | 1014                                                                                       | 60,84                                                        | 50,0 *                                                            |
| 2003          | 1260                                                                                       | 75,6                                                         | 55,0 *                                                            |
| 2004          | 1051                                                                                       | 63,06                                                        | 71,9                                                              |
| 2005          | 1450                                                                                       | 87,0                                                         | 115,5                                                             |
| 2006          | 964                                                                                        | 53,2                                                         | 102,9                                                             |
| 2007          | 1160                                                                                       | 55,7                                                         | 165,6                                                             |
| 2008          | 1248                                                                                       | 73,31                                                        | 227,4                                                             |
| 2009          | 1656                                                                                       | 93,66                                                        | 250,0                                                             |
| 2010          | 1317                                                                                       | 131,7                                                        | 250,0                                                             |
| 2011          | 1758                                                                                       | 143,9                                                        | 315,0                                                             |
| <b>Итого:</b> | <b>14629</b>                                                                               | <b>943,03</b>                                                | <b>1698,3</b>                                                     |

\* Экспериментальные серии препарата.

фиксированным вирусом бешенства, в т.ч. получение травм сотрудниками подразделения.

Таким образом, можно заключить, что определенные в 1999 г. риски, разработанные нормативные документы (методические указания, регламент производства, стандартные операционные процедуры), регламентированные лабораторные методики, установленное технологическое оборудование и высокие квалификационные требования к персоналу лаборатории позволили создать эффективную систему биологической безопасности при производстве антирабического иммуноглобулина.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Никифоров А.К., Дятлов И.А., Еремин С.А., Волох О.А., Ляпин М.Н. Оценка риска как основа обеспечения биобезопасности работ с производственными штаммами фиксированного вируса бешенства. Пробл. особо опасных инф. 2006; 2(92):38–40.
2. Селимов М.А., Морогова В.М. Феноловые лиофилизированные вакцины из мозговой ткани овец. В кн.: Методы лабораторных исследований по бешенству. Женева: ВОЗ; 1975. С. 201–3.
3. Селимов М.А. Бешенство. М.: Медицина; 1978. 336 с.
4. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL). 5<sup>th</sup> edition. U.S. Department of Health and Human Services; Public Health Service; Centers for Disease Control and Prevention; National Institutes of Health; 2007. 360 p.
5. Fundamentals of biosafety in laboratories. 3rd edition. Department of Foreign Affairs and International Trade (Canada); 2004. 108 p.
6. Harding A.L., Byers K.B. Epidemiology of Laboratory-Associated Infection. In: *Fleming D.O., Hunt D.L.* Biological Safety: principles and practices. 3rd ed. Washington DC: ASM Press; 2000. P. 35–54.
7. Laboratory biosafety manual. 3<sup>rd</sup> edition. Geneva: WHO;

2004. 190 p.

8. Meslin F.-X., Kaplan V.V., Koprowsky H., editors. Laboratory techniques in rabies. Geneva: WHO; 1996. 469 p.
9. Pike R.M., Sulkin S.E., Schulze M.L. Continuing importance of laboratory-acquired infections. Am. J. Pub. Hlth. 1965; 55:190–9.
10. Pike R.M. Laboratory-associated infections: summary and analysis of 3921 cases. Health. Lab. Sci. 1976; 13:105–14.
11. Pike R.M. Past and present hazards of working with infectious agents. Arch. Pathol. Lab. Med. 1978; 102:333–6.
12. Pike R.M. Laboratory-associated infections: incidence, fatalities, causes, and prevention. Annu. Rev. Microbiol. 1979; 33: 41–66.
13. Richardson J.H., Barkley W.E., editors. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. 1st ed. Washington, DC; 1984.
14. Sulkin S.E., Pike R.M. Survey of laboratory-acquired infections. Am. J. Pub. Hlth. 1951; 41:769–81.

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

1. Nikiforov A.K., Dyatlov I.A., Yeremin S.A., Volokh O.A., Lyapin M.N. [Qualification of the risks as the basis for assuring biologically safe handling of the rabies virus production strains]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2006; (92):38–40.
2. Selimov M.A., Morogova V.M. [Phenol lyophilized vaccines obtained from the brain tissue of sheep]. In: [Methods of laboratory investigations on rabies virus]. Geneva: WHO; 1975. P. 201–3.
3. Selimov M.A. [Rabies]. M.: Meditsina; 1978. 336 p.

#### Authors:

Nikiforov A.K., Abramova E.G., Eremin S.A., Lyapin M.N. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrap@microbe.ru

#### Об авторах:

Никифоров А.К., Абрамова Е.Г., Еремин С.А., Ляпин М.Н. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Поступила 09.04.12.

Д.А.Будыка, А.И.Бондаренко, А.А.Фисун, Н.В.Абзаева, Г.Ф.Иванова, С.Е.Гостищева, С.М.Руднев

# КАЧЕСТВЕННЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ МИКРОБНЫХ КЛЕТОК ШТАММА *YERSINIA PESTIS* EV В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИХ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ ПРИ РАЗНЫХ ТЕМПЕРАТУРНЫХ УСЛОВИЯХ БИОТЕХНОЛОГИИ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПРЕПАРАТА ВАКЦИНЫ ЧУМНОЙ

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь

Выбор в пользу температурного режима культивирования клеток вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV ( $21\pm 1$ ) °C вместо ( $27\pm 1$ ) при изготовлении вакцины чумной живой экспериментально подтверждает известный факт включения в биоструктуры клеточных мембран при низких температурах повышенного содержания не-предельных жирных кислот, усиливающих адаптивную способность к экстремальным факторам замораживания-высушивания. Рассмотрена и предложена оригинальная трактовка механизма устойчивости мелких микробных клеток, образующихся при температуре ( $21\pm 1$ ) °C вследствие меньшего повреждающего воздействия молекул пара при возгонке в процессе лиофилизации.

**Ключевые слова:** температурный режим, вакцина чумная живая, параметры качества готового препарата, электронная микроскопия, морфология клетки, лиофилизация.

D.A.Budyka, A.I.Bondarenko, A.A.Fisun, N.V.Abzaeva, G.F.Ivanova, S.E.Gostishcheva, S.M.Rudnev

## Qualitative Indicators of Microbial Cells of *Yersinia pestis* EV Strain Depending on Their Morphological Traits in Different Temperature Conditions of Manufacturing of Plague Vaccine Preparation

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol

The preference of the ( $21\pm 1$ ) °C temperature for cultivation of the vaccine strain *Yersinia pestis* EV in the live plague vaccine biomass production to ( $27\pm 1$ ) °C is experimentally confirmed. An original interpretation of the mechanism of small cells stability that are formed at ( $21\pm 1$ ) °C has been proposed. This interpretation stipulates a smaller damaging effect of steam molecules during sublimation in the process of lyophilization.

**Key words:** temperature condition, live plague vaccine, quality parameters of stock-produced preparation, electron microscopy, cell morphology, lyophilization.

В сложном процессе биотехнологии производства вакцины чумной живой температура культивирования микробных клеток вакцинного штамма является одним из рычагов, позволяющих существенно повысить ростовые свойства биомассы и, в конечном итоге, оптимизировать качественные параметры готовой продукции. В настоящее время в нормативной документации на препарат заложен традиционно используемый в течение нескольких десятилетий температурный режим культивирования микробных клеток ( $27\pm 1$ ) °C, а также дополнительно ( $21\pm 1$ ) °C, позволивший получать бактериальное сырье как с исходно более высокими показателями жизнеспособности микробных клеток, так и с наилучшими характеристиками по термо- и ксерорезистентности биомассы [3].

В процессе разработки и внедрения ( $21\pm 1$ ) °C температуры культивирования мы обратили внимание на тот факт, что в ходе бактериоскопического контроля этапов производства на специфическую стерильность клетки чумного микроба *Yersinia pestis* EV были меньших размеров в сравнении с теми, которые выращивали при температуре ( $27\pm 1$ ) °C.

Целью данного сообщения является изучение значения морфометрических показателей клеток вакцины чумной живой для более глубокого понимания процессов, происходящих во время лиофилизации.

## Материалы и методы

Исследовали образцы вакцины, приготовленные из биомасс, выращенных при обеих температурах культивирования. После чего готовили препараты для исследования под электронным микроскопом, фотографировали несколько полей зрения при инструментальном увеличении  $\times 4000$ . Полученные негативы сканировали специальным прибором и в последующем работали с цифровыми копиями.

В качестве изучаемого морфометрического показателя нами был выбран поперечный размер клетки. Это было обусловлено тем, что продольный размер имеет значительную вариабельность из-за постоянного роста и размножения клеток. Замеры поперечного сечения фотокопий клеток проводили с помощью компьютера в миллиметрах. Результаты измерений делили на инструментальное увеличение

микроскопа  $\times 4000$  и определяли истинное значение поперечного сечения клеток.

Статистическую обработку проводили общепринятым методом [5].

### Результаты и обсуждение

Для двух температурных режимов было сделано 44 измерения. В результате поперечный размер клеток, выращенных при температуре  $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$ , составил  $(0,67 \pm 0,03)$  мкм, а при  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$  –  $(0,88 \pm 0,02)$  мкм,  $P < 0,001$ .

Уменьшение размеров клеток, выращенных при более низких температурах, может быть вызвано тем, что изменяется их физиологическая активность. Поскольку по основным параметрам (жизнеспособность, термостабильность) мы отмечали улучшение качества препаратов, полученных при более низкой температуре культивирования микробных клеток, можно предположить, что в этом случае в их мембранных структурах (цитоплазматическая мембрана и мембрана клеточной стенки) липидные слои представлены в большей степени ненасыщенными жирными кислотами. Это, в свою очередь, делает мембраны менее уязвимыми к таким факторам, как замораживание при низких температурах с последующей лиофилизацией. Изложенное подтверждается и литературными данными [1, 4].

При сублимационной сушке происходят мощные газовые потоки, образующие в ампуле с 2 мл суспензии почти 20000 л пара, эвакуация которого через толщу замороженного блока, по образному выражению Б.И.Бланкова и Д.А.Клебанова [2], «бомбардирует» поверхность клеток миллиардами перемещающихся частиц. Такая «бомбардировка» наиболее вредное воздействие оказывает на пограничные системы клеток, которые играют важную роль в жизнеобеспечении микробов. Поэтому уменьшение размеров клеток сказывается положительно при лиофилизации, поскольку такие клетки испытывают меньшее воздействие молекул пара.

Воздействие пара на клетки показано на рисунке, из которого следует, что при уменьшении объема клеток уменьшается и площадь, на которую воздействуют потоки пара. Другая положительная сторона уменьшения размеров клеток заключается в том, что при прочих равных условиях и одинаковых концентрациях клеткам с меньшими размерами будет не так «тесно» в контейнере, в сравнении с более крупными в момент механического воздействия кристаллов льда, образующихся при замерзании.

Несмотря на то, что температура культивирования  $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$  микробных клеток штамма EV не является традиционно оптимальной и приводит к уменьшению размера клеток, данная биомасса характеризуется более высокими показателями жизнеспособности и лучше переживает процессы замораживания и лиофилизации, в сравнении с  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$  культурами.

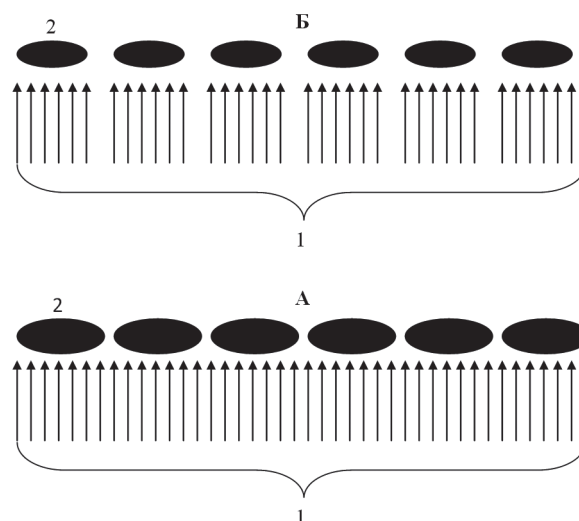


Схема воздействия пара (1) на клетки (2) при их обычных (А) и при уменьшенных размерах (Б)

Так, исходная жизнеспособность  $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$  серий вакцины составила в среднем  $(47,1 \pm 3,7)\%$ , в то время как в сериях  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$  регистрировался показатель в  $(30,7 \pm 2,8)\%$ . А термостабильность препарата соответственно была  $(12,4 \pm 0,92)$  и  $(10,8 \pm 0,1)$  сут.

По истечении 3 лет показатель жизнеспособности микробов в ампуле  $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$  составил  $(34,3 \pm 3,4)\%$ , что существенно превосходит регламентированный (25 %). Наибольшее снижение жизнеспособности зарегистрировано у  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$  образцов –  $(18,0 \pm 2,2)\%$ .

По данным электронной микроскопии, процент поврежденных клеток в вакцинных препаратах из  $(21 \pm 1)$  и  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$  составил соответственно  $(4 \pm 0,2)$  и  $(7,5 \pm 0,6)$ .

Таким образом, снижение температуры культивирования биомассы чумного вакцинного штамма EV в биотехнологии препарата вакцины чумной живой с  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$  до  $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$  обеспечивает более высокие кондиции конечного продукта не только вследствие оптимизации биохимических механизмов, препятствующих повреждающему воздействию факторов замораживания-высушивания, но и, очевидно, более подходящих морфологических параметров микробных клеток, имея в виду уменьшение физического воздействия на менее крупные клеточные корпускулы в процессе возгонки молекул пара при лиофилизации.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алутин И.М., Домарадский И.В., Суичмезова А.В. Изучение динамики размножения некоторых видов микроорганизмов с помощью политермостата. Пробл. особо опасных инф. 1973; 1(29):182–9.
2. Бланков Б.И., Клебанов Д.А. Применение лиофилизации в микробиологии. М.: Медгиз, 1961. С. 209–11.
3. Будыка Д.А., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф., Фисун А.А., Ляпустина Л.В. Сравнительный анализ экспериментальных серий вакцины чумной живой по показателям жизнеспособности и термостабильности. Пробл. особо опасных инф. 2009; 4(102):68–71.
4. Еременко Ю.Д., Бывалов А.А., Пименов Е.В. Особенности жирно-кислотного состава клеток *Yersinia pseudotuberculosis*, выращенных на плотной питательной среде при различных тем-

пературах. Пробл. особо опасных инф. 2005; (89):41–3.

5. Ойвин И.А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований. Патол. физиол. 1960; 4:76–85.

2005; 89:41–3

5. Oivin I.A. [Statistical processing of results from experimental investigations]. Patol. Physiol. 1960; 4:76–85.

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

1. Alutin I.M., Domaradsky I.V., Suichmezova A.V. [Study of the propagation dynamics in some species of microorganisms using polythermostat]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 1973; 29:182–9.
2. Blankov B.I., Klebanov D.A. [Application of the Lyophilization in Microbiology]. M.: Medgiz; 1961. P. 209–11.
3. Budyka D.A., Abzaeva N.V., Ivanova G.F., Fisun A.A., Lyapustina L.V. [Comparative analysis of experimental series of plague live vaccine as for viability and thermostability indices]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2009; 102:68–71.
4. Eremenko Yu.D., Byvalov A.A., Pimenov E.V. [Peculiarities of fatty-acid composition of *Yersinia pseudotuberculosis* cells grown on solid nutritional medium at different temperatures]. Probl. Osobo Opasn. Infek.

**Authors:**

Budyka D.A., Bondarenko A.I., Fisun A.A., Abzaeva N.V., Ivanova G.F., Gostishcheva S.E., Rudnev S.M. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

**Об авторах:**

Будыка Д.А., Бондаренко А.И., Фисун А.А., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф., Гостищева С.Е., Руднев С.М. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 17.05.12.

Н.П.Коннов, С.П.Заднова, О.С.Кузнецов

## ИССЛЕДОВАНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ДВУХ ФЕНОТИПИЧЕСКИ РАЗЛИЧНЫХ КЛОНОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА МЕТОДАМИ ТРАНСМИССИОННОЙ И СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

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

Представлены данные по изучению ультраструктуры двух фенотипически различных клонов (токсигенного и нетоксигенного) штамма *Vibrio cholerae* Дакка 35 методами электронной микроскопии. На поверхности бактерий у нетоксигенного клона обнаружен дополнительный слой (капсула) полисахаридной природы (отсутствующий у токсигенного), который способствовал изменению морфологии колоний.

**Ключевые слова:** *Vibrio cholerae*, токсигенные и нетоксигенные клетки, экзополисахаридный слой, трансмиссионная и сканирующая электронная микроскопия.

N.P.Konnov, S.P.Zadnova, O.S.Kuznetsov

### Examination of the Ultrastructure of Two Phenotypically Different Clones of *V. cholerae* by Means of Transmission and Scanning Electron Microscopy

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Submitted are the data of examination of the ultrastructure of two phenotypically different clones (toxigenic and non-toxigenic) of *V. cholerae* Dakka35 strain by means of electron microscopy. Additional layer (capsule) of polysaccharide nature is identified on the surface of non-toxigenic clone bacteria. This layer (absent in toxigenic clone) alters colony morphology.

**Key words:** *Vibrio cholerae*, toxigenic and non-toxigenic cells, exopolysaccharide layer, transmission and scanning electron microscopy.

Несмотря на глубокие биологические и генетические исследования возбудителя холеры, многие свойства этого патогена остаются малоизученными. В частности, в настоящее время установлено, что популяция холерных вибрионов выделенных из различных сред обитания (от больных холерой, вибрионосителей, внешней среды) является гетерогенной [5, 6]. При изучении популяционного состава природных штаммов холерного вибриона классического биовара, выделенных на территории Пакистана и Индии в 1942–1969 гг. и хранящихся в Государственной коллекции патогенных бактерий института «Микроб», были выявлены штаммы, в популяции которых присутствовали как типичные мелкие прозрачные Т-колонии (от англ. translucent), так и формирующие атипичные опалесцирующие мутные О-колонии (от англ. opaque). По данным ряда авторов [2, 7], изменение морфологии колоний таких штаммов коррелировало с изменением их признаков, в частности, они отличались по продукции ряда факторов патогенности, вирулентности и персистенции.

Существование различий в морфологии колоний могло быть связано с изменением биосинтеза поверхностных структур клетки, включая белки внешней мембраны, и экзополисахаридного слоя, обнаруженного у холерных вибрионов эльтор [4, 9]. Более того, появление клонов с атипичной морфологией могло быть следствием избирательной активности набора различных генов, в том числе и генов вирулентности [11].

В ранее проведенных исследованиях были обна-

ружены штаммы *Vibrio cholerae* классического биовара – Дакка 35, 9361 и В1307, популяции которых содержали колонии двух типов, отличающихся друг от друга не только по морфологии, продукции растворимой гемагглютинин/протеазы, подвижности, но и по уровню синтеза холерного токсина. По данным реакции пассивного иммунного гемолиза (РПИГ), Т-колонии указанных штаммов продуцировали холерный токсин (Tox<sup>+</sup> фенотип), тогда как О-клоны не синтезировали этот белок (Tox<sup>-</sup> фенотип) [2]. Поскольку различия между колониями по четырем свойствам были наиболее выражены у штамма Дакка 35 серогруппы О1 классического биовара, то именно этот штамм был выбран в качестве модельного для последующих экспериментов.

В связи с вышеизложенным, целью наших исследований было изучение особенностей ультраструктуры бактерий *Vibrio cholerae* Дакка 35 и обнаруженных ими колоний методами трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии.

### Материалы и методы

В качестве питательных сред использовали бульон и агар Хоттингера (pH 7,2), LB-бульон и агар (pH 6,8). Бактерии токсигенного и нетоксигенного вариантов штамма Дакка 35 выращивали в течение суток при 37 °С. Трансмиссионную электронную микроскопию проводили, применяя следующие варианты исследований: метод ультратонких срезов, негативного контрастирования, электронно-

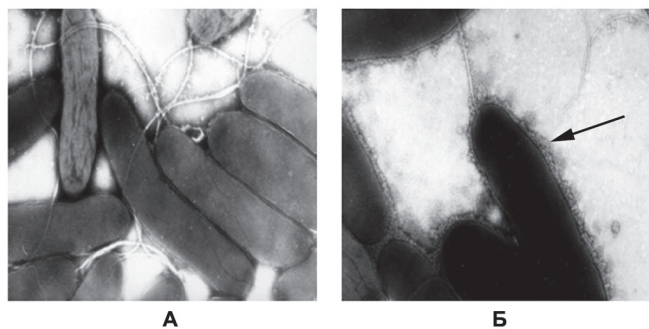


Рис. 1. Электронограмма поверхности клеток Т- (А) и О- (Б) клонов штамма *V. cholerae* Дакка 35. Стрелкой показан дополнительный слой, присутствующий на внешней поверхности клеток О-клона. Негативное контрастирование ФВК. Увеличение  $\times 30000$

гистохимический метод, а также сканирующую электронную микроскопию [3]. Препараты просматривали в электронном микроскопе HU-12A и его сканирующей приставке HSE-2 («Hitachi», Япония).

### Результаты и обсуждение

Для выявления особенностей клеточных структур, участвующих в изменении морфологии колоний в штаммах холерного вибриона, методом негативного контрастирования была изучена поверхность клеток и содержание в них поли- $\beta$ -гидроксibuтирата модельного штамма *V. cholerae* Дакка 35 классического биовара, имеющего в популяции Т- и О-клоны. При этом было установлено, что клетки Т- и О-клонов не содержали электронно-плотных гранул поли- $\beta$ -гидроксibuтирата. В то же время при изучении двух фенотипически измененных вариантов *V. cholerae* Дакка 35 было выявлено, что на поверхности и между клетками О-вариантов присутствует рыхлый слой, который отсутствует у Т-клонов (рис. 1).

Обнаруженный дополнительный слой был выделен с поверхности двух фенотипически разных вариантов штамма *V. cholerae* Дакка 35, и при биохимическом исследовании было установлено, что он имеет полисахаридную природу [1].

Для подтверждения факта наличия у штамма *V. cholerae* Дакка 35 экзополисахаридного слоя бак-

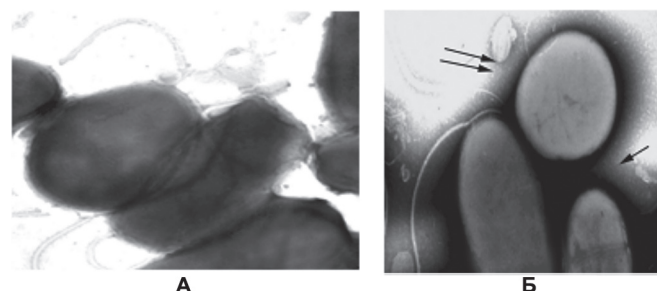


Рис. 2. Электронограмма двух фенотипически разных вариантов *V. cholerae* Дакка 35, окрашенных рутением красным. Негативное контрастирование:

А – Т-клоны, не синтезирующие экзополисахарид;

Б – О-клоны, продуцирующие экзополисахарид;

стрелкой отмечен экзополисахаридный слой. Увеличение  $\times 35000$

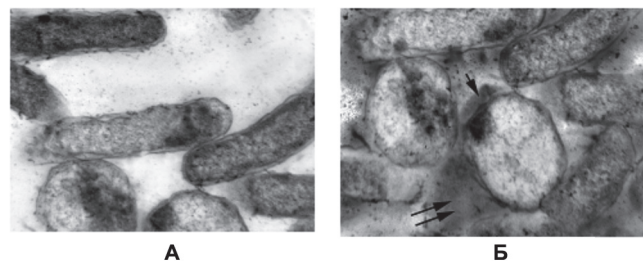


Рис. 3. То же, что на рис. 2. Ультратонкие срезы. Стрелками показан экзополисахаридный слой. Увеличение  $\times 30000$

терии Т- и О-клонов были исследованы электронно-гистохимическим методом после их обработки красителем рутением красным, применяемым для обнаружения экзополисахарида у грамотрицательных бактерий [8, 10]. При изучении популяции клеток в электронном микроскопе было выявлено, что действительно между клетками О-варианта Дакка 35 является аморфный электронно-плотный слой окрашенных экзополисахаридов, тогда как у Т-варианта такой слой отсутствовал (рис. 2, 3).

На следующем этапе работы было высказано предположение, что присутствие дополнительного экзополисахаридного слоя на поверхности клеток О-вариантов может привести к изменению структуры колоний. Для проверки данного предположения было проведено изучение двух фенотипически разных вариантов штамма *V. cholerae* Дакка 35 в сканирующем электронном микроскопе. Исследование показало, что О-колонию *V. cholerae* Дакка 35 имели рыхлую поверхность с отпочкованными островковыми структурами (микроколонию, рис. 4, А, стрелка), расположенными на ее поверхности. В основной своей массе, клетки были покрыты слизистой оболочкой в результате продукции экзополисахарида. Иное строение колоний было у популяции Т-клонов (рис. 4, Б). Поверхность размножающихся бактерий имела гладкую форму, клетки расположены упорядоченно в центре колонии и хаотично по ее краям.

В итоге, с помощью трансмиссионной и сканирующей электронной микроскопии было подтверждено наличие экзополисахаридного слоя у О-холерных вибрионов классического биовара, который способствовал изменению морфологии колоний. Таким образом, экзополисахаридный слой обеспечивает

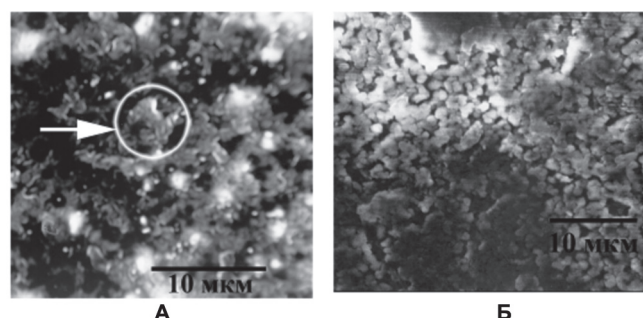


Рис. 4. Сканогаммы колоний *V. cholerae* Дакка 35:

А – колонии О-варианта; Б – колонии Т-варианта

защиту возбудителя в неблагоприятных условиях внешней среды.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заднова С.П., Топорков А.В., Исаев Н.Д. Фенотипический анализ гетерогенного штамма *Vibrio cholerae* Дакка 35 Огава. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2004; 3:86–8.
2. Исаев Н.Д., Лозовский Ю.В., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Популяционная неоднородность природных штаммов *Vibrio cholerae* классического биовара: координированное изменение морфологии колоний, подвижности, токсигенности и ферментативных свойств. Пробл. особо опасных инф. 2005; 1(89):43–6.
3. Кутырев В.В., Коннов Н.П., Волков Ю.П. Возбудитель чумы: ультраструктура и локализация в переносчике. М.: Медицина; 2007. 224 с.
4. Ali A., Rashid M.H., Karaolis D.K. High-frequency rugose exopolysaccharide production by *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol. 2002; 68(1):5773–8.
5. Beyhan S., Yildiz F.H. Smooth to rugose phase variation in *Vibrio cholerae* can be mediated by a single nucleotide change that targets c-di-GMP signalling pathway. Mol. Microbiol. 2007; 63(4):995–1007.
6. Faruque S.M., Nair G.B. *Vibrio cholerae* genomics and molecular biology. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2008. 218 p.
7. Finkelstein R.A., Boesman-Finkelstein M., Sengupta D.K., Page W.J., Stranley C.M., Phillips T.E. Colonial opacity variations among the choleraenic vibrios. Microbiology. 1997; 143(1):23–34.
8. Johnson J.A., Panigrahi P., Morris J.G. Non-O1 *Vibrio cholerae* NRT36S produces a polysaccharide capsule that determines colony morphology, serum resistance, and virulence in mice. Infect. Immun. 1992; 60(3):864–9.
9. Yildiz F.H., Schoonik G.K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999; 96(7):4028–33.

10. Yildiz F.H., Dolganov N.A., Schoonik G.K. VpsR, a member of the response regulators of the two-component regulatory systems, is required for expression of vps biosynthesis genes and EPS(ETr)-associated phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. J. Bacteriol. 2001; 183(5):1716–26.

11. Yildiz F.H., Lie X.S., Heydorn A., Schoonik G.K. Molecular analysis of rugosity in a *Vibrio cholerae* O1 El Tor phase variant. Mol. Microbiol. 2004; 53(2):497–515.

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

1. Zаднова С.П., Топорков А.В., Исаев Н.Д. [Phenotypical analysis of heterogenic *Vibrio cholerae* strain Dacca 35 Ogawa]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2004; 3:86–8.
2. Isaev N.D., Lozovsky Yu.V., Zаднова С.П., Smirnova N.I. [Populational heterogeneity of natural *Vibrio cholerae* strains of classical biovariant: coordinated changes in colony, morphology, motility, toxigenicity, and enzymatic characteristics]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2005; (89):43–6.
3. Kutyrev V.V., Konnov N.P., Volkov Yu.P. [The Causative Agent of Plague: Ultrastructure and Localization in a Vector]. M.: Meditsina; 2007. 224 p.

#### Authors:

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

#### Об авторах:

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

Поступила 27.10.11.

Т.А.Кульшань, Я.М.Краснов, Ю.В.Лозовский, Н.И.Смирнова

**МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ МЕТОДОМ MLVA ТИПИЧНЫХ  
И ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ  
*VIBRIO CHOLERAЕ* БИОВАРА ЭЛЬТОР**

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

Показана возможность дифференциации методом MLVA типичных и генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* биовара эльтор, различающихся вирулентностью и эпидемическим потенциалом. Установлено значительное генетическое разнообразие геновариантов, обусловленное, видимо, как их поликлональным происхождением, так и продолжающимися изменениями генома под влиянием меняющихся факторов окружающей среды.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae* биовара эльтор, типичные штаммы, геноварианты, MLVA-типирование.

T.A.Kul'shan', Ya.M.Krasnov, Yu.V.Lozaovsky, N.I.Smirnova

**Molecular MLVA Typing of Typical and Genetically Altered Natural Strains  
of *Vibrio cholerae* El Tor Biovar**

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Displayed is the possibility of differentiation between typical and genetically altered strains of *Vibrio cholerae* biovar El Tor, which vary in their virulence and epidemic potential, by means of MLVA. Determined is a significant genetic diversity of the gene-variants, probably, due to their polyclonal origin and continuous alterations within genome under the influence of varying environmental factors.

Key words: *Vibrio cholerae* biovar El Tor, typical strains, gene-variants, MLVA-typing.

Недавно возникшие геноварианты *Vibrio cholerae* биовара эльтор отличаются от типичных штаммов этого возбудителя структурой генома профага СТХф, в котором ген *ctxB* эльтор типа (*ctxB3*) заменен геном *ctxB* холерных вибрионов классического биовара (*ctxB1*). К настоящему времени эти варианты вытеснили типичные штаммы во многих эндемичных по холере регионах [2, 5, 8, 9, 10]. Поскольку генетически измененные штаммы являются более вирулентными по сравнению с типичными, а также имеют повышенный эпидемический потенциал, существует необходимость дифференциации этих изолятов. Более того, до сих пор не решен вопрос о том, какое происхождение имеют геноварианты – моно- или поликлональное. Существуют две гипотезы относительно их возникновения. Первая состоит в том, что широкое распространение геновариантов является результатом экспансии единственного клона геноварианта, являющегося производным какого-то одного типичного штамма возбудителя холеры эльтор, который возник на определенной территории в результате приобретения им гена *ctxB1* от неизвестного пока донора. Согласно второй, такое событие обусловлено мультиклональным возникновением геновариантов в нескольких эндемичных по холере регионах [7, 8]. В этом случае следует ожидать, что генетическое разнообразие геновариантов будет весьма значительным. Для решения этих задач может быть использован метод мультилокусного VNTR-анализа (MLVA), который основан на оценке количества повторов VNTR в переменных участках генома. Высокая разрешающая способность и воспроизводимость этого

подхода была показана ранее при изучении различных штаммов многих патогенных бактерий, включая возбудителя холеры [4, 6, 7].

Цель работы – изучить возможность дифференциации типичных и измененных штаммов возбудителя холеры методом MLVA, выяснить их филогенетические связи и оценить разнообразие геновариантов.

### Материалы и методы

В работе использовано 53 клинических штамма *V. cholerae* биовара эльтор, из которых 2 изолята являлись предпандемическими (1937 г.), а 51 штамм был выделен в различные периоды 7-й пандемии (1965–2010 гг.) в разных регионах России и в странах ближнего и дальнего зарубежья. Среди последних 23 штамма были типичными, а 28 – геновариантами, содержащими в профаге СТХф ген *ctxB1*. Эти штаммы были выделены на территории 14 регионов РФ с 1988 по 2010 год. Для культивирования бактерий использовали бульон и агар LB (pH 7,6). В качестве переменных участков генома *V. cholerae* были использованы ранее выявленные локусы.

Выделение ДНК осуществляли в присутствии гуанидинтиоцианата с использованием лицензированных коммерческих наборов для выделения ДНК (ДНК-сорб, «AmpliSens», Россия) в соответствии с инструкцией к используемому набору.

Аmplификацию ДНК проводили с использованием программируемого термостата с горячей крышкой iCycler «IQ5» (BioRad, США).

Определение нуклеотидной последовательности

ДНК полученных ПЦР-фрагментов проводили с помощью генетического анализатора «3500xL Genetic Analyzers» (Applied Biosystems, США). Первичное выравнивание и сравнение полученных нуклеотидных последовательностей ДНК осуществляли с помощью программы MEGA 5.0. Для определения числа tandemных повторов использовали программу «Tandem Repeats Finder v. 4.0». Затем нуклеотидные последовательности ДНК были экспортированы в базу данных модульного пакета программ «BioNumerics 6.6» (Applied Maths, Бельгия) и на их основе построены филогенетические деревья методом «максимальной бережливости» (Maximum parsimony tree) с использованием категорического (categorical) коэффициента.

Вариабельность VNTR-локусов оценивали с помощью индекса разнообразия Нея (DI) [3], определенного по формуле  $DI = 1 - \sum p^2$ , где DI – индекс разнообразия Нея;  $p$  – частота встречаемости аллеля (отношение числа аллелей данного типа к общему числу аллелей).

### Результаты и обсуждение

Анализ полученных данных показал, что среди 53 штаммов было выявлено 37 MLVA-типов. Это означает, что каждый изолят, отличающийся от других по MLVA-профилю, имеет свой генотип и, следовательно, изученные штаммы относятся к 37 генотипам (таблица). При этом 23 типичных штамма, выделенные в разные периоды 7-й пандемии (1965–1990 гг.), принадлежали к 16 генотипам, тогда как 28 штаммов геновариантов (1988–2010 гг.) – к 21 генотипу. Эти данные свидетельствуют о значительной вариабельности генома обеих групп взятых штаммов, которая, возможно, обусловлена временной (1937–2010 гг.) и географической (Индонезия, Индия, Узбекистан, Украина, Россия) разобщенностью изолятов, а также связана с эволюцией возбудителя.

Анализ филогенетического дерева, построенного на основе MLVA, позволил выделить шесть клональных комплексов, каждый из которых содержал группу близкородственных штаммов, имеющих один и тот же или близкий генотип (рисунок). В эти комплексы входят следующие группы штаммов: предпандемические и атипичные пандемические изоляты (I), пандемические типичные штаммы (II, III, IV) и их геноварианты (V, VI).

Клональный комплекс I был представлен тремя штаммами, относящимися к двум генотипам, два из которых (МАК757 и МАК676) были предпандемическими, т.е. изолированными от больных холерой до начала 7-й пандемии (1937 г.) на о. Целебес, и один (МЕ7) относился к «старым» штаммам с атипичной структурой генома, изолированным в самом начале 7-й пандемии (1966 г.) в Индии. Их аллельные идентификационные формулы 10,6,7,5,13/10,6,7,13,16 указывают на их клональное происхождение. Основные генетические особенности этих штаммов

заключались в том, что в их геноме присутствовал профаг CTXφ с геном *ctxB* классического типа и отсутствовали острова пандемичности VSP-I и VSP-II, а также профаг RS1φ. Что касается штамма МЕ7, то, несмотря на то, что он был выделен во время 7-й пандемии, структура его генома (отсутствовали VSP-I и VSP-II и профаг RS1φ) была очень близка к таковой предпандемических изолятов. Возможно, что эти штаммы, наряду с предпандемическими, были предшественниками типичных штаммов возбудителя холеры эльтор, которые могли сформироваться в результате последовательных генетических событий.

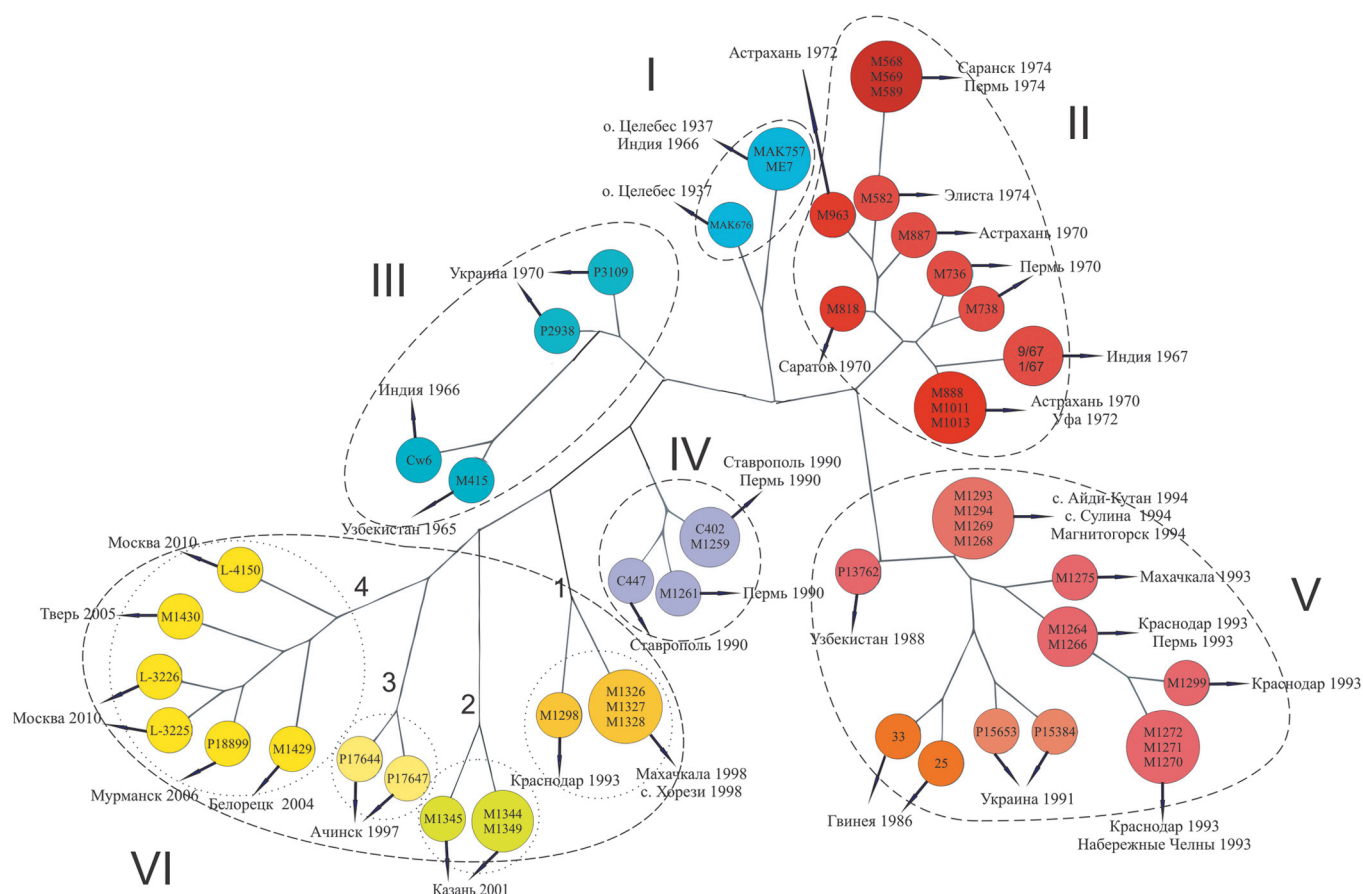
Все типичные штаммы, образовавшие II, III и IV комплексы, несут профаг CTXφ с геном *ctxB3* и содержат в первой хромосоме два острова пандемичности – VSP-I и VSP-II, а также профаг RS1φ. Среди них самым большим является комплекс II, который представлен 14 изолятами, относящимися к девяти различным генотипам (рисунок). Согласно данным эпидемиологического анализа эти штаммы в 1970 г. были завезены в Астраханскую область через Иран, где имели место крупные вспышки. Затем в период 1970–1975 гг. происходило последующее распространение холеры водным путем в другие города Поволжья и центрального региона России [1]. Сопоставление аллельных идентификационных формул этих изолятов (таблица) показывает, что они различались между собой лишь по числу повторов в двух наиболее вариабельных локусах второй хромосомы. В то же время локусы из первой хромосомы были идентичны. Присутствие в геномах трех гомологичных локусов может свидетельствовать о клональном происхождении этих изолятов. Что касается двух других минорных комплексов III и IV, то они включают в себя по четыре штамма (Украина, 1970 г.; Ставрополь и Пермь, 1990 гг.), которые отличаются как друг от друга, так и от штаммов II комплекса по структуре всех пяти локусов (таблица, рисунок). Это может означать, что вспышки холеры в Украине (1970), Перми и Ставрополе (1990) были связаны с независимым заносом других клонов возбудителя, имеющих генотипические отличия от штаммов II клонального комплекса. Однако небольшая степень генетических различий по MLVA-профилю между типичными штаммами из трех разных клональных комплексов свидетельствует о их близком родстве между собой.

Особый интерес представляют вспышки и отдельные случаи холеры на территории России, зарегистрированные в последующий период 7-й пандемии (1993–2010 гг.), вызванные заносом генетически измененных вариантов возбудителя.

Согласно полученным данным, геноварианты четко разделены на два больших клональных комплекса (V и VI), в каждый из которых входит по 14 (10 генотипов) и 15 (12 генотипов) штаммов соответственно (рисунок). Их аллельные идентификационные формулы существенно отличаются от таковых типичных штаммов (таблица, рисунок).

**Генотипы типичных и измененных штаммов *V. cholerae* биовара эльтор, выделенные в Российской Федерации и странах ближнего и дальнего зарубежья**

| Генотип | Штамм   | Аллель гена <i>ctxB</i> | Год и место выделения          | Аллели (кратность повторов) локусов |
|---------|---------|-------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| 1       | МАК676  | Class                   | 1937, о. Целебес               | 10,6,7,15,13                        |
| 2       | МАК757  | Class                   | 1937, о. Целебес               | 10,6,7,13,16                        |
|         | ME7     | El                      | 1966, Индия                    |                                     |
| 3       | M415    | El                      | 1965, Узбекистан               | 7,6,7,14,21                         |
| 4       | CW6     | El                      | 1966, Индия                    | 7,6,7,14,30                         |
| 5       | 9/67    | El                      | 1967, Индия                    | 8,6,7,15,24                         |
|         | 1/67    | El                      | 1967, Индия                    |                                     |
| 6       | M887    | El                      | 1970, Астрахань                | 8,6,7,21,25                         |
| 7       | M736    | El                      | 1970, Пермь                    | 8,6,7,18,26                         |
|         | M738    | El                      | 1970, Пермь                    |                                     |
| 8       | M818    | El                      | 1970, Саратов                  | 8,6,7,18,25                         |
| 9       | P2938   | El                      | 1970, Украина                  | 9,6,7,14,21                         |
| 10      | P3109   | El                      | 1970, Украина                  | 9,6,7,14,27                         |
| 11      | M963    | El                      | 1972, Астрахань                | 8,6,7,20,25                         |
| 12      | M888    | El                      | 1970, Астрахань                | 8,6,7,18,24                         |
| 13      | M1011   | El                      | 1972, Уфа (Башкирия)           |                                     |
|         | M1013   | El                      | 1972, Уфа (Башкирия)           |                                     |
| 14      | M589    | El                      | 1974, Пермь                    | 8,6,7,19,23                         |
|         | M568    | El                      | 1974, Саранск (Мордовия)       |                                     |
|         | M569    | El                      | 1974, Саранск (Мордовия)       | 8,6,7,15,23                         |
| 15      | M582    | El                      | 1974, Элиста (Калмыкия)        | 8,6,7,19,25                         |
| 16      | P13762  | Class                   | 1988, Узбекистан               | 8,7,7,15,20                         |
| 17      | M1261   | El                      | 1990, Пермь                    | 9,6,8,19,20                         |
| 18      | M1259   | El                      | 1990, Пермь                    | 9,6,8,23,20                         |
|         | C402    | El                      | 1990, Ставрополь               |                                     |
| 19      | C447    | El                      | 1990, Ставрополь               | 9,6,8,22,20                         |
| 20      | P15384  | Class                   | 1991, Украина                  | 8,7,8,16,14                         |
| 21      | P15653  | Class                   | 1991, Украина                  | 8,7,8,15,14                         |
| 22      | M1271   | Class                   | 1993, Набережные Челны         | 8,7,8,11,21                         |
|         | M1270   | Class                   | 1993, Набережные Челны         |                                     |
|         | M1272   | Class                   | 1993, Краснодар                |                                     |
| 23      | M1264   | Class                   | 1993, Краснодар                | 8,7,8,10,208,7,8,11,20              |
|         | M1266   | Class                   | 1993, Пермь                    |                                     |
| 24      | M1275   | Class                   | 1993, Махачкала (Дагестан)     | 8,7,8,14,20                         |
| 25      | M1294   | Class                   | 1994, с. Айди-Кутан (Дагестан) | 8,7,8,15,20                         |
|         | M1269   | Class                   | 1994, Магнитогорск             |                                     |
|         | M1268   | Class                   | 1994, Магнитогорск             |                                     |
|         | M1293   | Class                   | 1994, с. Сулина (Дагестан)     |                                     |
| 26      | M1326   | Class                   | 1998, с. Рубас (Дагестан)      | 9,7,8,15,22                         |
|         | M1327   | Class                   | 1998, с. Хорези (Дагестан)     |                                     |
|         | M1328   | Class                   | 1998, с. Хорези (Дагестан)     |                                     |
| 27      | M1298   | Class                   | 1993, Краснодар                | 9,7,8,11,21                         |
| 28      | M1344   | Class                   | 2001, Казань                   | 11,7,6,21,13                        |
|         | M1349   | Class                   | 2001, Казань                   |                                     |
| 29      | M1345   | Class                   | 2001, Казань                   | 12,7,6,21,13                        |
| 30      | P17647  | Class                   | 1997, Ачинск                   | 9,8,6,16,24                         |
| 31      | P17644  | Class                   | 1997, Ачинск                   | 9,8,6,15,24                         |
| 32      | M1429   | Class                   | 2004, Уфа (Башкирия)           | 9,3,6,20,17                         |
| 33      | M1430   | Class                   | 2005, Тверь                    | 9,3,6,18,18                         |
| 34      | P18899  | Class                   | 2006, Мурманск                 | 9,3,6,30,19                         |
| 35      | JI-3225 | Class                   | 2010, Москва                   | 9,3,6,14,19                         |
| 36      | JI-3226 | Class                   | 2010, Москва                   | 9,3,6,15,19                         |
| 37      | JI-4150 | Class                   | 2010, Москва                   | 9,3,6,13,20                         |



Филогенетическое дерево, построенное методом «максимальной бережливости» (maximum parsimony tree, Bionumerics, v.6.6) на основе MLVA по 5 локусам различных штаммов *Vibrio cholerae* биовара эльтор. Штрихами выделены VI клональных комплексов, которые образуют предпандемические (I) изоляты, пандемические типичные (II, III, IV) и генетически измененные (V и VI) штаммы. В кружках указаны изученные штаммы, место и год их выделения

Представленные данные свидетельствуют о том, что MLVA-типирование действительно позволяет дифференцировать генетически измененные и типичные штаммы возбудителя холеры.

Более того, выявлены существенные генетические различия между разными группами геновариантов, завезенными на территорию России из разных эндемичных очагов и в различные временные периоды: в 1991–1999 гг. (V комплекс) и 1997–2010 гг. (VI комплекс). У сравниваемых групп штаммов четко выражена разная аллельность всех 5 локусов (таблица). Так, если аллельная идентификационная формула геновариантов из V комплекса по трем наименее вариабельным локусам 8,7,8/8,7,7, то у изолятов VI комплекса – 9,8,6/9,7,8/11,7,6/12,7,6/9,3,6. Эти данные могут служить в пользу предположения о том, что сравниваемые группы геновариантов не ведут своего происхождения от одного клона. Следовательно, эпидемии холеры, зарегистрированные в современный период в различных странах, скорее всего, вызваны геновариантами, имеющими поликлональное происхождение и возникшими, видимо, одновременно или последовательно в разных эндемичных по холере регионах. Это предположение полностью совпадает с гипотезой о различном происхождении геновариантов, высказанной ранее рядом исследователей [6, 7, 8].

Кроме того, обнаружена заметная гетероген-

ность геновариантов, входящих в один и тот же клональный комплекс. Так, VI комплекс состоит из четырех различных подгрупп, в состав которых входят геноварианты, изолированные в разные годы и относящиеся к разным генотипам: 26 (1998 г.); 28–29 (2011 г.); 30–31 (1997 г.) (таблица, рисунок). Сопоставление результатов MLVA-типирования с данными молекулярно-эпидемиологического анализа выявило определенные закономерности в распределении изолятов по подгруппам. Установлено, что к 29, 30, 31 и 32 генотипам относятся штаммы из 1-й и 2-й подгрупп, выделенные от больных в период эпидемических осложнений в Краснодаре в 1993 г., в Дагестане в 1998 г., Казани в 2001 г. и отличающиеся от типичных изолятов только по структуре профага CTXφ.

Иная картина наблюдается в случае штаммов из 3-й и 4-й подгрупп. Установлено, что в их геноме, в отличие от указанных штаммов, присутствует делетированный остров пандемичности VSP-II. При этом распределение штаммов между двумя подгруппами было прямо связано с размером делеции. У штаммов 3-й подгруппы из заносного очага в Ачинске (1997 г.) в VSP-II было делетировано лишь четыре гена, тогда как все изоляты из 4-й подгруппы, выделенные в более поздние годы (2004–2010 гг.), имели более протяженную делецию (7 генов). Поскольку существует

прямая связь между структурой VSP-II и эпидемическим потенциалом штаммов [11], то выявленная возможность дифференциации изолятов с интактным и делетированным островом пандемичности методом MLVA заслуживает большого внимания.

Таким образом, в результате MLVA-типирования по пяти VNTR-локусам обнаружено, что 53 изученных штамма относятся к 37 различным генотипам. Установлено, что этот метод позволяет дифференцировать типичные штаммы *V. cholerae* биовара эльтор и их геноварианты, которые отличаются друг от друга по вирулентности и эпидемическому потенциалу. Получены данные о генетическом разнообразии геновариантов, которое, видимо, связано как с их поликлональным происхождением, так и с продолжающимися изменениями генома под влиянием меняющихся факторов окружающей среды.

Работа выполнена по государственному контракту № 53-Д от 04.06.2012 в рамках реализации Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)» и при поддержке гранта РФФИ № 12-04-00285а.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Кологоров А.И., Кедрова О.В., Пахомов Д.А., Пискунова Н.В., Ковтунов А.И., Васенин А.С. и др. Закономерности распространения холеры в бассейне Волги в 1970–1973 гг. Пробл. особо опасных инф. 2010; 2(104):22–8.
2. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Шашкова А.В., Кутырев В.В. Вариабельность генома измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, завезенных на территорию России в современный период. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2011; 4:11–8.
3. Adair D.M., Worsham P.L., Hill K.K., Klevytska A.M., Jackson P.J., Friedlander A.M. et al. Diversity in a variable-number tandem repeat from *Yersinia pestis*. J. Clin. Microbiol. 2000; 38(4):1516–9.
4. Choi S.Y., Lee J.H., Jeon Y.S., Lee H.R., Kim E.J., Ansaruzzaman M. et al. Multilocus variable-number tandem repeat analysis of *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains harbouring classical

- toxin B. J. Med. Microbiol. 2010; 59(3):763–9.
5. Hasan N.A., Choi S.Y., Eppinger M., Clark P.W., Chen A., Alam M., Haley B.J. et al. Genomic diversity of 2010 Haitian cholera outbreak strains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012; 6:1–8.
6. Kendall E.A., Chowdhury F., Begum Y., Khan A.I., Li S., Thierer J.H. et al. Relatedness of *Vibrio cholerae* O1/O139 isolates from patients and their household contacts, determined by multilocus variable-number tandem-repeat analysis. J. Bacteriol. 2010; 192(17):4367–76.
7. Lam C., Octavia S., Reeves R.P., Lan R. Multi-locus variable number tandem repeat analysis of 7th pandemic *Vibrio cholerae*. BMC Microbiol. 2012; 12(82):1471–2180.
8. Morita M. Emergence and genetic diversity of El Tor *Vibrio cholerae* O1 that possess classical biotype *ctxB* among travel-associated cases of cholera in Japan. J. Med. Microbiol. 2010; 59:708–12.
9. Morita M., Ohnishi M., Arakawa E., Bhuiyan N.A., Nusrin S., Alam M. et al. Development and validation of a mismatch amplification mutation PCR assay to monitor the dissemination of an emerging variant of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. Microbiol. Immunol. 2008; 52(6):314–7.
10. Safa A., Sultana J., Cam P.D., Mwansa J.C., Kong R.Y. *Vibrio cholerae* O1 hybrid El Tor strains in Asia and Africa. Emerg. Infect. Dis. 2008; 14:987–8.
11. Taviani E., Grim C.J., Choi J., Chun J., Haley B., Hasan N.A. et al. Discovery of novel *Vibrio cholerae* VSP-II genomic islands using comparative genomic analysis. FEMS Microbiol. Lett. 2010; 308(2):130–7.

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

1. Kolodov A.I., Kedrova O.V., Pakhomov D.A., Piskunova N.V., Kovtunov A.I., Vasenin A.S. et al. [Regularities of cholera spread in the Volga Basin in 1970–1973]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; (104):22–8.
2. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Shashkova A.V., Kutyrev V.V. [Variability of the genome of altered *Vibrio cholerae* variants biovar El Tor, imported into the territory of the Russian Federation in the modern period]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 2011; 4:11–8.

#### Authors:

Kul'shan' T.A., Krasnov Ya.M., Lozovsky Yu.V., Smirnova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Кульшань Т.А., Краснов Я.М., Лозовский Ю.В., Смирнова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 28.06.12.

А.Б.Мазрухо, Е.В.Монахова, О.В.Дуванова, Б.Н.Мишанькин, В.Д.Кругликов

## ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДЕТЕРМИНИРОВАННОСТИ ТВИНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

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

Холерные вибрионы различных серогрупп изучены на наличие гена *cef* (CHO cell elongating factor) и активности по отношению к твинам и трибутирину с использованием ХДС-агара, приготовленного на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей. Установлено, что все *cef*-позитивные штаммы гидролизуют твины 20, 40, 60, 80, 85 и все, кроме токсигенных *V. cholerae* O139, расщепляют трибутирин. Нетоксигенные *cef*-негативные штаммы O139 серогруппы, напротив, активны только по отношению к последнему. По-видимому, твиназная активность холерных вибрионов, отчасти, обусловлена Cef, а способность к гидролизу трибутирина – результат совокупного действия Cef и других ферментов. Показана эффективность применения ХДС-агара для определения данных признаков.

**Ключевые слова:** холерный вибрион, твиназа, CHO cell elongating factor.

A.B.Mazrukho, E.V.Monakhova, O.V.Duvanova, B.N.Mishan'kin, V.D.Kruglikov

Analysis of Genetic Determination of *Vibrio cholerae* Tweenase Activity

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

Studied are *Vibrio cholerae* of different serogroups on the presence of *cef* (CHO cell elongating factor) gene and activity against tweens and tributyrin using HDS-agar, prepared on the basis of bakery yeast pancreatic digest. Determined is the fact that all *cef*-positive strains hydrolyze tweens 20, 40, 60, 80, 85 and all but toxigenic *V. cholerae* O139, hydrolyze tributyrin. In contrast, non-toxigenic *cef* negative strains of O139 serogroup, are active only against the latter. Apparently, the tweenase activity of *Vibrio cholerae* is provided, partly, by Cef, and the ability to hydrolyze tributyrin is the result of combined activity of Cef and other ferments. Shown is the efficiency of HDS-agar application to determine these characteristics.

**Key words:** *Vibrio cholerae*, tweenase, CHO cell elongating factor.

Холерные вибрионы обладают широким спектром ферментативной активности, обеспечивающей им конкурентоспособность и возможность адаптации к различным экологическим нишам. Субстратами для роста и размножения вибрионов могут служить разнообразные органические соединения, в т.ч. содержащие эфирные связи. К числу последних принадлежат твины (сложные моноэфиры многоатомных спиртов и жирных кислот, относящихся к классу неионогенных поверхностно-активных веществ), которые могут использоваться даже в качестве единственного источника углерода [3]. Установлено, что практически все холерные вибрионы в той или иной степени обладают способностью гидролизовать твины 20, 40, 60, 80 [3]. Исключение составляют полностью лишенные этой способности нетоксигенные водные штаммы O139 серогруппы [1]. Однако до настоящего времени исследования твиназной активности *Vibrio cholerae* проводились лишь по фенотипу вне связи с какими-либо генами, ответственными за ее проявление. В 2000 г. В.А.МсКарделл и соавт. был описан Cef (CHO cell elongating factor) холерных вибрионов. Помимо цитотонической активности по отношению к культурам клеток, давшей название этому фактору, он способен гидролизовать р-нитрофениловые эфиры жирных кислот с длиной цепи от 2 до 14 атомов углерода [6]. Ранее нами была показана и твиназная активность рекомбинантных белков Cef холерных ви-

брионов различных серогрупп, а также способность Cef представителей O1 и неO1/неO139 серогрупп (но не *V. cholerae* O139) к гидролизу трибутирина [4].

Цель работы состояла в детекции гена *cef* в ДНК холерных вибрионов различных серогрупп и сравнительном изучении их твиназной активности с использованием питательной среды на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей.

Объектами исследования служили 260 штаммов *V. cholerae* O1, 40 штаммов O139 и 40 штаммов неO1/неO139 серогрупп. ПЦР-детекцию гена *cef* проводили с помощью сконструированных нами праймеров [4]. В качестве субстратов использовали твины 20, 40, 60, 80, 85 и трибутирин, которые добавляли, как описано ранее [1, 4], к среде ХДС-агар следующего состава: панкреатический перевар пекарских дрожжей – 0,05 % (по аминному азоту); NaCl – 4,0 г; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O – 6,0 г; агар-агар микробиологический – 12,0 г; вода дистиллированная – до 1 л; pH готовой среды 7,8±0,2.

Биоинформационный анализ аминокислотных последовательностей липаз и эстераз проводили с помощью пакета компьютерных программ Vector NTI 11 (www.informax.com).

Полученные результаты показали, что ген *cef* присутствовал в геномах всех штаммов, кроме включенных в исследование 22 нехолерогенных *V. cholerae* O139, выделенных из водных источни-

ков внешней среды.

В опытах с использованием в качестве основы ХДС-агара все *sef*-позитивные вибрионы, включая токсигенные клинические штаммы *V. cholerae* O139, гидролизovali твины 20, 40, 60, 80 и 85, тогда как ни один из водных *sef*-негативных штаммов O139 серогруппы не обладал твиназной активностью. Следует отметить, что на этой среде нам удалось выявить активность по отношению к твину 80 у токсигенных штаммов O139 серогруппы, которая ранее не наблюдалась при использовании других сред. По-видимому, некоторое несовпадение представленных в литературе данных о спектрах твиназной активности холерных вибрионов [1, 3] также связано с использованием разными авторами неодинаковых питательных сред и концентраций субстратов. Наши данные показали, что ХДС-агар является адекватной средой, позволяющей дифференцировать штаммы холерных вибрионов по этой активности. Что касается трибутирина, то все штаммы, включая водные *sef*-негативные *V. cholerae* O139, гидролизovali этот субстрат, однако у последних зоны просветления среды вокруг колоний были намного меньше, чем у остальных штаммов, содержащих ген *sef*. Поскольку трибутирин является субстратом, традиционно используемым для определения не только эстеразной, но и липазной активности [5, 7], эти результаты навели нас на мысль о том, что у *sef*-негативных штаммов гидролиз трибутирина осуществлялся другой липазой(ами), а у *sef*-позитивных вибрионов O1 и неO1/неO139 серогрупп наблюдался эффект совокупного действия других липаз/эстераз и Cef. На обеих хромосомах *V. cholerae* *eltor* N16961 мы выявили 20 генов известных и предполагаемых липаз и эстераз и провели поиск в их продуктах консервативного пентапептида GX SXG, который входит в состав субстрат-связывающего домена липаз. Серин в его центре играет ключевую роль в связывании с субстратом [5]. Оказалось, что GX SXG присутствует в молекулах трех белков, гены которых локализованы на большой хромосоме – предполагаемой эстеразы/липазы YbfF (AAF95343.1) и двух протеин-глутамат-метилэстераз CheB (AAF95208.1 и AAF94558.1), а также четырех белков, гены которых локализованы на малой хромосоме – липазы, входящей в состав Hly-локуса (AAF96133.1), липазы семейства GD XG (AAF96394.1), «липазоподобного белка» (AAF96652.1) и обозначенного как предполагаемая липаза белка Cef (AAF96761.1). Анализ, проведенный нами с помощью программы AlignX, не выявил значительной гомологии между ними (кроме двух CheB, которые близки друг другу, но далеко не идентичны). Субстратная специфичность большинства липаз/эстераз (содержащих пентапептид GX SXG) холерных вибрионов не изучена, но мы не исключаем, что, по крайней мере, часть из них активна по отношению к трибутирину. В таком случае вполне понятна более слабая активность *sef*-негативных штаммов по сравнению с *sef*-позитивными, у которых она усилена присутствием Cef. С другой

стороны, с этих позиций не удастся объяснить высокую активность по отношению к трибутирину токсигенных штаммов O139, поскольку продуцируемый ими Cef разлагает только твины, но не трибутирин [4]. Возможно, это связано с повышенным уровнем синтеза одной из других липаз/эстераз, одновременной экспрессией нескольких кодирующих их генов, либо с более активным транспортом продукта(ов) во внеклеточное пространство.

Таким образом, на основании полученных результатов с использованием «природной модели» – *sef*-негативных вибрионов O139 – можно с уверенностью заключить, что твиназная активность *V. cholerae*, отчасти, обусловлена продуктом гена *sef*. Однако, принимая во внимание принципиальные отличия в структуре геномов водных авирулентных холерных вибрионов O139 серогруппы от всех остальных представителей вида *V. cholerae* [2] и отсутствие в GenBank полной нуклеотидной последовательности таких штаммов, остается вероятность того, что у вибрионов O1, неO1/неO139 и токсигенных штаммов O139 серогруппы твиназной активностью обладают и другие вышеупомянутые ферменты. Для окончательного ответа на этот вопрос необходимы дальнейшие исследования, направленные на выявление генов других эстераз и липаз, определение их экспрессии и субстратной специфичности, а также получение делеционных мутантов, дефектных по гену *sef*, и сравнение их эстеразной активности с изогенными штаммами. Во избежание получения ложноотрицательных результатов при проведении таких исследований в качестве основы сред с твинами и трибутирином может быть рекомендован ХДС-агар, использование которого позволяет получать четкие и однозначные данные.

Широкое распространение гена *sef* среди клинических и водных штаммов различных серогрупп и достаточно высокий уровень его экспрессии позволяют полагать, что данный фактор может вносить свой вклад в выживаемость холерных вибрионов в открытых водоемах и сточных водах, которые в настоящее время значительно загрязнены органическими веществами. В этой связи представляет интерес и тот факт, что ген *sef* (VCA0863) локализован на малой хромосоме в непосредственной близости к гену транспортного белка длинноцепочечных жирных кислот (VCA0862), которые могут образоваться в результате расщепления различных субстратов за счет активности Cef.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дуванова О.В., Шиманюк Н.Я., Мишанькин Б.Н. Способность расщеплять твин 20 как дифференциальный тест для вибрионов O139 серовара различного происхождения. Клини. и лаб. диагн. 2000; 5:48–9.
2. Ерошенко Г.А., Осин А.В., Щелканова Е.Ю., Смирнова Н.И. Сравнительный анализ геномов вирулентных и авирулентных штаммов *Vibrio cholerae* O139. Мол. генет. 2004; 2:11–16.
3. Кузьмиченко И.А., Грачева И.В., Плотников О.П. Деструктивная активность и рост холерного вибриона в присутствии твинов. Пробл. особо опасных инф. 2001; 1(81):101–5.
4. Монахова Е.В., Ломов Ю.М., Писанов Р.В., Алексеева Л.П., Маркина О.В., Миронова А.В. и др. Клонирование гена

цитотонического фактора Cef (CHO-cell elongating factor) *Vibrio cholerae* в *Escherichia coli* и его экспрессия под контролем P<sub>BAD</sub>-промотора. Биотехнология. 2005; 5:12–8.

5. Faustinella F., Smith L.C., Semenkovich C.F., Chan L. Structural and functional roles of highly conserved serines in human lipoprotein lipase. Evidence that serine 132 is essential for enzyme catalysis. J. Biol. Chem. 1991; 15:9481–5.

6. McCardell B.A., Kothary M.H., Hall R.N., Sathyamoorthy V. Identification of a CHO-elongating factor produced by *Vibrio cholerae* O1. Microb. Pathogen. 2000; 29(1):1–8.

7. Singh R., Gupta N., Goswami V.K., Gupta R. A simple activity staining protocol for lipases and esterases. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2006; 70:679–82.

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

1. Duvanov O.V., Shimanyuk N.Ya., Mishan'kin B.N. [The ability to digest tween 20 as a differential test for vibrios of O139 serovar of different origin]. Klin. Lab. Diagnost. 2000; 5:48–9.

2. Eroshenko G.A., Osin A.V., Shchelkanova E.Yu., Smirnova N.I. [Comparative analysis of genomes of virulent and avirulent strains of *Vibrio*

*cholerae* O139]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 2004; 2:11–6.

3. Kuz'michenko I.A., Gracheva I.V., Plotnikov O.P. [Destructive activity and growth of cholera vibrio in the presence of tweens]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2001; (81):101–5.

4. Monakhova E.V., Lomov Yu.M., Pisanov R.V., Alekseeva L.P., Markina O.V., Mironova A.V. et al. [Cloning of *Vibrio cholerae* CHO-cell elongating factor gene in *Escherichia coli* and its expression under the control of P<sub>BAD</sub>-promoter]. Biotechnologia. 2005; 5:12–8.

**Authors:**

Mazrukho A.B., Monakhova E.V., Duvanov O.V., Mishan'kin B.N., Kruglikov V.D. 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:**

Мазрухо А.Б., Монахова Е.В., Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Кругликов В.Д. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru

Поступила 11.05.12.

Г.Н.Одинок, К.А.Никифоров

# ВЫЯВЛЕНИЕ НОВЫХ ВАРИАБЕЛЬНЫХ ДНК ЛОКУСОВ, ОТЛИЧАЮЩИХ ШТАММЫ СРЕДНЕВЕКОВОГО БИОВАРА ОТ ШТАММОВ ДРУГИХ БИОВАРОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

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

Проведен поиск вариабельных хромосомных локусов, отличающих штаммы *Yersinia pestis* средневекового и античного биоваров. У штаммов средневекового биовара выявлено наличие двух делеций размером 183 и 70 п.н. Показано, что первая делеция, локализованная в межгенном участке *aceA* – *aceK* после 22490 нуклеотида, присутствует у большинства изученных штаммов средневекового биовара, а вторая делеция в гене *y1694* (1869687–1870825 п.н.) выявляется у всех штаммов средневекового биовара, выделенных на территории России и сопредельных стран.

**Ключевые слова:** возбудитель чумы, биовары, генетические отличия.

G.N.Odinokov, K.A.Nikiforov

## Detection of New Variable DNA Loci That Distinguish Medievalis Biovar Strains of Plague Agent from the Strains of Other Biovars

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Variable chromosome loci have been searched, that differentiate *Yersinia pestis* strains of medievalis from antiqua biovars. The strains of medievalis biovar are shown to possess two deletions – 183 and 70 bps. The first deletion, localized in the inter-gene region *aceA* – *aceK* is present in the majority of medievalis biovar strains, the second one, in the gene *y1694*, is determined in all medievalis biovar strains isolated in the territory of Russia and neighboring countries.

**Key words:** plague agent, biovars, genetic differences.

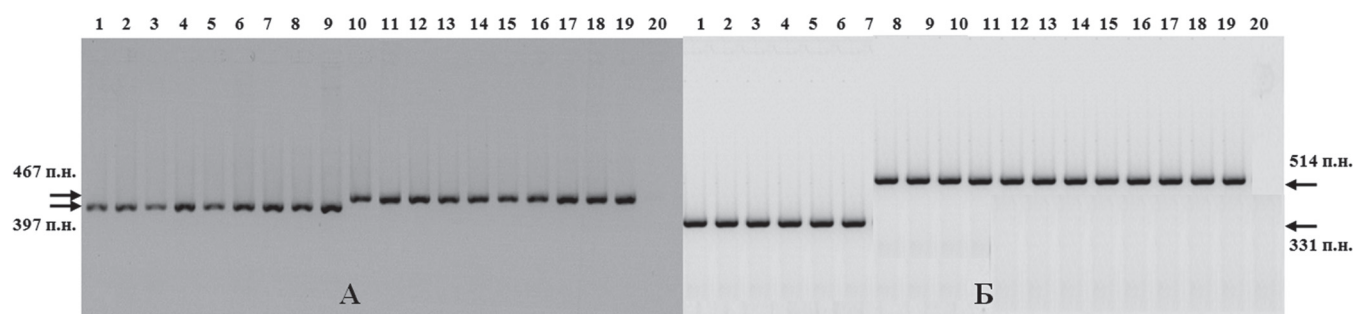
Штаммы *Yersinia pestis* основного подвида делят на три биовара – античный, средневековый и восточный, каждый из которых сформировался в различные периоды внутривидовой эволюции возбудителя чумы. На территории Российской Федерации и сопредельных стран действует 45 природных очагов чумы, в которых циркулируют штаммы *Y. pestis* античного и средневекового биоваров. Генетические отличия штаммов этих биоваров, циркулирующих в различных ландшафтно-географических зонах, исследованы далеко не достаточно. Дифференциацию штаммов проводят по биохимическому признаку – редукции нитратов, в основе различной экспрессии которого лежит вариабельность единичного нуклеотида в гене периплазматической нитратредуктазы *narA*. Штаммы античного биовара активны по этому признаку, в то время как изоляты средневекового биовара неспособны к денитрифицирующей активности.

Для выявления новых полиморфных ДНК локусов, отличающих штаммы средневекового и других биоваров возбудителя чумы, нами проведен сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей геномов штаммов *Y. pestis* средневекового (KIM10), античного (Antiqua, Nepal516 Z176003, D182038, D106004) и восточного (CO92) биоваров, представленных в базе данных NCBI GenBank, с помощью алгоритма BLAST, который позволил выявить наличие двух вариабельных локусов у штамма KIM10, отличных от штаммов других биоваров. Первый локус у

штамма KIM10 содержал делецию размером 183 п.н. после 22490 нуклеотида в межгенном участке *aceA* (21134–22441 п.н.) – *aceK* (22514–24241 п.н.). Второй вариабельный локус был расположен в гене *y1694* (1869687–1870825 п.н.), который у штамма KIM10 включал делецию 70 п.н. после 811 нуклеотида от начала кодирующей последовательности.

На соответствующие вариабельные участки генома с помощью программы PrimerExpress были рассчитаны две пары праймеров, фланкирующие участки делеций в хромосомной ДНК. Они имели следующий состав: Med(-183)-S – CGTTGAGAAAGTCCAGCA, Med(-183)-As – GGCAGTGACCTCCAGAAA; Med(-70)-S – AAGACCTTCGCCACCAGA, Med(-70)-As – CCAGGATTCGCCGATTCA. Амплификацию с парами праймеров Med(-183)-S-As и Med(-70)-S-As в ПЦР осуществляли по следующей схеме: 1 цикл при 94 °C – 5 мин, затем 35 циклов при 94 °C – 45 с, 55 °C – 1 мин, 72 °C – 45 с и завершающий цикл 3 мин при 72 °C. Ожидаемые размеры образуемых амплификатов с парами праймеров Med(-183)-S-As и Med(-70)-S-As составляли у штаммов средневекового биовара 331 и 397 п.н., у античного и восточного – 514 и 467 п.н.

В дальнейшем анализ двух вариабельных ДНК локусов был проведен у 59 штаммов возбудителя чумы основного подвида (античного, средневекового и восточного биоваров), выделенных в природных очагах на территории России и зарубежных стран. В том числе средневековый биовар был представ-



ПЦР-анализ переменных локусов с парами праймеров Med(-70)-S-As (А) и Med(-183)-S-As (Б):

1–9 – штаммы средневекового биовара (М-567, М-956, М-928, С-528, С-781, С-761, С-763, С-765, С-621); 10–14 – штаммы античного биовара (А-744, 1/156, 14/1646, 1/220, 1691); 15–19 – штаммы восточного биовара (Sonche, Marsel, Israel, KM 715, Hamburg 15); 20 – отрицательный контроль

лен 9 штаммами: М-567 и М-956 (Волго-Уральский песчаный очаг), М-928 (Прикаспийский песчаный), С-528 (Северо-Западный Прикаспийский), С-781, С-761 (Центрально-Кавказский высокогорный), С-763, С-765, С-621 (Центрально-Кавказский высокогорный, Кубано-Малкинский район); античный – 5 штаммами: А-744, 1/156, 14/1646 (Аксайский высокогорный), 1/220 (Алайский высокогорный), 1691 (Верхненарынский высокогорный); восточный – 5 зарубежными штаммами: Sonche, Marsel, Israel, KM 715, Hamburg 15 (рисунок).

У большинства использованных в работе штаммов средневекового биовара в ПЦР с парой праймеров Med(-183)-S-As образовывались амплификаты ожидаемого размера – 331 п.н., за исключением изолятов (С-763, С-765, С-621) из Кубано-Малкинского района Центрально-Кавказского высокогорного очага, у которых отсутствовала делеция в 183 п.н., а размеры образуемых фрагментов составляли 514 п.н., как и у штаммов античного и восточного биоваров (рисунок, Б). Большую разрешающую способность показала вторая пара праймеров Med(-70)-S-As, с помощью которой характерная делеция выявлялась в ПЦР у всех штаммов средневекового биовара, у которых в ПЦР образовывались амплификаты размером 397 п.н., в то время как у изолятов античного и восточного – 467 п.н. (рисунок, А), что соответствовало ожидаемому результату.

Таким образом, нами были обнаружены новые переменные локусы, содержащие делеции размером 183 и 70 п.н., которые отличают штаммы средневекового от штаммов других биоваров возбудителя чумы. В дальнейшем требуется провести биоинформационный анализ этих сайтов для оценки их эволюционной значимости и возможности использования, совместно с ранее выявленными ДНК-мишенями, для реконструкции молекулярной генеалогии возбудителя чумы. Кроме того, в рамках проведения молекулярно-эпидемиологического мониторинга выделяемых штаммов *Y. pestis* совместное использование двух пар праймеров Med(-183)-S-As и Med(-70)-S-As позволит просто, надежно и эффективно разделять штаммы античного и средневекового биоваров методом ПЦР без применения дорогостоящих и трудоемких секвенационных технологий.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 12-04-31908.

#### Authors:

Odinokov G.N., Nikiforov K.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Одинокоев Г.Н., Никифоров К.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 25.10.12.

А.И.Павлова, Г.А.Ерошенко, Г.Н.Одинок, Л.М.Куклева, Н.Ю.Шавина, Я.М.Краснов, В.В.Кутырев

## АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* СРЕДНЕВЕКОВОГО БИОВАРА ИЗ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЧУМЫ РОССИИ И МОНГОЛИИ

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

Проведен анализ генетических особенностей штаммов *Yersinia pestis* основного подвида, выделенных в природных очагах Российской Федерации и Монголии. Установлено, что в 7 из 9 очагов сусликового и песчаночного типа циркулируют штаммы средневекового биовара, имеющие типичный генотип *glpD1 napA2 rhaS1*. В Забайкальском степном очаге распространены штаммы античного биовара с генотипом *glpD1 napA1 rhaS1*. Аналогичный генотип имеют штаммы *Y. pestis* из Тувинского горного очага чумы, что коррелирует с наличием денитрифицирующей активности и отсутствием у них маркерной мутации средневекового биовара – замены единичного нуклеотида G→T в позиции 613 гена *napA* и свидетельствует о принадлежности штаммов из этого очага к античному биовару. Среди штаммов *Y. pestis*, выделенных в Монголии, выявлены два атипичных штамма, не редуцирующие нитраты, но относящиеся к античному биовару.

**Ключевые слова:** возбудитель чумы, средневековый биовар, генотипы штаммов.

A.I.Pavlova, G.A.Eroshenko, G.N.Odinokov, L.M.Koukleva, N.Yu.Shavina, Ya.M.Krasnov, V.V.Kutyrev

## Analysis of Genetic Variability of *Yersinia pestis* Strains (Medieval Biovar) Isolated in Natural Plague Foci of the Russian Federation and Mongolia

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Carried out is the analysis of genetic peculiarities of *Yersinia pestis* strains (main ssp.), isolated in natural foci of the Russian Federation and Mongolia. Determined is the fact that strains of medieval biovar characterized by typical *glpD1 napA2 rhaS1* genotype circulate in 7 out of 9 marmot and sandy-type foci. Strains of antique biovar characterized by *glpD1 napA1 rhaS1* genotype prevail in the Trans-Baikal steppe foci. *Y. pestis* strains from Tuva mountain focus have similar genotype, which correlates with denitrification activity and absence of marker mutation of medieval biovar – single nucleotide substitution G→T in the 613 position of *napA* gene, and testifies to affiliation of these strains to antique biovar. Among *Y. pestis* strains isolated in Mongolia, identified are two atypical strains incapable of reducing nitrates but pertinent to antique biovar.

**Key words:** plague agent, medieval biovar, strain genotypes.

Штаммы *Yersinia pestis* основного (высоковирулентного и эпидемически значимого) подвида делятся на три биовара – античный, средневековый и восточный, каждый из которых получил пандемическое распространение во время одной из трех прошедших пандемий чумы. Для каждого из этих биоваров характерна принадлежность к различным ландшафтно-географическим зонам и очагам определенного типа. Штаммы античного биовара распространены, как правило, в высокогорных природных очагах сурьезного типа, в то время как штаммы средневекового биовара – в равнинно-предгорных, степных и пустынных очагах сусликового и песчаночного типа, а штаммы восточного биовара – в очагах крысиного типа, расположенных на морских и океанических побережьях. В природных очагах чумы в Российской Федерации и сопредельных странах циркулируют штаммы средневекового и античного биоваров, причем большую часть из этих очагов занимают штаммы средневекового биовара, которые распространены на обширных пространствах засушливых зон степей и пустынь. Причины такой широкой распространенности штаммов средневекового биовара остаются не установленными. Возможно, они связаны с изменениями в геноме штаммов средневекового биовара, которые обеспечили их лучшую адаптацию к усло-

виям почвенного биоценоза нор грызунов в засушливых зонах расположения этих очагов.

В Российской Федерации существуют 11 природных очагов чумы. Значительное большинство из них (9) составляют очаги сусликового (очаги № 01–03, 14, 15, 38, 37) и песчаночного (№ 16, 43) типов, в которых, как правило, циркулируют штаммы средневекового биовара [6, 7]. Штаммы этого биовара распространены и в большинстве природных очагов чумы, расположенных на пограничных с Россией территориях, в том числе в большой группе Среднеазиатских пустынных очагов (№ 18–30, 42), в Закавказских песчаночных очагах (№ 07–13), в очаге сусликового типа в Казахстане (№ 17). В связи с этим очевидна необходимость тщательного изучения штаммов *Y. pestis* средневекового биовара, имеющих широкое распространение на территории Российской Федерации. Важным также является установление генетических особенностей штаммов средневекового биовара из разных природных очагов чумы России и сопредельных стран и определение генотипов этих штаммов, наличие которых необходимо для установления происхождения изолятов *Y. pestis* и возможных путей заноса инфекции.

В основе деления штаммов *Y. pestis* основного подвида на биовары лежат два дифференциальных

биохимических признака – ферментация глицерина и редукция нитратов. Штаммы античного биовара активны в отношении обоих этих субстратов, штаммы средневекового биовара не редуцируют нитраты, а штаммы восточного биовара не ферментируют глицерин. Отсутствие ферментации глицерина связано с наличием делеции размером 93 п.н. в гене *glpD* глицерол-3-фосфатдегидрогеназы у штаммов восточного биовара, а редукции нитратов – с наличием замены единичного нуклеотида G→T в позиции 613 гена *napA* периплазматической нитратредуктазы у штаммов средневекового биовара [5, 8–10]. За исключением последнего признака, отсутствие редукции нитратов и лежащей в его основе мутации в гене *napA*, другие различия, которые могли бы быть использованы для дифференциации средневекового и античного биоваров, не выявлены. Генетические особенности штаммов средневекового биовара из природных очагов России и сопредельных стран исследованы недостаточно. В связи с этим в данной работе нами проведен анализ генетических свойств штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из природных очагов России и некоторых сопредельных стран, и определены генотипы типичных и измененных штаммов *Y. pestis*, распространенных на этих территориях.

### Материалы и методы

*Штаммы, биохимические свойства, выделение ДНК.* Используемые в работе природные штаммы *Y. pestis* из различных очагов России и пограничных стран представлены в таблице. Штаммы выращивали на агаре Хоттингера (рН 7,2), в бульоне и на агаре LB (рН 7,2) в течение 18–24 ч при 28 °С. Изучение способности к редукции нитратов, ферментации глицерина и рамнозы проводили так, как это указано в практическом руководстве по лабораторной диагностике опасных инфекционных болезней [3]. Выделение ДНК штаммов *Y. pestis* выполняли в соответствии с методическими указаниями [4].

*ПЦР, секвенирование, биоинформационный анализ.* ПЦР проводили по стандартной методике в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Для амплификации фрагментов генов применяли ранее использованные праймеры [2, 5, 9, 10]. Полученные в ПЦР продукты анализировали методом электрофореза в 1 % агарозном геле при напряжении 10–15 В/см. Для расчета олигонуклеотидных праймеров и проведения сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей использовали программы Primer Express и алгоритм BLAST. Секвенирование полученных ПЦР фрагментов генов осуществляли на генетическом анализаторе модели «CEQ 8000» (Beckman Coulter).

### Результаты и обсуждение

В работе исследованы свойства 68 штаммов *Y. pestis* основного подвида из 9 природных очагов Российской Федерации сусликового и песчаночьего

типов, а также 8 штаммов, выделенных в Монголии. Количество изученных штаммов *Y. pestis* из каждого природного очага представлено в таблице. Анализ биохимических свойств этих штаммов показал, что все они не ферментируют рамнозу (как это свойственно штаммам основного подвида), ферментируют глицерин и неоднородны по признаку редукции нитратов (таблица).

Ранее нами была разработана система мультилокусного сиквенса-типирования штаммов *Y. pestis*, основанная на вариабельности генов, кодирующих дифференциальные признаки, используемые в фенотипических схемах внутривидовой классификации возбудителя чумы [1]. В разработанной системе типирования в качестве генетического маркера средневекового биовара использована мутация – замена единичного нуклеотида G→T в позиции 613 гена *napA* периплазматической нитратредуктазы. Генотип по этому гену у штаммов античного и восточного биоваров был обозначен как *napA1* (интактный ген), а штаммов средневекового биовара – *napA2* (наличие замены нуклеотида). Аналогично этому, генотип штаммов античного и средневекового биовара по гену *glpD* был обозначен как *glpD1* (интактный ген), а восточного биовара – *glpD2* (делеция размером 93 п.н.). Для разделения штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвигов использовали замену единичного нуклеотида G→A в позиции 671 регуляторного гена *rhaS* рамнозного оперона у основного подвида (генотип *rhaS1*), которая отсутствует у штаммов неосновных подвигов (генотип *rhaS2*) – кавказского, алтайского, гиссарского и улегейского [2]. В соответствии с фенотипическими признаками характерными генотипами биоваров возбудителя чумы являются: у античного – *glpD1 napA1 rhaS1*, у средневекового – *glpD1 napA2 rhaS1* и у восточного – *glpD2 napA1 rhaS1*.

Для получения молекулярной характеристики и определения генотипов штаммов из природных очагов Российской Федерации и некоторых пограничных стран нами был проведен анализ наличия у них маркерных мутаций, типичных для разных биоваров *Y. pestis*. У всех использованных в нашей работе штаммов не выявлено в ПЦР делеции размером в 93 п.н. в гене *glpD*, и, следовательно, эти штаммы не относились к восточному биовару. Все они содержали характерную для штаммов основного подвида замену единичного нуклеотида в позиции 671 гена *rhaS*, что на генетическом уровне подтверждало их принадлежность к основному подвиду возбудителя чумы. По способности к редукции нитратов и наличию характерной делеции в позиции 613 гена *napA* среди изученных штаммов *Y. pestis* было выявлено несколько вариантов. Оказалось, что в большинстве очагов (7 из 9) сусликового и песчаночьего типов в России циркулируют штаммы средневекового биовара, которые содержат характерную мутацию – замену единичного нуклеотида G→T в позиции 613 гена *napA*. Это штаммы из Централь-

Штаммы *Y. pestis* из природных очагов чумы, их фенотипическая и генетическая характеристика

| Очаги<br>(количество изученных штаммов)   | Ферментация<br>глицерина | Редукция<br>нитратов | Ферментация<br>рамнозы | <i>glpD</i> * | <i>napA</i> ** | <i>rhaS</i> *** | Генотипы                            |
|-------------------------------------------|--------------------------|----------------------|------------------------|---------------|----------------|-----------------|-------------------------------------|
| Песчаночного типа:                        |                          |                      |                        |               |                |                 |                                     |
| Волго-Уральский песчаный (10)             | +                        | –                    | –                      | 1             | 2              | 1               | <i>glpD1 napA2 rhaS1 – cp</i>       |
| Прикаспийский песчаный (7)                | +                        | –                    | –                      | 1             | 2              | 1               | <i>glpD1 napA2 rhaS1 – cp</i>       |
| Сусликового типа:                         |                          |                      |                        |               |                |                 |                                     |
| Центрально-Кавказский высокогорный (15)   | +                        | –                    | –                      | 1             | 2              | 1               | <i>glpD1 napA2 rhaS1 – cp</i>       |
| Терско-Сунженский низкогорный (3)         | +                        | –                    | –                      | 1             | 2              | 1               | <i>glpD1 napA2 rhaS1 – cp</i>       |
| Дагестанский равнинно-предгорный (8)      | +                        | –                    | –                      | 1             | 2              | 1               | <i>glpD1 napA2 rhaS1 – cp</i>       |
| Прикаспийский Северо-Западный степной (7) | +                        | –                    | –                      | 1             | 2              | 1               | <i>glpD1 napA2 rhaS1 – cp</i>       |
| Волго-Уральский степной (5)               | +                        | –                    | –                      | 1             | 2              | 1               | <i>glpD1 napA2 rhaS1 – cp</i>       |
| Забайкальский степной (5)                 | +                        | +                    | –                      | 1             | 1              | 1               | <i>glpD1 napA1 rhaS1 – ант</i>      |
| Тувинский горный (8)                      | +                        | +                    | –                      | 1             | 1              | 1               | <i>glpD1 napA1 rhaS1 – ант</i>      |
| Монголия (8)                              |                          |                      |                        |               |                |                 |                                     |
| 2                                         | +                        | –                    | –                      | 1             | 1              | 1               | <i>glpD1 napA1 rhaS1 – ант</i>      |
| 6                                         | +                        | +                    | –                      | 1             | 1              | 1               | <i>glpD1 napA1 rhaS1 – ант</i>      |
| CO92 (GenBank)                            | –                        | +                    | –                      | 2             | 1              | 1               | <i>glpD2 napA1 rhaS1 – вост.</i>    |
| Antiqua (GenBank)                         | +                        | +                    | –                      | 1             | 1              | 1               | <i>glpD1 napA1 rhaS1 – ант</i>      |
| Harbin35 (GenBank)                        | +                        | –                    | –                      | 1             | 1              | 1               | <i>glpD1 napA1 rhaS1 – ант</i>      |
| KIM (GenBank)                             | +                        | –                    | –                      | 1             | 2              | 1               | <i>glpD1 nap2 rhaS1 – cp</i>        |
| PestoidesF (GenBank)                      | +                        | +                    | +                      | 1             | 1              | 2               | <i>glpD1 nap2 rhaS1 – кавк. n/в</i> |

\* Отсутствие (1) или наличие (2) делеции в гене *glpD*.\*\*Отсутствие (1) или наличие (2) замены нуклеотида в позиции 613 гена *napA*.\*\*\*Наличие (1) или отсутствие (2) замены нуклеотида в позиции 671 гена *rhaS*.

Кавказского высокогорного, Терско-Сунженского низкогорного, Дагестанского равнинно-предгорного, Прикаспийского Северо-Западного степного, Волго-Уральского степного, Волго-Уральского песчаного и Прикаспийского песчаного очагов чумы. Они имеют типичный генотип средневекового биовара *glpD1 napA2 rhaS1* (таблица).

Два из восьми штаммов *Y. pestis*, изолированных в пограничной с Россией Монголии – *Y. pestis* 231/14 (Хэнтейский аймак) и 231 (21) (Запхинский аймак), имели другой генотип. Эти штаммы не редуцировали нитраты, на основании чего были отнесены ранее к средневековому биовару. Однако проведенное нами секвенирование гена *napA* показало, что у обоих штаммов отсутствует мутация в позиции 613 этого гена, и что их генотип идентичен штаммам античного биовара – *glpD1 napA1 rhaS1*. Аналогичное несовпадение между фенотипом и генотипом выявлено нами у выделенного в Китае штамма *Y. pestis* Harbin35, который, по данным базы NCBI GenBank, относится к средневековому биовару, но, как установлено нами при анализе его нуклеотидной последовательности, также не содержит мутации в гене *napA*, и имеет генотип античного штамма – *glpD1 napA1 rhaS1*. Таким образом, нами впервые выявлено несоответствие между дифференциальным признаком – редукцией нитратов и наличием маркерной мутации в гене *napA*, что ставит под сомнение диагностическую значимость одного из этих маркеров.

Для того чтобы уточнить биоварную принадлежность атипичных штаммов, выделенных в Монголии

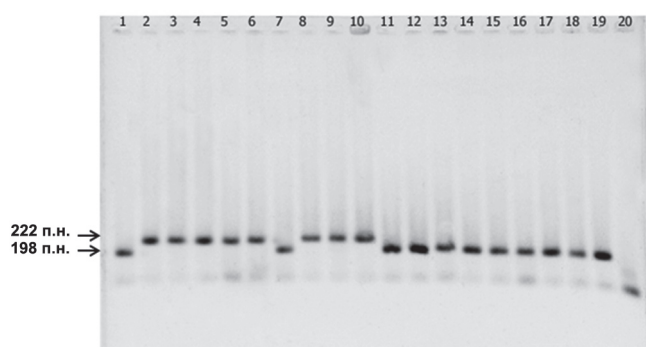
и Китае, нами был проведен поиск новых ДНК мишеней, которые могли быть использованы для дифференциации штаммов античного и средневекового биоваров. Проведенный сравнительный компьютерный анализ штаммов античного биовара *Y. pestis* Antiqua, Nepal315 (NCBI GenBank) и средневекового биовара KIM позволил нам выявить наличие делеции размером 24 п.н. после 3626563 нуклеотида у штамма KIM, которая отсутствовала у штаммов Antiqua и Nepal315. На варибельный участок генома KIM были сконструированы праймеры, имевшие следующие последовательности.

М 24-S ataccggtattttgtgtc

М 24-As attaatgagacaccgcca

Подобраны оптимальные условия проведения ПЦР: 1 цикл – 94 °C в течение 5 мин, затем 35 циклов – 94 °C 45 с, 56 °C 1 мин, 72 °C 45 с и завершающий цикл – 3 мин при 72 °C.

С помощью разработанной ПЦР было исследовано наличие делеции размером 24 п.н у штаммов основного подвида *Y. pestis*, использованных в этой работе. Оказалось, что эта делеция, обозначенная нами как М 24, отсутствовала у всех штаммов античного биовара, но присутствовала практически у всех штаммов средневекового биовара (рисунок). Эта ДНК мишень использована нами как дополнительный маркер штаммов средневекового биовара. На ее наличие были проверены атипичные штаммы, выделенные в Монголии *Y. pestis* 213/14 и 235 (21) и штамм Harbin35 из Китая (NCBI GenBank). Делеция М 24 в их геноме отсутствовала, что в комплексе с



ПЦР-анализ на наличие делеции размером 24 п.н. у штаммов *Y. pestis*:

1 – Терско-Сунженский низкогорный (14Д); 2–6 – Тувинский горный (И-3223, И-3358, И-2638, И-3205, 1771); 7 – Дагестанский равнинно-предгорный (С749); 8–10 – Забайкальский степной (И-1270, 1843, И-1996); 11–12 – Прикаспийский Северо-Западный степной (65(98), 177 (264)); 13–14 – Волго-Уральский степной (А-1792, 107); 15–16 – Центрально-Кавказский высокогорный (С-761, С-624); 17–18 – Волго-Уральский песчаный (М-1245, М-1274); 19 – Прикаспийский песчаный (133); 20 – отрицательный контроль

отсутствием маркерной мутации в гене *parA* доказывает принадлежность этих атипичных по признаку редукции нитратов штаммов к античному биовару.

В число 7 природных очагов чумы сусликового типа, расположенных на территории Российской Федерации, входят Забайкальский степной и Тувинский горный очаги. Фенотипический анализ штаммов *Y. pestis* из этих природных очагов чумы, показал, что они способны к редукции нитратов (таблица), что свидетельствует о том, что эти штаммы не относятся к средневековому биовару. О циркуляции штаммов *Y. pestis* античного биовара в Забайкальском степном очаге сусликового типа известно давно. Это связывают с произошедшей здесь в середине прошлого столетия сменой основного носителя. Взамен истребленного в результате хозяйственной деятельности человека монгольского сурка *Marmota sibirica* основным носителем чумы в этом природном очаге стал даурский суслик *Citellus dauricus*. В то же время смены носителя в Тувинском горном очаге не зарегистрировано, и основным носителем чумы в этом природном очаге является длиннохвостый суслик *S. undulatus*, в связи с чем остается неясным, почему штаммы из этого природного очага чумы обладают способностью к редукции нитратов, в соответствии с которой по фенотипической схеме классификации они должны быть отнесены к античному биовару.

Для определения генотипов штаммов из Забайкальского степного и Тувинского горного очагов чумы нами было проведено секвенирование гена *parA* и исследовано наличие у них делеции М 24. Как оказалось, характерная для средневекового биовара мутация (замена единичного нуклеотида G→T в позиции 613) гена *parA* у этих штаммов отсутствует, что, в комплексе с наличием у них способности к редукции нитратов, доказывает их принадлежность к античному биовару. Эта принадлежность подтверждена нами и при использовании ПЦР для выявления

делеции М 24, которая, как оказалось, отсутствует в их геноме. Полученные нами данные на генетическом уровне подтверждают принадлежность штаммов из Забайкальского степного очага чумы к античному биовару, а также впервые ставят вопрос о циркуляции штаммов античного биовара и в Тувинском горном очаге чумы сусликового типа. В отношении Тувинского горного очага чумы остается неясным вопрос о том, произошла ли здесь незарегистрированная ранее смена основного носителя, или тип носителя вообще не важен для циркуляции штаммов античного или средневекового биоваров. Полученные нами данные о циркуляции в Забайкальском степном и Тувинском горном очагах чумы сусликового типа штаммов античного биовара свидетельствуют об отсутствии жесткой корреляции между биоварной принадлежностью штаммов *Y. pestis* и типом основного носителя в очаге. Из примера Забайкальского степного очага следует, что произошедшая здесь смена носителя не привела к замене существующих на этой территории штаммов античного биовара на штаммы средневекового биовара, которые, как правило, циркулируют в очагах сусликового типа.

Результаты, полученные в этой работе, также ставят вопрос о диагностической ценности признака редукции нитратов как характерного признака средневекового биовара. Выявление нами атипичных штаммов *Y. pestis* античного биовара, не способных редуцировать нитраты, свидетельствует о необходимости использования генетического маркера – мутации (замены единичного нуклеотида G→T в позиции 613) гена *parA* для доказательства принадлежности исследуемого изолята *Y. pestis* к средневековому биовару. Эти факты еще раз подтверждают преимущество использования генетических методов дифференциации по сравнению с фенотипическими. Эти данные также требуют разработки более надежных методов разделения штаммов античного и средневекового биоваров, основанных на их генетических особенностях.

Работа выполнена по государственному контракту № 53-Д от 04.06.12 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Куклева Л.М., Павлова А.И., Краснов Я.М., Шавина Н.Ю. и др. Стандартный алгоритм молекулярного типирования штаммов *Yersinia pestis*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2012; 3:25–35.
2. Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Куклев В.Е., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Одинокоев Г.Н., Кутырев В.В. Сравнение полной нуклеотидной последовательности гена *rhaS* у штаммов возбудителя чумы основного и неосновных подвидов. Пробл. особо опасных инф. 2008; 3(97):38–42.
3. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М: Медицина; 2009. 470 с.
4. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности: МУ 1.3.2569-09. М.; 2009. 42 с.
5. Одинокоев Г.Н., Ерошенко Г.А., Видяева Н.А., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Кутырев В.В. Структурно-функциональный

анализ генов *nap* оперона у штаммов *Yersinia pestis* разных подвидов. Пробл. особо опасных инф. 2008; 4(98):40–2.

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

7. Попов Н.В., Безсмертный В.Е., Матросов А.Н., Немченко Л.С., Вержуцкий Д.Б., Малецкая О.В. и др. Эпизоотическая активность природных очагов чумы Российской Федерации в 2010 г. и прогноз на 2011 г. Пробл. особо опасных инф. 2011; 1(107):31–7.

8. Deng W., Burland V., Plunkett G. et al. Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. J. Bacteriol. 2002; 184:4601–11.

9. Motin V.L., Georgescu A.M., Elliot J.M. et al. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*glpD*). J. Bacteriol. 2002; 184:1019–27.

10. Zhou D., Han Y., Song Y. et al. DNA microarray analysis of genome dynamics in *Yersinia pestis*: insights into bacterial genome microevolution and niche adaptation. J. Bacteriol. 2004; 186:5138–46.

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

1. Eroshenko G.A., Odinkov G.N., Kukleva L.M., Pavlova A.I., Krasnov Ya.M., Shavina N.Yu. et al. [Standard algorithm of molecular typing of *Yersinia pestis* strains]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2012; 3:25–35.

2. Koukleva L.M., Eroshenko G.A., Kouklev V.E., Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Odinkov G.N., Kutyrev V.V. [Comparison of complete nucleotide sequence of *rhaS* gene in the strains of plague etiological agent of main and minor subspecies]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2008; (97):38–42.

3. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infections. Practical Guidelines]. M.: Meditsina; 2009. 470 p.

4. [Labor management in laboratories using nucleotide acid amplification methods for work with objects containing microorganisms of I–IV groups of pathogenicity: MR 1.3.2569-09]. M.; 2009. 42 p.

5. Odinkov G.N., Eroshenko G.A., Vidyayeva N.A., Krasnov Ja.M., Gouseva N.P., Kutyrev V.V. [Structural and functional analysis of *nap* operon genes in *Yersinia pestis* strains of different subspecies]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2008; (98):40–2.

6. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors [Plague Natural Foci in Caucasus, Caspian Sea Region, Central Asia and Siberia]. M.: Meditsina; 2004. 192 p.

7. Popov N.V., Bezsmertny V.E., Matrosov A.N., Nemchenko L.S., Verzhutsky D.B., Maletskaya O.V. et al. [Epizootic activity of plague natural foci in the Russian Federation in 2010 and prognosis for 2011]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2011; (107):31–7.

#### Authors:

Pavlova A.I., Eroshenko G.A., Odinkov G.N., Koukleva L.M., Shavina N.Yu., Krasnov Ya.M., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

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

Поступила 05.09.12.

Е.В.Пименов<sup>1,2</sup>, В.А.Оборин<sup>3</sup>, А.Г.Ивонин<sup>1,2</sup>

## ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БАКТЕРИЙ ВАКЦИННОГО ШТАММА *YERSINIA PESTIS* EV НИИЭГ С ЭРИТРОЦИТАМИ ЧЕЛОВЕКА

<sup>1</sup>Лаборатория сравнительной кардиологии Коми НЦ УрО РАН, Сыктывкар;

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Вятская государственная сельскохозяйственная академия», Киров;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВПО «Вятский государственный гуманитарный университет», Киров

В сравнительных экспериментах установлена сильная корреляционная связь между показателем адгезии штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека и гидрофобными свойствами бактерий, в то же время зависимости между гемагглютинирующей способностью и адгезивностью чумного микроба не обнаружено. Выявлено, что обработка культуры бактерий трипсином и воздействие на нее высокой температуры (56 °С) приводят к снижению адгезии. Показано, что инкубация микробных клеток с эритроцитами в присутствии антибиотиков (ампициллин, гентамицин, доксициклин и цефотаксим) не влияет на их взаимодействие. Результаты проведенных исследований позволяют предположить, что основная роль в адгезии штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека принадлежит гидрофобным взаимодействиям, которые обусловлены поверхностными структурами микробных клеток, относящимися к липопротеидам.

**Ключевые слова:** штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ, эритроциты, механизм взаимодействия, адгезия, гидрофобность, гемагглютинация, трипсин, антибиотики.

E.V.Pimenov<sup>1,2</sup>, V.A.Oborin<sup>3</sup>, A.G.Ivonin<sup>1,2</sup>

## Investigation of Mechanisms of Interaction of *Yersinia pestis* EV NIEG Vaccine Strain Bacteria with Human Red Blood Cells

<sup>1</sup>The Laboratory of Comparative Cardiology of the Komi Research Centre of the RAMS Ural Division, Syktyvkar;

<sup>2</sup>Vyatka State Agricultural Academy, Kirov; <sup>3</sup>Vyatka State University, Kirov

The comparative experiments demonstrated strong correlation between the index of *Yersinia pestis* EV NIEG strain adhesion to human red blood cells and hydrophobic properties of bacteria. At the same time no dependence between hemagglutination and adhesion of plague microbe was determined. Bacterial culture treatment with trypsin and high temperature (56 °C) decreased adhesion. Incubation of microbial cells with red blood cells in the presence of antibiotics (ampicillin, gentamycin, doxycycline and cefotaxime) had no influence on their interaction. The results of investigations suggested the major role of hydrophobic interactions in *Y.pestis* EV NIEG strain adhesion to human red blood cells provided by the surface structures of microbial cells of the lipoprotein origin.

**Key words:** *Y.pestis* EV NIEG strain, red blood cells, mechanism of interaction, adhesion, hydrophobic properties, hemagglutination, trypsin, antibiotics.

Прикрепление бактерий к эукариотическим клеткам представляет собой сложный процесс, обусловленный как физико-химическими взаимодействиями их поверхностей, так и более тонкими молекулярными взаимодействиями между адгезинами микробных клеток и специфическими рецепторами мембраны клеток-мишеней [1, 2, 5, 6, 12].

По мнению ряда исследователей [2, 10, 11, 13], на начальной стадии адгезии бактерий к субстрату определяющую роль играет гидрофобность их поверхности. В связи с этим сравнительное изучение гидрофобных и адгезивных свойств чумного микроба может позволить установить механизмы его взаимодействия с клетками макроорганизма. В работе представлены результаты определения гидрофобных свойств и адгезивной активности клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных в различных условиях, в отношении эритроцитов человека.

Для выяснения природы поверхностных структур бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ, участвующих в прикреплении к эритроцитам, микробную культуру подвергали различным воздействиям, после чего

оценивали ее адгезивные свойства. Полученные в ходе экспериментов данные и их обсуждение приводятся ниже.

### Материалы и методы

В исследованиях использовали бактерии штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выделенные из коммерческой чумной живой сухой вакцины. Микробные клетки выращивали на ГРМ-агаре, агаре Хоттингера и мясопептонном агаре (рН 7,2) в течение 48 ч. В качестве дополнительных ингредиентов использовали сульфит натрия (1:30000) и генцианвиолет (1:100000). Бактерии суспендировали в 0,9 % растворе хлорида натрия (рН 7,2). Конечная концентрация клеток в суспензии соответствовала 1,0 у.е. оптической плотности при длине волны проходящего света 540 нм и длине оптического пути кюветы 5 мм. Для измерения оптической плотности суспензии применяли фотоэлектроколориметр КФК-2.

Эритроциты получали из венозной крови донора 0(I) Rh+ группы крови. В качестве антикоагулянта

применяли 3,8 % раствор лимонно-кислого натрия (1:10). Не позднее 24 ч после взятия крови эритроциты трижды отмывали десятикратным объемом 0,9 % раствора хлорида натрия (рН 7,2) путем центрифугирования при 1000 об/мин в течение 5 мин и ресуспендировали в этом же растворе. Конечная концентрация эритроцитов в суспензии составляла  $1,0 \cdot 10^{12}/л$ .

Адгезивную активность микробных культур определяли с помощью разработанного авторами фотоколориметрического метода [7, 8]. Гидрофобность бактерий оценивали по степени их адсорбции на поверхности капель хлороформа [9]. Гемагглютинирующую активность микробных клеток определяли по методике [4].

При трипсинизации микробной культуры бактерии суспендировали в 0,5 % растворе трипсина, приготовленном на 0,9 % растворе хлорида натрия (рН 7,2), и инкубировали в течение 1–3 ч при  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Затем клетки дважды отмывали от трипсина 0,9 % раствором хлорида натрия (рН 7,2) путем центрифугирования при 4000 об/мин в течение 10 мин и ресуспендировали в этом же растворе. При оценке влияния высокой температуры на адгезивную способность штамма суспензию бактерий прогревали при  $(56 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 5, 10, 20 и 30 мин.

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

## Результаты и обсуждение

На первом этапе работы проводили сравнение адгезивной активности и гидрофобных свойств культур *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных на ГРМ-агаре при различной температуре. Микробные клетки, культивируемые при  $(20 \pm 1)$  и  $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$  и обладающие выраженными адгезивными свойствами, проявляли достаточно высокую гидрофобность (значения ПГ составляли 38–44 %). У культуры, выращенной при  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  и характеризующейся низкой адгезивностью, гидрофобные свойства были выражены относительно слабо – ПГ находился на уровне 8 %.

Из литературы [3] известно, что в составе клеток штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ , обнаруживается на два белка меньше, чем у бактерий, инкубированных при низкой температуре. Вероятно, именно эти белки придают клеткам более выраженную гидрофобность и участвуют в их прикреплении к эритроцитам.

Последующие эксперименты показали, что гидрофобность и адгезивные свойства микробных клеток зависят не только от температуры культивирования, но и от состава питательной среды (табл. 1).

При выращивании бактерий на агаре Хоттингера их адгезивные и гидрофобные свойства были значительно выше, чем при выращивании на мясопептонном агаре. При этом добавление в состав мясопеп-

Таблица 1

Показатели адгезии и гидрофобности бактерий *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных при  $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$  на питательных средах различного состава (n=5)

| Дополнительные ингредиенты     | Питательная среда  |                  |                  |                  |
|--------------------------------|--------------------|------------------|------------------|------------------|
|                                | мясопептонный агар |                  | агар Хоттингера  |                  |
|                                | ПА, %              | ПГ, %            | ПА, %            | ПГ, %            |
| Отсутствуют                    | 35,93 $\pm$ 3,87   | 15,26 $\pm$ 3,34 | 59,67 $\pm$ 3,81 | 27,44 $\pm$ 3,32 |
| Сульфит натрия                 | 29,24 $\pm$ 4,75   | 13,52 $\pm$ 3,02 | 74,48 $\pm$ 2,71 | 30,48 $\pm$ 3,48 |
| Генцианвиолет                  | 34,26 $\pm$ 4,48   | 16,95 $\pm$ 3,75 | 78,21 $\pm$ 3,21 | 29,15 $\pm$ 3,57 |
| Сульфит натрия + генцианвиолет | 38,97 $\pm$ 9,19   | 15,72 $\pm$ 3,96 | 76,63 $\pm$ 2,97 | 32,26 $\pm$ 0,77 |

тонного агара сульфита натрия и генцианвиолета не оказывало значительного влияния на адгезивность и гидрофобность микробных клеток, в то же время внесение этих ингредиентов в агар Хоттингера приводило к значительному повышению уровня адгезии и в меньшей степени – гидрофобности испытуемой культуры. Между значениями ПА и ПГ микробных культур выявили высокую степень корреляционной связи ( $r=0,9$ ), что позволило предположить о важной роли гидрофобных взаимодействий в процессе адгезии клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека.

На следующем этапе исследований изучили взаимосвязь гемагглютинирующей способности штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ с его адгезивными свойствами. При этом было показано, что два данных свойства проявлялись независимо друг от друга (табл. 2). Следовательно, РГА не позволяла раскрывать адгезивную способность исследуемого штамма. В этом плане преимуществами обладала методика, предложенная авторами.

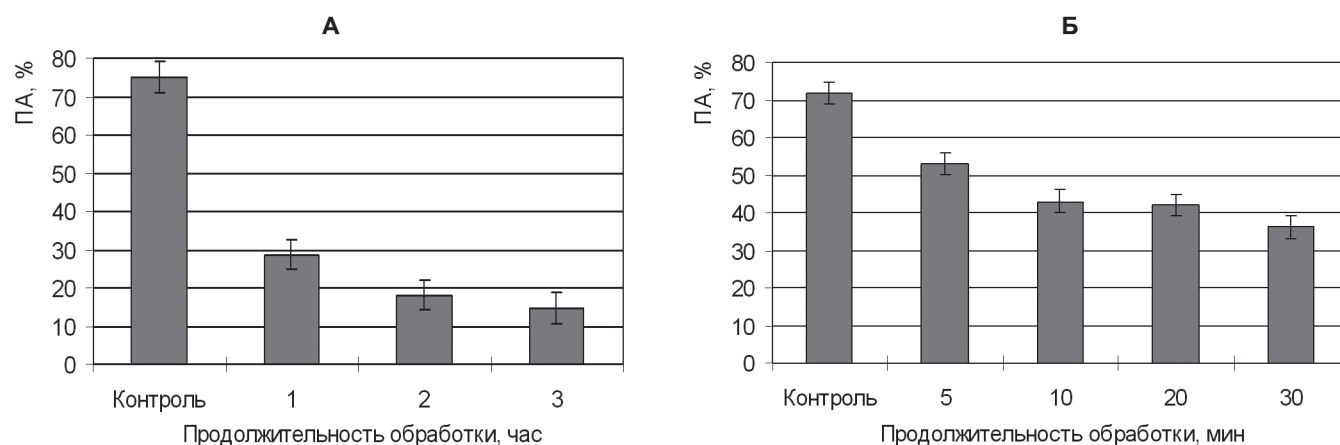
В дальнейшем для установления состава структур клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ, ответственных за адгезию к эритроцитам, провели эксперименты, заключающиеся в воздействии на микробную культуру различными экзогенными факторами (трипсином, высокой температурой, антибиотиками) и последующей оценке уровня адгезии. Установили (рисунок), что обработка бактерий трипсином в течение 1–3 ч приводила к снижению интенсивности адгезии в 2,6–5,1 раза, а прогревание в течение 5–30 мин – в 1,3–1,9 раза по сравнению с интактными бактериями.

Полученные результаты свидетельствовали о белковой природе факторов, обеспечивающих фиксацию чумного микроба к эритроцитам. Тем не менее, под воздействием высокой температуры и ферментативной обработки бактерий их адгезивная

Таблица 2

Адгезивные и гемагглютинирующие свойства культур *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных при различной температуре на ГРМ-агаре (n=5)

| Показатели (M $\pm$ m) | Температура выращивания микробной культуры, $^\circ\text{C}$ |                     |                     |
|------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|
|                        | 20 $\pm$ 1                                                   | 28 $\pm$ 1          | 37 $\pm$ 1          |
| ПА, %                  | 57,44 $\pm$ 1,18                                             | 76,68 $\pm$ 2,32    | 14,57 $\pm$ 1,85    |
| Титр РГА               | 1:96,0 $\pm$ 32,0                                            | 1:266,7 $\pm$ 138,7 | 1:277,3 $\pm$ 129,8 |



Показатели адгезии клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека после обработки трипсином (А) и прогревания (Б) (n=5)

способность полностью не исчезала. Вероятно, что в прикреплении чумного микроба к эритроцитам, помимо поверхностных белков, участвуют и другие субстанции. Учитывая корреляцию гидрофобности и адгезивности клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ, можно предположить, что структуры, ответственные за связывание бактерий с чувствительными клетками, являются липопротеидами.

В заключительной серии экспериментов оценили влияние ряда антибиотиков (ампициллина, гентамицина, доксициклина и цефотаксима) на способность клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ прикрепляться к эритроцитам человека.

Препараты применяли в субтерапевтических и терапевтических концентрациях (создаваемых в сыворотке крови при внутривенном введении терапевтических доз): гентамицин – 3,0 и 6,0 мкг/мл, ампициллин – 10,0 и 20,0 мкг/мл, цефотаксим – 40,0 и 100,0 мкг/мл соответственно. Использовали различные варианты внесения антибиотиков в пробы: добавление к бактериям непосредственно перед их смешиванием с эритроцитами с последующей инкубацией проб на вращающейся платформе при  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение 30 мин; предварительную 30-минутную обработку бактерии/эритроцитов при  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  на вращающейся платформе с последующим добавлением необработанных эритроцитов/бактерий. Результаты эксперимента показали, что тестируемые антибактериальные препараты не вызвали достоверных изменений уровня адгезии микробных клеток.

Таким образом, нами проведены сравнительные исследования адгезивных, гемагглютинирующих и гидрофобных свойств штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ. Между гидрофобностью бактерий и их адгезивной способностью в отношении эритроцитов выявлена сильная корреляционная связь. Следовательно, в адгезии данного штамма к клеткам-мишеням важная роль принадлежит гидрофобным взаимодействиям. В то же время какой-либо зависимости между адгезивностью и гемагглютинирующей активностью микробных клеток не выявлено, что не позволяет ис-

пользовать РГА для оценки адгезии чумного микроба к эритроцитам. Установлено, что обработка трипсином и воздействие высокой температуры ( $56^\circ\text{C}$ ) приводит к снижению адгезивных свойств микробных клеток. Поэтому можно предположить, что структуры, отвечающие за процесс взаимодействия чумного микроба с эритроцитами, принадлежат к липопротеидам. Для подтверждения этого необходимы дальнейшие исследования. Показано, что антибиотики (ампициллин, доксициклин, гентамицин, цефотаксим) не влияют на адгезию *Y. pestis* EV НИИЭГ к эритроцитам человека.

Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований УрО РАН, проект № 12-П-4-1069 «Функционирование сердечно-сосудистой системы в условиях кислородной недостаточности».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко В.М., Gang W., Barcus M.M. Адгезивная активность клинических штаммов клебсиелл. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1996; 2:104–9.
2. Езепчук Ю.В. Патогенность как функция биомолекул. М.: Медицина; 1985. 240 с.
3. Зюзина В.П., Демидова Г.В., Соколова Е.П., Беспалова И.А., Бородин Т.Н., Алексеева Л.П. и др. Сравнение спектра белков, присутствующих в препаратах липополисахаридов *Yersinia pestis*, выращенных при 28 и  $37^\circ\text{C}$ . Биотехнология. 2003; 3:20–4.
4. Костюкова Н.Н., Переверзев Н.А. Адгезия у *Corynebacterium diphtheriae*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1985; 11:30–2.
5. Костюкова Н.Н. Начальный этап инфекционного процесса – колонизация и пути ее прекращения. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1989; 9:103–10.
6. Макаренко И.Д., Компанец Г.Г., Запорожцев Т.С. Ингибирование адгезии патогенных микроорганизмов на эукариотических клетках. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2006; 3:121–5.
7. Оборин В.А., Ивонин А.Г., Пименов Е.В., Романов В.Е., Абаева Ф.И., Вылегжанина О.В. Изучение адгезии клеток вакцинного штамма EV *Yersinia pestis* к эритроцитам человека фотокolorиметрическим методом. Вестник НГУ. Сер.: Биол., клин. мед. 2009; 7(3):25–9.
8. Романов В.Е., Ивонин А.Г., Бондаренко А.Л., Оборин В.А., Нехорошикина Е.Л. Способ определения бактериофиксирующей активности эритроцитов. Патент 2360969 РФ, опубл. 10.07.2009 г. Бюл. № 11.
9. Серебрякова Е.В., Дармов И.В., Медведев Н.П., Алексеев С.А., Рыбак С.И. Оценка гидрофобных свойств бактериальных клеток по адсорбции на поверхности капель хлороформа. Микробиология. 2002; 71(2):237–9.
10. Федорович В.В., Калужный С.В., Ван-дер-Мирен П.,

Верстац В. Разработка феноменологической модели кинетики бактериальной адсорбции на низкоэнергетических поверхностях. Вестник Московского ун-та. Сер. 2. Химия. 2002; 43(6):417–20.

11. Яскович Г.А., Яковлева Е.П. Изучение гидрофобности поверхности штаммов клеток бактерий. Микробиология. 1996; 65(4):565–71.

12. Jones C.H., Jones C.H., Pinkner J.S., Roth R., Heuser J., Nicholes A.V. et al. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the *Enterobacteriaceae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995; 92(2):2081–5.

13. Rosenberg M., Gutnick D., Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. FEMS Microbiol. Lett. 1980; 9(1):29–33.

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

1. Bondarenko V.M., Gang W., Barcus M.M. [Adhesion activity of clinical strains of *Klebsiella*]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1996; 2:104–9.

2. Ezechuk Yu.V. [Pathogenicity as a Function of Biomolecules]. M.; 1985. 240 p.

3. Zyuzina V.P., Demidova G.V., Sokolova E.P., Bessalova I.A., Borodina T.N., Alekseeva L.P. et al. [Comparison of the protein spectrum of lipopolysaccharide preparations from *Yersinia pestis* grown at 28 and 37 °C]. Biotekhnologia. 2003; 3:20–4.

4. Kostyukova N.N., Pereverzev N.A. [Adhesion in *Corynebacterium diphtheriae*]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1985; 11:30–2.

5. Kostyukova N.N. [Early stage of infectious process – colonization and the way of its termination]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 1989; 9:103–10.

6. Makarenkova I.D., Kompanets G.G., Zaporozhets T.S. [Inhibition of pathogenic microorganisms adhesion on eukaryotic cells]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2006; 3:121–5.

7. Oborin V.A., Ivonin A.G., Pimenov E.V., Romanov V.E., Abasheva

F.I., Vylegzhanina O.V. [Studying of adhesion of *Yersinia pestis* vaccinal strain EV cells to human erythrocytes by photocolourimetric method]. Vestnik Novosib. Gos. Univer. Ser.: Biol., Klin. Med. 2009; 7(3):25–9.

8. Romanov V.E., Ivonin A.G., Bondarenko A.L., Oborin V.A., Nekhoroshkina E.L. [The way of estimating bacteria-fixing activity of erythrocytes]. RF Patent № 2360969.

9. Serebryakova E.V., Darmov I.V., Medvedev N.P., Alekseev S.A., Rybak S.I. [Evaluation of the hydrophobicity of bacterial cells by measuring their adherence to chloroform drops]. Mikrobiologia. 2002; 71(2):237–9.

10. Fedorovich V.V., Kalyuzhny S.V., Van-der-Miren P., Verstrat V. [Development of a phenomenological model of bacterial adsorption to low energy surfaces]. Vestnik MSU. Ser. 2. Khimia. 2002; 43(6):417–20.

11. Yaskovich G.A., Yakovleva E.P. [Strain-specific variations in the hydrophobicity of the bacterial cell surface]. Mikrobiologia. 1996; 65(4):565–71.

## Authors:

Pimenov E.V., Ivonin A.G. The Laboratory of Comparative Cardiology of the Komi Science Centre of the RAMS Ural Division (Kommunisticheskaya St., 24, Syktyvkar, 167982, Russia), Vyatka State Agricultural Academy (Oktyabr'sky Pr., 133, Kirov, 610017, Russia).

Oborin V.A. Vyatka State University. Krasnoarmeiskaya St., 26, Kirov, 610002, Russia. E-mail: vaoborin50@mail.ru

## Об авторах:

Пименов Е.В., Ивоин А.Г. Лаборатория сравнительной кардиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук (167982, Сыктывкар, ул. Коммунистическая, 24). Вятская государственная сельскохозяйственная академия (610017, Киров, Октябрьский пр-т, 133).

Оборин В.А. Вятский государственный гуманитарный университет. 610002, Киров, ул. Красноармейская, 26. E-mail: vaoborin50@mail.ru

Поступила 15.11.12.

В.Н.Савельев, И.В.Савельева, О.В.Васильева, Б.В.Бабенышев, Д.А.Ковалев, Г.М.Грижебовский, А.Д.Антоненко, Ш.Х.Курбанов, Т.М.Бутаев, А.Н.Куличенко

## ЭВОЛЮЦИЯ *VIBRIO CHOLERAЕ ELTOR* И ОБНАРУЖЕНИЕ ИХ ГЕНОТИПИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ НА КАВКАЗЕ

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь

Проведен молекулярно-генетический анализ 73 штаммов холерного вибриона эльтор, изолированных от больных в разные годы (1970–1998 гг.) на территории Кавказа. 32 штамма, выделенные в 1970–1990 гг., определены как генотип I (содержит только гены *rstR<sup>El</sup>* и *ctxB<sup>El</sup>* – типичные холерные вибрионы эльтор, продуцирующие СТ 2-го типа); 31 штамм, изолированный в 1993–1998 гг., отнесен к генотипу II (с генами *rstR<sup>El</sup>*, *rstR<sup>Clas</sup>* и *ctxB<sup>Clas</sup>*), 3 – к генотипу III (с генами *rstR<sup>Clas</sup>*, *ctxB<sup>Clas</sup>*, *rstC*), 7 – к генотипу I. Генотипы II и III (генетически измененные) – гибридные варианты биовара эльтор, продуцирующие СТ 1-го типа.

**Ключевые слова:** *Vibrio cholerae* eltor, эволюция, генотипы холерного вибриона эльтор.

V.N.Savel'ev, I.V.Savel'eva, O.V.Vasil'eva, B.V.Babenyshev, D.A.Kovalev, G.M.Grizhebovsky, A.D.Antonenko, Sh.Kh.Kurbanov, T.M.Butaev, A.N.Kulichenko

## Evolution of *Vibrio cholerae* El Tor and Detection of Their Gene-Variants in the Caucasus

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol

Carried out is the molecular-genetic analysis of 73 *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated from patients at different time points in 1970–1988 in the territory of the Caucasus region. 32 strains isolated in 1970–1990 have been identified as genotype I (contains only *rstR<sup>El</sup>* and *ctxB<sup>El</sup>* genes – typical cholera vibrios El Tor producing CT of the II type); 31 strains isolated in 1993–1998 have been classified as genotype II (with *rstR<sup>El</sup>*, *rstR<sup>Clas</sup>* and *ctxB<sup>Clas</sup>* genes), 3 strains, isolated within the same period, have fallen into the third genotype (with *rstR<sup>Clas</sup>*, *ctxB<sup>Clas</sup>*, *rstC* genes), and 7 strains – to the genotype I. Genotypes I and II (genetically altered ones) are the hybrid variants of the El Tor biovar producing CT of the first type.

**Key words:** *Vibrio cholerae* El Tor, evolution, genotypes of the cholera vibrio El Tor.

К настоящему времени в процессе эволюции сформировались 3 эпидемически опасных, отличающихся по фенотипическим и генотипическим свойствам, варианта возбудителя холеры: *Vibrio cholerae* O1 классического биовара, *Vibrio cholerae* O1 биовара эльтор и *Vibrio cholerae* O139 серогруппы [4]. Основным же возбудителем 7-й пандемии на протяжении более полувека продолжает оставаться *V. cholerae* O1 биовара эльтор [2].

*Vibrio cholerae* O1 классического биовара был возбудителем первых шести пандемий азиатской холеры (1817–1926 гг.), при которой в ряде стран «смертность превышала возможность хоронить мертвых» [1, 10]. Однако в 1961 г. более чем у 90 % всех заболевших холерой в мире обнаруживались *V. cholerae* O1 биовара эльтор, гемолизположительные в пробе Грейга, которые в августе 1962 г. были признаны ВОЗ возбудителями холеры эльтор [9]. Но эпидемический потенциал данных штаммов холерного вибриона эльтор оказался недостаточно высоким для дальнейшего эпидемического распространения. Эту функцию взял на себя новый вариант холерного вибриона эльтор – *V. cholerae* O1 eltor anhaemolyticus, обусловивший крупную вспышку холеры в Западном Ириане (Новая Гвинея) в октябре 1962 г. [7]. В середине шестидесятых годов прошлого столетия негемолитический, токсигенный (ctx+) холерный вибрион эльтор вытеснил классический биовар данных микроорганизмов на его эндемичной территории.

В 2002–2007 гг. появились сообщения [5, 12, 13]

о находках у выделенных в 1991–1994 гг. в Матлабе (Бангладеш) и в лечебном Центре Beira (Мозамбик, Африка) штаммов холерных вибрионов эльтор, несущих генотипические признаки вибрионов классического биотипа: их геном содержал ген *rstR* классического типа, а гены *ctxAB* кодировали синтез холерного токсина (СТ) также классического типа. Изоляты *V. cholerae* O1 с генотипическими признаками обоих биотипов получили название «гибридных» [11].

Характеристику генетически измененных штаммов холерных вибрионов O1 приводят в своей работе А. Сафа и соавт. [15]. Генотипическая характеристика измененных токсигенных штаммов холерного вибриона дана в сравнительном аспекте с типичными эльтор и классическими вибрионами. Так, геном СТХф типичного токсигенного холерного вибриона эльтор состоит из коровой области и области RS2. В коровой области гены *ctxAB* кодируют продукцию холерного энтеротоксина; гены *ase* и *zot*, обеспечивающие морфогенез фаговых частиц, кодируют синтез токсинов, нарушающих проницаемость эпителиальных клеток кишечника человека, способствующих свободному доступу в них энтеротоксина. Функция остальных трех генов, входящих в кластер токсигенности, изучена недостаточно. В область RS2 входят гены *rstA*, *rstB*, кодирующие репликацию, интеграцию фаговых частиц, и ген *rstR*, регулирующий эти процессы. Геном СТХф фланкируется с обеих сторон филаментозным фагом RS1, в геноме которого важную роль играет ген *rstC*, специфичный для типичного эльтор. Необходимо

отметить, что гены *ctxAB* кодируют продукцию токсина эльторовского типа (СТ2), т.е. энтеротоксина, аминокислотная последовательность субъединицы В которого в положении 39 содержит аминокислоту тирозин, а в позиции 68 – изолейцин.

Геном СТХф классического холерного вибриона состоит, как и у типичного эльтор, из коровой и RS2 областей с тем же набором генов. Гены *ctxAB* кодируют продукцию энтеротоксина классического типа (СТ1) – в положении 39 такой энтеротоксин субъединицы В содержит гистидин, а в положении 68 – треонин. Ген *rstR* по последовательностям нуклеотидов имеет четкие отличия от *rstR* холерного вибриона эльтор. Кроме того, геном СТХф классического холерного вибриона не фланкируется областью RS1.

В группу «атипичных» входят генетически разнородные холерные вибрионы O1 серологической группы. Так, матлабские варианты содержат в своем геноме профаг СТХф классического биовара с генами *rstR<sup>Clas</sup>* и аллелем *ctxB1*, кодирующем продукцию СТ1, и не дифференцируются на биовары. Вместе с тем данные варианты содержат кластер генов *VSP1* и *VSP2*, что указывает на происхождение матлабских вариантов от типичного холерного вибриона эльтор. Анализ электрофореграмм пульс-электрофореза показал наличие генов классического и эльтор биоваров [14]. Мозамбикские варианты фенотипически характеризуются как холерные вибрионы биотипа эльтор, содержат в своем геноме СТХф<sup>Clas</sup> с генами *rstR<sup>Clas</sup>* и аллелем *ctxB1*, кодирующем продукцию СТ1. Группа генетически измененных вариантов холерных вибрионов эльтор содержит «гибридный СТХф» с комбинацией генов *rstR<sup>El</sup>* и *ctxB1* (кодируют продукцию СТ1) или *rstR<sup>Clas</sup>* и *ctxB3* (кодируют продукцию СТ2). И, наконец, «гибридные эльтор» [15] содержат в геноме *rstR<sup>Clas</sup>* и *rstR<sup>El</sup>*, что является отражением присутствия двух различных копий СТХф, расположенных как тандемно на одной хромосоме, так и локально на различных хромосомах. Гибридные варианты эльтор продуцируют СТ1.

На основании приведенных данных, для генотипирования генетически измененных холерных вибрионов эльтор методом ПЦР определен оптимальный набор праймеров, мишенью которых будут ДНК генов *rstR<sup>El</sup>*, *rstR<sup>Clas</sup>*, *ctxA*, *ctxB1*, *B3* и *rstC*.

Все эпидемические осложнения по холере в России и странах СНГ явились следствием завоза инфекции из стран Юго-Восточной Азии (Индия, Пакистан, Иран) или Ближнего Востока (Сирия), что предопределило цель настоящего исследования: ретроспективный поиск генетически измененных вариантов холерного вибриона эльтор среди изолированных в 90-е годы на Кавказе.

## Материалы и методы

В работе изучены 73 штамма холерного вибриона эльтор, из которых 32 выделены от больных в 1970–1990 гг. в Грузии, Дагестане и Ставропольском крае,

41 – в 1993, 1994, 1998 гг. в Дагестане. Клинические изоляты идентифицированы как холерные токсигенные вибрионы O1 серологической группы биовара эльтор сероваров Огава или Инаба.

Определение генотипов, в том числе и генетически измененных, среди клинических изолятов холерного вибриона эльтор, выделенных на Кавказе в период 7-й пандемии, осуществляли методом ПЦР, детектируя фрагменты генов *rstR<sup>El</sup>*, *rstR<sup>Clas</sup>*, *ctxA*, *ctxB1(B<sup>Clas</sup>)*, *ctxB3(B<sup>El</sup>)*, *rstC*. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе, синтезированы в ЗАО «Синтол» (табл. 1).

Для определения размеров ампликонов использовали 100 bp DNA Ladder (100–3000 bp). Секвенирование ампликонов проводили на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems) с набором реактивов BigDye Terminator v3.1 в соответствии с методическими рекомендациями производителя, исходные данные анализировали в программе Sequencing Analysis v5.4. При сопоставлении последовательностей были использованы программы FinchTV 1.4.0. и BLAST (NCBI).

## Результаты и обсуждение

Результаты исследований (табл. 2) показывают, что 32 клинических изолята, выделенные от людей в 1970–1990 гг., и 7 штаммов, выделенные в 1993–1994 гг., отнесены нами к генотипу I, 31 штамм – к генотипу II, а 3 штамма – к генотипу III, которые по генетической структуре прилегающего к умеренному фагу СТХф участку RS1 с геном *rstC* отличались от классического биовара, фенотипически оставаясь эльтор вибрионом. «Гибридный», или смешанный, генотип II составили дагестанские штаммы, выделенные в 1993, 1994 и 1998 гг. Эти штаммы отличались также полиантибиотикорезистентностью (от 3 до 8 маркеров устойчивости), и большая их часть не лизировалась фагами С, эльтор II, ХДФ 3, 4, 5.

Полученные данные позволили выявить среди клинических изолятов три генотипа холерного вибриона эльтор, которые характеризовались наличием, наряду с *ctxA*, *rstC*, следующих генов: генотип I содержал только свои собственные, эльторовские,

Таблица 1

Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

| Тестируемый ген                | Нуклеотидная последовательность праймера, 5–3'      | Размер ампликона, п.н. | Источник |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------|----------|
| <i>rstR<sup>El</sup></i>       | gcaccatgatttaagatgctc<br>tcgagttgtaattcatcaagagtg   | 501                    | [8]      |
| <i>rstR<sup>Clas</sup></i>     | cttctcatcagcaagcctccatc<br>tcgagttgtaattcatcaagagtg | 501                    | [8]      |
| <i>ctxA</i>                    | cgggcagattctagacctg<br>cgatgatcttgagcactatccccac    | 564                    | [6]      |
| <i>ctxB1(B<sup>Clas</sup>)</i> | actatcaacagcatatgcacatgg<br>cctggttacttgaaacg       | 186                    | [15]     |
| <i>ctxB3(B<sup>El</sup>)</i>   | actatcaacagcatatgcacatgg<br>cctggttacttgaaaca       | 186                    | [15]     |
| <i>rstC</i>                    | atgagtttgaaaccataccttt<br>ttacagtgatgatcagcaat      | 224                    | [12]     |

Генотипы холерного вибриона эльтор среди 73 клинических изолятов, выделенных на Кавказе в период 7-й пандемии

| Фенотип, годы выделения,<br>кол-во исследованных штаммов  | Кол-во изолятов с детектируемыми генами |                            |             |                            |                          |             | Генотип |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------|-------------|----------------------------|--------------------------|-------------|---------|
|                                                           | <i>rstR<sup>El</sup></i>                | <i>rstR<sup>Clas</sup></i> | <i>ctxA</i> | <i>ctxB<sup>Clas</sup></i> | <i>ctxB<sup>El</sup></i> | <i>rstC</i> |         |
| <i>V. cholerae</i> O1 биовара эльтор, 1970–1990 гг., n=32 | 32                                      | 0                          | 32          | 0                          | 32                       | 32          | I       |
| <i>V. cholerae</i> O1 биовара эльтор, 1993–1998 гг., n=41 | 7                                       | 0                          | 7           | 0                          | 7                        | 7           | I       |
|                                                           | 31                                      | 31                         | 31          | 31                         | 0                        | 31          | II      |
|                                                           | 0                                       | 3                          | 3           | 3                          | 0                        | 3           | III     |

гены – *rstR<sup>El</sup>* и *ctxB<sup>El</sup>*, генотип II – гены *rstR<sup>El</sup>*, *rstR<sup>Clas</sup>* и *ctxB<sup>Clas</sup>*, генотип III – *rstR<sup>Clas</sup>* и *ctxB<sup>Clas</sup>* (табл. 2), т.е. генотипы II и III содержат ген *ctxB<sup>Clas</sup>*, кодирующий энтеротоксин классического типа.

При секвенировании гена *ctxB* штаммов холерного вибриона эльтор, отнесенных нами к генотипу I, установлено, что в нуклеотидной последовательности данного гена в позициях 115 и 203 присутствует тимин, а кодируемая им аминокислотная последовательность субъединицы В холерного токсина в положении 39 содержит аминокислоту тирозин, в положении 68 – изолейцин.

В нуклеотидной последовательности гена *ctxB* штаммов холерного вибриона эльтор II и III генотипов в позициях 115 и 203 находится цитозин, а кодируемый им экзотоксин в положениях 39 и 68 содержит соответственно аминокислоты гистидин и треонин. Данные секвенирования свидетельствуют о том, что штаммы I генотипа продуцируют СТ 2-го типа, а II и III генотипов – СТ 1-го типа.

Таким образом, штаммы холерных вибрионов I генотипа являются типичными токсигенными холерными вибрионами биовара эльтор, вызвавшими эпидемиологические осложнения по холере на Кавказе в 1970–1990 гг., хотя единичные случаи этой инфекции наблюдались в 1993–1998 гг. Генотипы II и III следует определить как генетически измененные варианты биовара эльтор, обусловившие эпидемические вспышки и единичные случаи холеры в Дагестане в 1993–1998 гг. Такие геноварианты биовара эльтор продуцируют СТ 1-го типа, причем, как показали исследования Н.И.Смирновой и соавт. [4], в значительно большем количестве по сравнению с типичным токсигенным холерным вибрионом, являются полиантибиотикорезистентными и устойчивыми к холерным диагностическим бактериофагам. Учитывая полученные результаты и данные А.Сафа и соавт. [14], можно утверждать, что выявленные на Кавказе генотипы II и III холерного вибриона эльтор имеют клоновое происхождение от генетически измененных штаммов биовара эльтор, выделяемых в Азии и Африки.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бароян О.В. Холера Эль-Тор. М.: Медицина; 1971. 254 с.
2. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Федоров Ю.М., Москвитина Э.А., Подосинникова Л.С., Горобец А.В. Холера в начале века. Прогноз. Журн. микробиол., эпидемиол. и микробиол. 2005; 3:44–8.
3. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Шашкова А.В., Кутырев В.В. Вариативность генома измененных вариантов *Vibrio*

*cholerae* биовара эльтор, изолированных на территории России в современный период. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2011; 3:11–7.

4. Смирнова Н.И., Кутырев В.В., Костромитина Е.А., Осин А.В. Вариативность генома штаммов *Vibrio cholerae* биовара эльтор. Вестник РАМН. 2005; 7:19–26.

5. Ansaruzzaman M. Cholera in Mozambique, variant of *Vibrio cholerae*. Emerg. Infect. Dis. 2004; 10:2057–9.

6. Bhattacharya T., Chatterjee S., Maiti D., Bhadra R.K., Takeda Y., Nair G.B., Nandy R.K. Molecular analysis of the *rstR* and *orfU* genes of the CTX prophages integrated in the small chromosomes of environmental *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strains. Environ. Microbiol. 2006; 8:526–34.

7. De Moor C.E. A non-haemolytic El-Tor *Vibrio* as the cause of an outbreak of paracholera in West New Guinea. The El-Tor problem paracholera in the West Pacific. Trop. Geogr. Med. 1963; 15(2):97–107.

8. Faruque S.M., Nair G.B. Molecular ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiol. Immunol. 2002; 46:59–66.

9. Hugh R. The taxonomy of El-Tor *Vibrios*. Bact. Proc. 1962; 5:123–8.

10. Karaolis D.K.R., Lan R., Reeves P.R. Molecular evolution of the seventh-pandemic clone of *Vibrio cholerae* and its relationship to other pandemic and epidemic *V. cholera* isolates. J. Bacteriol. 1994; 176:3191–8.

11. Morita M., Ohnishi M., Arakawa E., Bhuiyan N.A., Nusrin S., Alam M. et al. Development and validation of a mismatch amplification mutation PCA assay to monitor the dissemination of an emerging variant of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. Microbiol. Immunol. 2008; 1(52):314–7.

12. Nair G.B. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. J. Clin. Microbiol. 2002; 40:3296–9.

13. Safa A. Genomic relatedness of the new Matlab variants of *Vibrio cholerae* O1 to the classical and El Tor biotypes as determined by pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 2005; 43:1401–4.

14. Safa A., Sultana J., Cam P.D., Mwansa J., Kong R. *Vibrio cholerae* O1 eltor strains, Asia and Africa. Emerg. Infect. Dis. 2008; 15(6):987–8.

15. Safa A., Nair G.B., Alam M. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. Trends Microbiol. 2010; 18:46–54.

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

1. Baroyan O.V. [Cholera Biovar El Tor]. M.: Meditsina; 1971. 254 p.
2. Onishchenko G.G., Lomov Yu.M., Fedorov Yu.M., Moskvitina E.A., Podosinnikova L.S., Gorobets A.V. [Cholera in the beginning of the century. Prognosis]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2005; 3:44–8.
3. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Shashkova A.V., Kutyrev V.V. [Variability of the genome of *Vibrio cholerae* altered variants biovar El Tor, isolated in the territory of Russia in the modern period]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 2011; 3:11–7.
4. Smirnova N.I., Kutyrev V.V., Kostromitina E.A., Osin A.V. [Variability of the genome of *Vibrio cholerae* strains biovar El Tor]. RAMS Bulletin. 2005; 7:19–26.

## Authors:

Savel'ev V.N., Savel'eva I.V., Vasil'eva O.V., Babenyshev B.V., Kovalev D.A., Grizhebovsky G.M., Antonenko A.D., Kurbanov Sh.Kh., Butaev T.M., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

## Об авторах:

Савельев В.Н., Савельева И.В., Васильева О.В., Бабенышев Б.В., Ковалев Д.А., Грижебовский Г.М., Антоненко А.Д., Курбанов Ш.Х., Бутаев Т.М., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 08.11.12.

А.В.Шашкова, Д.А.Агафонов, А.В.Черкасов, С.П.Заднова, Н.И.Смирнова

**ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ  
ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННОГО ТОКСИГЕННОГО ШТАММА *VIBRIO CHOLERAЕ* 301  
БИОВАРА ЭЛЬТОР, ИЗОЛИРОВАННОГО В 2011 ГОДУ В РОССИИ**

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

Фенотипический и молекулярно-генетический анализ штамма *Vibrio cholerae* 301 O1 серовара Инаба биовара эльтор, выделенного в 2011 г. из морской воды в рекреационной зоне Таганрога, показал, что данный изолят относится к геновариантам возбудителя холеры эльтор. Установлено присутствие в его геноме гибридного профага CTXφ, содержащего ген *ctxB* классического типа и ген *rstR* эльтор типа, а также измененных острова патогенности VPI-1 и острова пандемичности VSP-II. Показано, что исследованный штамм продуцирует значительно больше холерного токсина (0,12 мкг/мл) по сравнению с типичными штаммами этого возбудителя.

**Ключевые слова:** *Vibrio cholerae* биовара эльтор, геноварианты, профаг CTXφ, VPI-1, VSP-II.

A.V.Shashkova, D.A.Agaonov, A.V.Cherkasov, S.P.Zadnova, N.I.Smirnova

**Phenotypic and Molecular-Genetic Analysis of Genetically Modified Toxigenic *Vibrio cholerae*  
El Tor Strain 301, Isolated in 2011 in Russia**

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

The phenotypic and molecular-genetic analysis of *Vibrio cholerae* O1 El Tor Inaba strain 301, isolated in 2011 from sea water in recreation zone in Taganrog, demonstrated this isolate to be a genetic variant of El Tor cholera causative agent. Its genome was shown to carry a hybrid prophage, containing gene *ctxB* of classical type and gene *rstR* of El Tor type, as well as altered pathogenicity island VPI-1 and pandemicity island VSP-II. This strain produced much more cholera toxin (0,12 mcg/ml) than typical strains of this causative agent.

**Key words:** *Vibrio cholerae* biovar El Tor, gene-variants, prophage CTXφ, VPI-1, VSP-II.

Возбудителем холеры, особо опасной инфекции, являются токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 серогруппы классического и эльтор биовара, а также *V. cholerae* O139 серогруппы. Холерные вибрионы классического биовара вызвали первые шесть пандемий холеры, тогда как возбудителем текущей, 7-й, пандемии, самой длительной из известных (с 1961 г. по настоящее время) является *V. cholerae* биовара эльтор. Холерные вибрионы O139 серогруппы вызывают спорадические случаи заболевания. В результате эволюции возбудителя холеры эльтор почти 20 лет назад возникли генетически измененные штаммы, или геноварианты, несущие в геноме профага CTXφ, кодирующего холерный токсин (ХТ), ген *ctxB* холерных вибрионов классического биовара (*ctxB1*) [11]. Современный период развития 7-й пандемии холеры характеризуется дальнейшим изменением генома *V. cholerae* биовара эльтор, что выражается в появлении дополнительной мутации в гене *ctxB*, нового аллеля гена *tcpA*, ответственного за биосинтез основной субъединицы токсин-корегулируемых пилей адгезии, необходимых на первом этапе развития инфекционного процесса – колонизации, а также протяженной делеции в острове пандемичности VSP-II [8]. К настоящему времени геноварианты вытеснили типичные штаммы возбудителя холеры эльтор на многих эндемичных территориях Юго-Восточной Азии и Африки.

Что касается России, то установлено, что начиная с 1993 г. все эпидемические вспышки и еди-

ничные случаи холеры были вызваны геновариантами [4]. Поскольку показано, что измененные варианты генетически неоднородны, большой интерес представляют генетические особенности штаммов *V. cholerae* биовара эльтор, выделенные на территории Российской Федерации в последние годы.

Цель работы состояла в проведении фенотипического анализа и исследовании структуры генома штамма *V. cholerae* 301 серовара Инаба биовара эльтор, выделенного в 2011 г. из морской воды в рекреационной зоне Таганрога.

### Материалы и методы

В работе использовали следующие штаммы, выделенные от больных или из внешней среды: 3 типичных штамма *V. cholerae* биовара эльтор (*V. cholerae* M818 (Саратов, 1970), P14376 (Ростов-на-Дону, 1990), M1259 (Ставрополь, 1990)) и два генетически измененных (*V. cholerae* M1269 (Дагестан, 1994), L3226 (Москва, 2010)), а также изучаемый штамм *V. cholerae* 301. Все штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий. Для культивирования штаммов использовали агар LB (pH 7,2). Определение лизабельности диагностическими фагами (классический и эльтор) проводили согласно инструкции производителя. Определение чувствительности к полимиксину В и способности к продукции ацетилметилкарбинола в реакции Фогес-Проскауэра определяли

согласно методическим указаниям [2].

Продукцию ХТ изучали с помощью иммуноферментного анализа GM<sub>1</sub>ELISA [15]. Для детекции ХТ штаммы выращивали в условиях, оптимальных для продукции данного белка эльтор вибрионами – бульон АК1 (1,5 % Бакто-пептона, 0,4 % дрожжевого экстракта Дифко, 0,5 % NaCl, 0,3 % NaHCO<sub>3</sub>), pH 7,6, при температуре 37 °C [9]. Измерение оптической плотности проводили на фотометре «Stat Fax 2100» (США) при длине волны 405 нм. Количество продуцируемого ХТ рассчитывали по калибровочному графику, построенному с использованием очищенного ХТ. Гемолитическую активность исследуемого штамма, способность к продукции растворимой гемагглютинин/протеазы (РГА/П) и фосфолипазы изучали на плотных средах по методикам, описанным ранее [7, 13, 16]. Подвижность определяли на полужидком (0,6 %) LB агаре.

Чувствительность к антибиотикам устанавливали при посеве штамма *V. cholerae* 301 на среды, содержащие соответствующие антибиотики [6]. Результат учитывали после инкубирования посевов в течение суток при температуре 37 °C по наличию/отсутствию роста на пластинках агара.

Для изучения генетической организации штамма использовали блот-гибридизацию по Саузерну, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и секвенирование. Подготовку и обеззараживание образцов для ПЦР и секвенирования проводили согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». Рестрикцию и блот-гибридизацию по Саузерну осуществляли по методу, описанному в пособии по молекулярному клонированию [1]. Для фрагментирования хромосом использовали рестриктазу *Pst*I. ПЦР проводили в микропробирках объемом 600 мкл на амплификаторах «БИС» (Россия) и «Терцик» (ДНК-Технология, Россия). Анализируемую ДНК добавляли в количестве 10 мкл в приготовленную реакционную смесь объемом 15 мкл (2,5 мкл стандартного 10x буфера; 2,5 мкл смеси 2 мМ дНТФ («Сибэнзим»); 0,25 мкл 5 ед/мкл Taq-полимеразы («Бионем»); по 0,5 мкл специфических праймеров и 8,75 мкл деионизированной воды).

Секвенирование генов проводили на приборе «CEQ8000» (Beckman Coulter, США). Полученные последовательности изучаемых генов сравнивали с последовательностями, представленными в GenBank для референс-штаммов *V. cholerae* N16961 эльтор биовара и *V. cholerae* O395 классического биовара. Анализ последовательностей ДНК осуществляли с использованием программ «Genetic Analysis System Software Version 9.0», «Mega4» и «BioEdit 7.1.3».

### Результаты и обсуждение

При изучении фенотипических свойств установлено, что штамм *V. cholerae* 301 обладает всеми

признаками, характерными для холерных вибрионов биовара эльтор: лизируется до ДРТ диагностическим фагом эльтор и не чувствителен к классическому фагу, растет на среде с добавлением 50 ед/мл полимиксина В, образует ацетилметилкарбинол в реакции Фогес-Проскауэра и продуцирует гемолизин при выращивании на плотных питательных средах с добавлением 1 % эритроцитов барана.

На следующем этапе работы был проведен сравнительный анализ продукции основных (холерного токсина) и дополнительных (ферменты патогенности, подвижность) факторов патогенности у изучаемого штамма. Было показано, что в условиях *in vitro* данный штамм синтезирует и секретирует в среду выращивания 0,12 мкг/мл холерного токсина, что значительно превышает данный показатель у взятых для контроля типичных вибрионов биовара эльтор: *V. cholerae* M818 – 0,03 мкг/мл, P14376 – 0,04 мкг/мл, M1259 – 0,02 мкг/мл. Вместе с тем уровень продукции ХТ этим штаммом соответствует таковому, характерному для измененных вариантов – *V. cholerae* M1269 – 0,1 мкг/мл, L3226 – 0,4 мкг/мл. Приведенные результаты полностью согласуются с данными литературы [14] и полученными нами ранее сведениями о повышенной продукции ХТ измененными вариантами, выделенными на территории России [4].

При оценке уровня продукции ферментов патогенности установлено, что штамм 301 обладает слабой фосфолипазной активностью (зона просветления на агаре с яичным желтком – 0,5 мм), а также синтезирует в небольшом количестве секретируемый белок РГАП (средняя зона просветления на агаре с молоком – 1,0 мм). Вместе с тем клетки исследуемого штамма оказались более подвижными по сравнению с ранее изученными типичными и генетически измененными штаммами. Средний радиус распространения клеток в макроколонии на полужидком агаре составил 7,0 мм.

Далее нами была исследована устойчивость штамма *V. cholerae* 301 к антибактериальным препаратам. При этом минимальная ингибирующая доза для хлорамфеникола составила 50 мкг/мл, тетрациклина – 2 мкг/мл, триметаприма – 100 мкг/мл, ампициллина – 10 мкг/мл, спектиномицина – 20 мкг/мл, стрептомицина – 10 мкг/мл. Анализ полученных данных позволил сделать вывод, что штамм устойчив к спектиномицину, стрептомицину и триметаприму, но чувствителен к тетрациклину, хлорамфениколу, канамицину, ампициллину и рифампицину.

Таким образом, изучаемый штамм *V. cholerae* 301 по фенотипическим свойствам, включая биовар-специфические, в целом не отличается от типичных штаммов холерных вибрионов биовара эльтор. В то же время установлено выраженное отличие между ним и типичными штаммами по продукции ХТ – основного фактора патогенности.

Повышенный уровень продукции ХТ штамма 301 может служить указанием на его принадлежность к геновариантам. Однако для решения этого вопроса

необходимо изучение его молекулярно-генетических особенностей. В этой связи далее была исследована структура генома его профага СТХф, содержащего оперон *ctxAB*, кодирующий синтез ХТ. С помощью сконструированной нами ранее диагностической ПЦР тест-системы, дифференцирующей типичные и генетически измененные штаммы [5], было показано, что в геноме штамма 301 присутствует профаг СТХф, содержащий ген *ctxB* холерных вибрионов классического биовара (*ctxB1*).

Учитывая, что гены *ctxAB*, кодирующие продукцию ХТ, входят в состав профага СТХф, нами была исследована структура данного мобильного генетического элемента. При ПЦР-тестировании 6 генов коровой части и 3 генов RS2-области установлено, что штамм *V. cholerae* 301 содержит полноценный профаг СТХф. Поскольку в настоящее время измененные варианты холерных вибрионов биовара эльтор могут нести разные аллели гена *ctxB* – *ctxB1* или *ctxB7* [3], нами было проведено секвенирование этого гена у штамма *V. cholerae* 301. В результате показано наличие цитозина в положениях 58, 115 и 206, что подтверждает присутствие в геноме профага СТХф аллеля *ctxB1*, который характерен для классических вибрионов. Поскольку в профаге СТХф измененных вариантов могут содержаться разные аллели гена *rstR*, далее нами было проведено его секвенирование. Оказалось, что в СТХф имеется эльтор аллель гена *rstR*. Это означает, что штамм 301 действительно является геновариантом возбудителя холеры эльтор и содержит в геноме гибридный профаг СТХф (*ctxB1*, *rstR*<sup>Eltor</sup>).

Учитывая ранее полученные нами данные о вариативности количества гептаповторов TTTTGAT в промоторной области оперона *ctxAB* (от 3 до 5) у измененных вариантов, нами было проведено секвенирование промоторной области штамма *V. cholerae* 301. Установлено, что исследуемый штамм содержит 4 копии гептаповторов, как и большинство типичных и изученных измененных вариантов холерного вибриона биовара эльтор.

На следующем этапе была определена копияемость профага СТХф у штамма 301, которую устанавливали с помощью блот-гибридизации по Саузерну с использованием СТ-зонда, созданного на основе амплифицированного фрагмента гена *ctxA* (564 п.н.). Хромосома фрагментировалась с помощью эндонуклеазы рестрикции *PstI*. В результате было показано, что в штамме *V. cholerae* 301 содержится одна копия профага СТХф, расположенная на *PstI*-фрагменте размером около 5,4 п.н.

Для установления локализации профага СТХф было проведено ПЦР-тестирование с праймерами CIIIF-CIIR на участки хромосомы, соседние с *dif*-сайтом на малой хромосоме. Суть данного анализа заключается в следующем: если профаг СТХф находится на малой хромосоме, то сайт рекомбинации занят и образование ампликона размером около 800 п.н. не происходит [10]. При проведении ПЦР нами был

обнаружен указанный ампликон. Это означает отсутствие профага СТХф в *dif*-сайте на малой хромосоме и указывает на его локализацию на большой хромосоме, что характерно для типичных штаммов возбудителя холеры эльтор.

Принимая во внимание тот факт, что геноварианты могут отличаться от типичных штаммов по структуре генома острова патогенности VPI-1 и острова пандемичности VSP-II, мы изучили структуру этих мобильных элементов. В первую очередь была определена нуклеотидная последовательность гена *tcpA*, входящего в состав острова патогенности VPI-1. Было показано, что ген *tcpA* содержит однонуклеотидную замену – в положении 266 аденин был заменен на гуанин (А на G). Эти данные указывают на присутствие в VPI-1 аллеля *tcpA*, который ранее был обнаружен в штамме *V. cholerae* CIRS101, выделенном в 2002 г. в Бангладеш, и обозначен как *tcpET*<sup>CIRS</sup> [8, 12]. Эти данные соответствуют ранее полученным нами результатам о наличии аллеля *tcpET*<sup>CIRS</sup> в штаммах геновариантов *V. cholerae*, вызвавших спорадические случаи холеры на территории России в 2004–2010 гг.

При изучении структуры острова пандемичности VSP-II с помощью ПЦР показано наличие протяженной делеции – из 13 исследованных отсутствовали 7 генов (VCO495–VCO512), локализованных в центральной части этого острова. Последующее секвенирование VSP-II данного штамма подтвердило наличие делеции. При этом было показано, что делеция затрагивает часть гена VCO495 и заканчивается в межгенном пространстве между генами VCO512 и VCO513. Кроме того, было обнаружено, что на месте делетированных генов присутствует нуклеотидная последовательность размером около 1,25 т.п.н., соответствующая генам, кодирующим А и В-субъединицы транспозазы *OrfAB*. Стоит отметить, что подобная нуклеотидная последовательность острова пандемичности VSP-II характерна для геновариантов, выделяемых в настоящее время в странах Юго-Восточной Азии и Восточной Африке [8].

Таким образом, фенотипический и молекулярно-генетический анализ штамма *V. cholerae* 301, завезенного на территорию России в 2011 г., показал, что исследованный изолят относится к геновариантам *V. cholerae* биовара эльтор, содержит в геноме гибридный профаг СТХф с геном *ctxB* классического типа и геном *rstR* эльтор типа. Исследуемый штамм, как и другие геноварианты возбудителя холеры эльтор, продуцирует *in vitro* повышенное количество ХТ. Установлено также присутствие в геноме измененного острова патогенности VPI-1, а также измененного острова пандемичности VSP-II. Эти данные свидетельствуют о том, что генетическая организация штамма *V. cholerae* 301 полностью соответствует штаммам, выделяемым в настоящее время в ряде эндемичных по холере стран Юго-Восточной Азии, являющимся высокопатогенными и имеющим высокий эпидемический потенциал.

Работа выполнена по государственному контракту № 53-Д от 04.06.2012 в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности (2009–2013 годы)» и гранту РФФИ 12-04-00285а.

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.; 1984. 480 с.
2. Лабораторная диагностика холеры: Методические указания МУК 4.2.2218-07. М.; 2007.
3. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Кутырев В.В. Эволюция генома возбудителя холеры в современный период. Мол. генет. микробиол. и вирусол. 2010; 4:11–9.
4. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Заднова С.П., Краснов Я.М., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Генетическая характеристика клинических штаммов *Vibrio cholerae*, завезенных на территорию Российской Федерации в современный период. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2011; 3:3–10.
5. Шашкова А.В., Горяев А.А., Заднова С.П., Краснов Я.М., Смирнова Н.И., Кутырев В.В. Конструирование ПЦР-тест системы для идентификации токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1, определения их биовара и дифференциации штаммов эльтор на типичные и измененные. Пробл. особо опасных инф. 2011; 4(110):49–52.
6. Bani S., Mastromarino P.N., Ceccarelli D., Le Van A., Salvia A.M., Ngo Viet Q.T. et al. Molecular characterization of ICEVchVie0 and its disappearance in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in 2003 in Vietnam. FEMS Microbiol. Lett. 2007; 266:42–8.
7. Finkelstein R.A., Atthasampunna P., Chulasamaya M., Charunmethee P. Pathogenesis of Experimental Cholera: Biologic Activities of Purified Procholeragen A. J. Immunol. 1966; 96(3):440–9.
8. Grim C.J., Choi J., Chun J., Jeon Y.S., Taviani E., Hasan N.A. et al. Occurrence of the *Vibrio cholerae* seventh pandemic VSP-I island and a new variant. OMICS. 2010; 14(1):1–7.
9. Iwanaga M., Yamamoto K., Higa N., Ichinose Y., Nakasone N., Tanabe M. Culture conditions for stimulating cholera toxin production by *Vibrio cholerae* O1 El Tor. Microbiol. Immunol. 1986; 30(11):1075–83.
10. Maiti D., Das B., Saha A., Nandy R.K., Nair G.B., Bhadra R.K. Genetic organization of pre-CTX and CTX prophages in the genome of an environmental *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strain. Microbiology. 2006; 152(12):3633–41.
11. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New Variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. J. Clin. Microbiol. 2002; 40(9):3296–9.
12. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., Nusrin S., Murphy D., Nicol C. et al. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. J. Clin. Microbiol. 2006; (44):4211–3.
13. Singh D.V., Matte M.H., Matte G.R., Jiang S., Sabeena F., Shukla B.N. et al. Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. Appl. Environ. Microbiol. 2001; 67(2):910–21.
14. Son M.S., Megli C.J., Kovacicova G., Qadri F., Taylor R.K. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. J. Clin. Microbiol. 2011; 49(11):3739–49.
15. Svennerholm A.M., Strömberg G.J., Holmgren J. Purification of *Vibrio cholerae* soluble hemagglutinin and development of enzyme-linked immunosorbent assays for antigen and antibody quantitations. Infect. Immun. 1983; 41(1):237–43.
16. Tan N.H., Tan C.S. Acidimetric assay for phospholipase A using egg yolk suspension as substrate. Anal. Biochem. 1988; 170(2):282–8.

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

1. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. [Molecular Cloning]. M.; 1984. 480 p.
2. [Laboratory Diagnosis of Cholera: Methodological regulations. MR 4.2.2218-07]. M.; 2007.
3. Smirnova N.I., Goryaev A.A., Kutyrev V.V. [Evolution of *Vibrio cholerae* genome during the modern period]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 2010; 4:11–9.
4. Smirnova N.I., Goryaev A.A., Zadnova S.P., Krasnov Ya.M., Lozovsky Yu.V., Kutyrev V.V. [Genetic characterization of *Vibrio cholerae* strains emerging in the Russian Federation during the 7<sup>th</sup> cholera pandemics]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2011; 3:3–10.
5. Shashkova A.V., Goryaev A.A., Zadnova S.P., Krasnov Ya.M., Smirnova N.I., Kutyrev V.V. [Construction of the PCR test-system for the detection of *Vibrio cholerae* O1 toxigenic strain, for identification of their biovar and for differentiation between typical and altered El Tor vibrio strains]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2011; (110):49–52.

## Authors:

Shashkova A.V., Agafonov D.A., Cherkasov A.V., Zadnova S.P., Smirnova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

## Об авторах:

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

Поступила 28.06.12.

**С.В.Генералов, Е.Г.Абрамова, Ж.В.Матвеева, И.М.Жулидов, О.А.Лобовикова, Р.А.Свинцов,  
А.В.Комиссаров, М.Н.Киреев, А.К.Никифоров**

# **КУЛЬТУРАЛЬНЫЙ АНТИГЕН В ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА ИЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЛОШАДИ**

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

Показана возможность применения культурального рабического антигена, полученного на основе фиксированного вируса бешенства штамма Москва 3253, для иммунизации лошадей – продуцентов антирабической сыворотки. Установлено, что к 11-й неделе иммунизации специфические антитела накапливаются в титре не ниже 1:500 (специфическую активность определяли в реакции нейтрализации на белых мышах и в дот-иммуно-анализе), что является достаточным для фракционирования иммунной сыворотки и выделения антирабического иммуноглобулина. Физико-химические и биологические свойства антирабического иммуноглобулина, полученного по технологии с использованием культурального антигена, удовлетворяют требованиям нормативной документации на антирабический иммуноглобулин из сыворотки крови лошади. Уровень специфической активности экспериментальных серий антирабического иммуноглобулина, полученного с применением культуральных технологий, соответствует 242 и 214 МЕ/мл.

*Ключевые слова:* антирабический иммуноглобулин, вирус бешенства, культуральный антиген.

**S.V.Generalov, E.G.Abramova, Zh.V.Matveeva, I.M.Zhulidov, O.A.Lobovikova, R.A.Svintsov, A.V.Komissarov,  
M.N.Kireev, A.K.Nikiforov**

## **Cultural Antigen in the Technology for Anti-Rabies Immunoglobulin Obtainment from Equine Blood Serum**

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

Displayed is the possibility of application of cultural rabies antigen, derived from fixed rabies virus of the strain "Moscow 3253", for immunization of horses – producers of anti-rabies serum. Determined is the fact that specific antibody titers are higher than 1:500 toward the 11<sup>th</sup> week after immunization (specific activity is identified using neutralization reaction on the model of white mice and dot-blot immunoassay). This level of activity is sufficient for the fractioning of immune serum and extraction of anti-rabies immunoglobulin. Physicochemical and biological properties of the anti-rabies immunoglobulin, obtained with the help of cultural antigen technique, meet the requirements stated in the normative documentation on anti-rabies immunoglobulins extracted from equine blood serum. Specific activity level of experimental batches of anti-rabies immunoglobulin, obtained with the help of cultural technologies, corresponds to 242 and 214 IU/ml.

*Key words:* anti-rabies immunoglobulin, rabies virus, cultural antigen.

Бешенство – особо опасное острое инфекционное заболевание человека, а также теплокровных диких и домашних животных природно-очагового характера. Согласно оценке ВОЗ, бешенство входит в группу инфекционных болезней, наносящих наибольший социальный и экономический ущерб, и, вследствие абсолютной летальности, представляет серьезную проблему современного здравоохранения [14]. Для постэкспозиционной профилактики бешенства используют специфический иммуноглобулин совместно с антирабической вакциной.

Многие производители гетерологичного антирабического иммуноглобулина (АИГ), в том числе и РосНИПЧИ «Микроб», для иммунизации продуцентов используют антиген, полученный на основе фиксированного вируса бешенства, репродуцированного в мозговой ткани животных.

В настоящее время ВОЗ рекомендует отказаться от использования органотканевого антигена ввиду

высокой вероятности развития поствакцинальных осложнений, связанных с возможным образованием антител-нейротоксинов в ответ на введение примесей мозговой ткани [5, 14]. В качестве альтернативного варианта предложено использовать вирус бешенства, репродуцированный на клеточных культурах.

Ранее отечественными и зарубежными исследователями показана возможность использования различных штаммов фиксированного вируса бешенства, репродуцированных на клеточных культурах, для получения гетерологичного антирабического иммуноглобулина [6, 9, 11, 13].

Целью настоящего исследования явилась разработка способа получения антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошадей с использованием антигена, полученного на основе штамма фиксированного вируса бешенства Москва 3253, репродуцированного на перевиваемой клеточной линии Vero. Возможность применения данного анти-

гена была рассмотрена ранее, о чем свидетельствует положительный опыт получения АИГ из сыворотки крови кроликов [2].

Используемый штамм фиксированного вируса бешенства Москва 3253 на протяжении многих лет применяют для производства антирабического иммуноглобулина из сыворотки крови лошади. Выбор субстрата для репродукции вируса – клеточной линии Vero – обусловлен ее безопасностью, отсутствием онкогенных свойств, а также преимуществами перевиваемых клеточных линий: высокой потенцией роста клеток, стандартностью биологических свойств, возможностью крупномасштабного культивирования в ферментерах большого объема [4].

### Материалы и методы

Фиксированный вирус бешенства (штамм Москва 3253) выращивали на перевиваемой клеточной линии Vero суспензионным и псевдосуспензионным методами с использованием биореактора BioG-M Plus («BioTron», Корея) вместимостью 5 л. Для культивирования клеток и вируса псевдосуспензионным методом использовали микроносители Cytodex 3 (Sigma). Для культивирования клеток Vero использовали среду Игла MEM с 10 % содержанием сыворотки крупного рогатого скота («Биолот», Россия); вируса бешенства – среду 199 («Биолот», Россия) с содержанием человеческого сывороточного альбумина 0,1 % и антибиотиков (пенициллин 100 ЕД/мл; стрептомицин 0,1 мг/мл). К выращенной в биореакторе биомассе клеток Vero добавляли вируссодержащую жидкость, заражающая доза при этом составила 0,2 ЛД<sub>50</sub> на 1 клетку. Культивирование вируса проводили при температуре 32 °С и pH 7,2 в течение 72 ч, затем вируссодержащую суспензию собирали в стерильную посуду и инактивировали фенолом в конечной концентрации 0,5 % при 37 °С в течение 24 ч согласно действующим методическим указаниям МУ 3.3.1.1099-02 «Безопасность работы с производственными штаммами фиксированного вируса бешенства». Удаление клеточного дебриса осуществляли предварительным осаждением и фильтрацией жидкости через ацетатцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,45 и 0,2 мкм. Вируссодержащую жидкость концентрировали методом тангенциальной ультрафильтрации с помощью фильтрационной установки Vivaflow 200 («Sartorius», Германия), снаряженной полипропиленовой мембраной с номинальной отсечкой по молекулярной массе 300 кДа, с площадью фильтрации 0,2 м<sup>2</sup>.

Полученный концентрат использовали для иммунизации лошадей – продуцентов антирабической сыворотки. В работе использовали лошадей, не бывших под другими видами иммунизации. Схема иммунизации обоснована результатами предыдущих экспериментов [2], а также рекомендациями отечественных и зарубежных исследователей [6, 8, 10, 13]. Иммунизацию лошадей проводили на протяже-

нии 11 недель с интервалом между первой и второй инъекциями 21 день, далее – с интервалом 7 дней. Первые пять инъекций проводили с использованием гидроксида алюминия (3 мг/мл) в качестве адъюванта. Затем использование адъюванта исключали. Введение антигена проводили внутримышечно. Объем иммунизирующей дозы был равен 5 мл с содержанием вируса бешенства 10<sup>8</sup> ГЭ/мл, по данным ПЦР в режиме реального времени. Взятие крови для получения АИГ осуществляли через 10 дней после последней иммунизации.

Фракционирование гамма-глобулиновой фракции осуществляли риванол-спиртовым методом [3]. Осадок иммуноглобулина растворяли в физиологическом растворе до конечной концентрации белка 10,0 %. Остатки этанола удаляли диализом против 0,9 % раствора натрия хлорида. Для получения высокоочищенного раствора иммуноглобулина проводили предварительную фильтрацию через ацетатцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,8 и 0,45 мкм, далее с целью улучшения показателей цветности и прозрачности осуществляли фильтрацию через глубинные фильтры Zeta Plus («CUNO», Франция). Стерилизующую фильтрацию раствора иммуноглобулина проводили с применением ацетатцеллюлозных мембран с диаметром пор 0,22 мкм.

Специфическую активность антирабической сыворотки и иммуноглобулина определяли *in vitro* в дот-иммуноанализе [7] и *in vivo* в реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах [12]. Подсчет титра нейтрализующих антител проводили по методу Reed и Muench [12]. Физико-химические свойства иммуноглобулина исследовали согласно МУК 4.1/4.2588-96 «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям».

Статистический анализ полученных результатов проводили по общепринятым методам [1].

### Результаты и обсуждение

Состояние лошадей в течение всего срока иммунизации было удовлетворительным, антиген при внутримышечном введении не вызывал общих и местных побочных реакций.

Анализ специфической активности полученных антирабических сывороток показал положительную динамику образования антител (рисунок). К концу срока иммунизации титр антител в дот-иммуноанализе составил 1:1000, что явилось достаточным для завершения процесса иммунизации.

Вируснейтрализующая активность иммунных сывороток к 11-й неделе после начала иммунизации была изучена *in vivo* в реакции нейтрализации вируса бешенства на белых мышах. По данным реакции нейтрализации, значения специфической активности иммунных сывороток составили 10 и 14 МЕ/мл (титр антител соответственно 1:554 и 1:692).

Для выяснения зависимости между нарастанием антител и процентным содержанием фракций

Характеристика физико-химических и биологических свойств АИГ из сыворотки лошади, иммунизированной культуральным рабическим антигеном

| Показатель                                              | Образец 01                                                           | Образец 02                                                           | Требования НД<br>PN 002639/01-121011                                                        |
|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| Специфическая активность в реакции нейтрализации, МЕ/мл | 242                                                                  | 214                                                                  | Не менее 150                                                                                |
| Специфическая активность в дот-иммуноанализе            | 1:10000                                                              | 1:10000                                                              | —                                                                                           |
| Токсичность                                             | Нетоксичен                                                           | Нетоксичен                                                           | Нетоксичен                                                                                  |
| Содержание белка, %                                     | 10,0                                                                 | 10,0                                                                 | 10,0±1,0                                                                                    |
| pH                                                      | 7,0                                                                  | 7,1                                                                  | 7,0±0,4                                                                                     |
| Электрофоретическая чистота*                            | γ-глобулин – 91,66;<br>α,β-глобулины – 8,34.<br>Альбумин отсутствует | γ-глобулин – 91,67;<br>α,β-глобулины – 8,33.<br>Альбумин отсутствует | γ-глобулина – не менее 80;<br>α,β-глобулины – не более 20.<br>Альбумин должен отсутствовать |
| Прозрачность                                            | 0,03                                                                 | 0,05                                                                 | Не более 0,05                                                                               |
| Цветность                                               | 0,10                                                                 | 0,13                                                                 | Не более 0,15                                                                               |

\* Содержание α-, β-, γ-глобулинов указано в процентах.

белка в сыворотках, последние были исследованы методом электрофореза на ацетатных пленках. Электрофоретические исследования показали, что иммунологические сдвиги происходили с нарастанием гамма-глобулиновой фракции (рисунок). При исследовании образцов лошадиной сыворотки к концу иммунизации имело место увеличение содержания гамма-глобулинов на 25 % относительно исходного их содержания.

Выделенный из антирабической сыворотки специфический иммуноглобулин был изучен по основным биологическим и физико-химическим параметрам (таблица). Согласно требованиям нормативной документации PN 002639/01-121011, специфическая активность АИГ из лошадиной сыворотки должна быть не менее 150 МЕ/мл в реакции нейтрализации вируса бешенства в количестве от 100 до 1000 ЛД<sub>50</sub>/0,03 мл. Уровень специфической активности образцов АИГ, полученных из экспериментальных образцов сыворотки крови лошади, составил 242 и 214 МЕ/мл (при титре антител соответственно 1:11987 и 1:11888).

Экспериментальный АИГ успешно прошел ис-

пытания на токсичность, не оказывал повреждающего действия на организм экспериментальных животных: белых мышей и морских свинок.

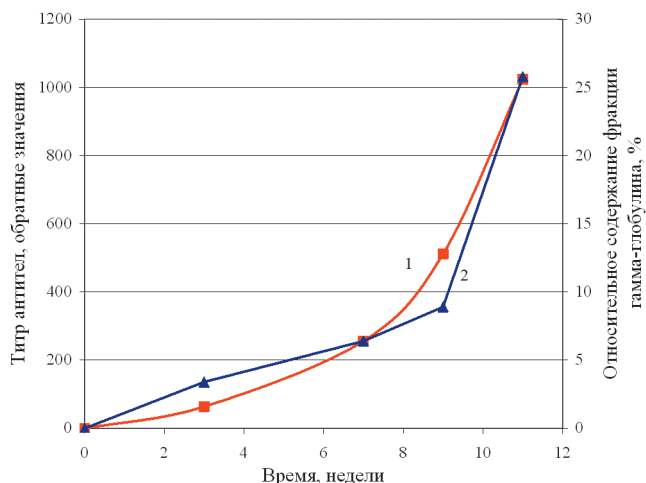
Физико-химические показатели (содержание белка, pH, электрофоретическая чистота, прозрачность, цветность) также соответствовали требованиям нормативной документации, предъявляемым к коммерческому препарату гетерологичного АИГ.

Таким образом, в результате проведенных экспериментов получены образцы АИГ из сыворотки лошадей, иммунизированных культуральным рабическим антигеном. Физико-химические свойства и уровень специфической активности исследуемых образцов удовлетворяют требованиям НД PN 002639/01-121011 на АИГ из сыворотки крови лошади жидкий. Результаты проведенных исследований доказывают возможность использования культурального рабического антигена в производстве антирабического иммуноглобулина. Применение культурального антигена в производстве гетерологичного АИГ позволит уменьшить вероятность развития побочных реакций у пациента, а также упростить рутинную процедуру иммунизации за счет значительного уменьшения объема вводимой дозы и сокращения общего количества инъекций.

Работа выполнена по государственному контракту № 54-Д от 04.06.2012 в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 годы)».

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: 1962. 180 с.
2. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Лобовикова О.А., Савицкая Л.В. и др. Получение кроличьего антирабического иммуноглобулина с применением культурального антигена. Пробл. особо опасных инф. 2012; 2(112):78–81.
3. Карпов С.Н., Прегер С.М., Синельников Г.Е., Федорова Ю.В. Гипериммунные сыворотки. Томск; 1976. 380 с.
4. Подчерняева Р.Я., Хижнянова Т.М., Михайлова Г.Р. Линия клеток Vero (B) для приготовления медико-биологических препаратов. Вopr. вирусол. 1996; 4:183–5.
5. Селимов М.А. Бешенство. М.: Медицина; 1978. 336 с.
6. Ситник Н.П., Загидуллин Н.В., Исрафилов А.Г., Еникеева Л.Ф., Мухачева А.В., Шафеева Р.С. и др. Способ получения высокоспецифичной гетерологичной антирабической сыворотки.



Динамика изменения специфической активности (1) и количества гамма-глобулиновой фракции (2) в антирабической сыворотке лошади в процессе иммунизации

Патент 2322503 РФ, опубл. 20.04.2008 г. Бюл. № 11.

7. Шарпова Н.А., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Киреев М.Н., Савицкая Л.В., Минаева Л.Н. и др. Определение активности антирабических сывороток и препарата гетерологичного антирабического иммуноглобулина *in vitro* в дот-иммуноанализе. Пробл. особо опасных инф. 2010; 1(103):63–6.

8. Consales C.A., Valentini E.J.G., Albas A., Mendonca R., Fuchs R., Soares M.A. et al. The preparation of cultured rabies virus and the production of antiserum for human use. J. Biol. Stand. 1988; 16:27–32.

9. Goel S.K., Sharma S., Singh U. Antibody response to purified chick embryo cell vaccine in equines for production of equine rabies immune globulin. Biologicals. 2003; 31:233–236.

10. Lepine P., Atanasiu P. Производство лечебной антирабической сыворотки на животных. В кн.: Методы лабораторных исследований по бешенству. Женева: ВОЗ; 1975:295–300. [Production of therapeutic anti-rabies serum in animals. In: Laboratory Techniques in Rabies. Geneva: WHO; 1975:295–300].

11. Luekrajjan T., Wangsai J., Phanuphak P. Production of anti-rabies serum of equine origin. In: Laboratory techniques in rabies. Geneva: WHO; 1996. P. 401–4.

12. Meslin F.-X., Kaplan M.M., Koprowsky H., editors. Laboratory techniques in rabies. Geneva: WHO; 1996. 469 p.

13. Ozkan O., Aylan O., Ates C., Celebi B. Production of heterolog anti-rabies immune sera. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi. 2004. 15:49–54.

14. WHO Expert Consultation on Rabies: first report. WHO technical report series 931. Geneva: WHO; 2004. 121 p.

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

1. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Investigations]. L.; 1962. 180 p.

2. Generalov S.V., Abramova E.G., Matveeva Zh.V., Zhulidov I.M., Lobovikova O.A., Savitskaya L.V. et al. [Production of rabbit anti-rabies immunoglobulin using cultural antigen]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2012; 112:78–81.

3. Karpov S.N., Preger S.M., Sinel'nikov G.E., Fedorova Yu.V. [Hyperimmune sera]. Tomsk; 1976. 380 p.

4. Podchernyaeva R.Ya., Khizhnyanova T.M., Mikhailova G.R. [Vero cell line (B) for the production of medico-biological preparations]. Vopr. Virusol. 1996; 4:183–5.

5. Selimov M.A. [Rabies]. M.: Meditsina; 1978. 336 p.

6. Sitnik N.P., Zagidullin N.V., Israfilov A.G., Enikeeva L.F., Mukhacheva A.V., Shafeeva R.S. et al. [Method of Obtainment of Highly Specific Heterologous Anti-Rabies Serum]. RF Patent 2322503.

7. Sharпова Н.А., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Киреев М.Н., Савицкая Л.В., Минаева Л.Н., Михеева Т.А., Галкина М.В., Краснов Я.М. et al. [Determination of the activity of the anti-rabies sera and heterologous anti-rabies immunoglobulin *in vitro* in the dot-immunoassay]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; 103:63–6.

## Authors:

Generalov S.V., Abramova E.G., Matveeva Zh.V., Zhulidov I.M., Lobovikova O.A., Svintsov R.A., Komissarov A.V., Kireev M.N., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

## Об авторах:

Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Лобовикова О.А., Свинцов Р.А., Комиссаров А.В., Киреев М.Н., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 01.11.12.

В.Д.Кругликов

**РАЗРАБОТКА КРИТЕРИЕВ ОТБОРА ПРОБИОТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ  
ДЛЯ РАСШИРЕНИЯ СПЕКТРА ДОСТУПНЫХ ПРОТИВОХОЛЕРНЫХ СРЕДСТВ**

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

Изучена противохолерная активность 40 штаммов различных видов пробиотических бактерий по основным качественным показателям, которые определяли на основе количественных данных. Установлены критерии отбора пробиотических бактерий для использования при холере: антагонистическая активность по отношению к *V. cholerae* – высокая или средняя, адгезивность – только средняя, кислотообразующая активность – только высокая. На экспериментальной модели холеры доказана профилактическая и лечебная эффективность 5 отобранных штаммов лактобацилл и 1 штамма бифидобактерий. Подчеркнута перспективность применения пробиотиков в качестве дополнительных препаратов выбора при холерной инфекции.

**Ключевые слова:** пробиотические бактерии, холерные вибрионы, антагонизм, адгезивность, кислотообразование, экспериментальная модель холеры.

V.D.Kruglikov

**Development of Criteria for Probiotic Bacteria Selection for Broadening the Spectrum  
of Available Anti-Cholera Drugs**

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

Studied is the anti-cholera activity of 40 strains from different species of probiotic bacteria according to the main qualitative characteristics, which are determined on the basis of quantitative data. Established are the selection criteria for probiotic bacteria to be used for cholera treatment: antagonistic activity against *V. cholerae* – high or moderate, adhesion – only moderate, acid forming activity – high or moderate. The preventive and medical efficiency of 5 selected strains of lactobacilli and 1 strain of bifidobacterium is demonstrated on the experimental model of cholera. Underlined is the prospective use of probiotics as additional preparations of choice against cholera infection.

**Key words:** probiotic bacteria, *V. cholerae*, antagonism, adhesion, acid forming, experimental model of cholera.

Антибиотикорезистентность возбудителя холеры, отсутствие эффективной вакцинопрофилактики, возможность формирования вибрионосительства и негативные последствия перенесенной инфекции обуславливают необходимость совершенствования подходов к профилактике и лечению этого заболевания, ориентированных на разработку препаратов, альтернативных антибиотикам: бактериофагов, бактериоцинов, пептидов животного и растительного происхождения, веществ, блокирующих активность поверхностных структур бактерий и др. [1, 3, 4]. Для решения этой проблемы могут быть рассмотрены возможности расширения спектра противохолерных средств за счет дополнительного использования недорогих, неантибиотических, потенциально терапевтических и профилактических средств – пробиотиков (лечебно-диетических продуктов и биотерапевтических препаратов) [7, 10]. Перспектива использования того или иного пробиотика и при холерной инфекции диктует необходимость определения критериев отбора пробиотических штаммов для обеспечения противохолерного действия препарата. При этом комплекс биотехнологических свойств пробиотиков определяется не только видом бактерий, но зависит от конкретного штамма [9]. В настоящее время отсутствуют критерии противохолерной активности пробиотических бактерий с учетом биологии возбудителя холеры и особенностей патогенеза этой инфекции.

Цель исследования – тестирование *in vitro* штам-

мов пробиотических бактерий, составляющих основу коммерческих пробиотиков и штаммов, являющихся перспективными в качестве производственных, по основным параметрам биологической активности с определением критериев соответствия противохолерной эффективности и с подтверждением данных на экспериментальной модели холеры.

**Материалы и методы**

В работе использовали 40 штаммов пробиотических бактерий, относящихся к родам *Lactobacillus* (25), *Bifidobacterium* (8), *Bacillus* (3), *Escherichia* (2), *Enterococcus* (1) и *Saccharomyces* (1), полученных из Всероссийской коллекции микроорганизмов; 40 музейных и свежeweделенных штаммов холерных вибрионов различных биоваров и серогрупп, в том числе токсигенных. Для экспериментального моделирования холеры применяли штамм *V. cholerae* eltor 5879. Штаммы холерных вибрионов были предоставлены музеем живых культур РостНИПЧИ.

Изучение пробиотических штаммов по основным биотехнологическим параметрам (антагонизм, адгезивность и кислотообразующая активность) проводили в соответствии с МУК 4.2.2602-10 с адаптацией методик специфике исследований. Так, при выявлении антагонистической активности пробиотических бактерий по отношению к холерным вибрионам методом отсроченного антагонизма использовали ав-

торскую плотную питательную среду на основе автолизата селезенки крупного рогатого скота. Это обеспечивало получение сравнимых результатов оценки выраженности антагонизма пробиотиков (различной родовой принадлежности) к холерным вибрионам, что не представлялось возможным при использовании плотной питательной среды МРС-5 (рН  $7,4 \pm 0,1$ ), рекомендованной для изучения антагонизма пробиотиков [8], так как на этой среде штаммы *V. cholerae* не росли. Учет результатов антагонистической активности производили с использованием авторской качественной шкалы оценки на основе количественных показателей: низкая степень антагонизма – зона ингибирования  $\leq 6,0$ – $15,0$  мм; средняя –  $15,1$ – $29,0$  мм и высокая –  $\geq 29,1$  мм [6].

Адгезивность оценивали только по одному из рекомендуемых показателей – по среднему показателю адгезивности (СПА) к эпителиальным клеткам кишечника белых мышей с применением соответствующей шкалы оценки (число микробов на 1 эпителиальную клетку): слабая адгезивность СПА = 1–5, средняя – СПА = 5–10, высокая – СПА выше 10. Кислотообразующую активность лактобацилл и бифидобактерий определяли в градусах Тернера ( $^{\circ}\text{T}$ ) объемным методом нейтрализации кислоты в присутствии индикатора и оценивали по авторской шкале:  $\leq 99,9$   $^{\circ}\text{T}$  – слабая,  $100,0$ – $149,9$   $^{\circ}\text{T}$  – средняя,  $\geq 150,0$   $^{\circ}\text{T}$  – сильная [6].

Оценку результатов тестирования *in vitro* штаммов пробиотических бактерий по основным параметрам биологической активности проводили по сочетанию качественных показателей, которые определяли на основе количественных данных.

Профилактическую и лечебную эффективность отобранных штаммов изучали по известным методикам на модели кроликов-сосунков [2]. В обоих случаях использовали 2-суточные культуры пробиотиков на обезжиренном молоке, которые вводили внутривентрикулярно (в/ж) в дозе 1,0 мл, концентрации  $(3,0 \pm 0,3) \cdot 10^7$  м.к./мл. Заражение производили штаммом *V. cholerae* eltor 5879 в/ж в дозе 1,0 мл (18 ч агаровой культурой в 3 % растворе соды), в концентрации  $(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^8$  м.к./мл. При изучении профилактического действия пробиотических бактерий их культуры вводили перед заражением в течение 7 сут, 1 раз в день, а заражали на 8-е сутки (рис. 1). При оценке лечебного действия пробиотических бактерий их культуры вводили троекратно – через 6, 12 и 24 ч после заражения (рис. 2). Контроль – стерильное обезжиренное молоко в той же дозе, кратности и режиме введения.

## Результаты и обсуждение

Антагонистическая активность пробиотических бактерий и степень ее выраженности по отношению к штаммам холерных вибрионов различного происхождения являлась одним из основных биотехнологических параметров, определяющим целесообразность и объем последующих исследований. В результате проведенного скрининга культур пробиотических бактерий по степени выраженности антагонистиче-



Рис. 1. Профилактическое действие пробиотических бактерий на модели кроликов-сосунков:

ской активности было установлено, что все взятые в исследование культуры пробиотиков, кроме дрожжей *Saccharomyces boulardii*, обладали антагонизмом по отношению к *V. cholerae*. Однако степень интенсивности антагонистического действия существенно различалась. Антагонистическая активность культур рода *Escherichia*, *Enterococcus* и *Bacillus* была оценена как низкая, поэтому указанные микроорганизмы не вошли в число пробиотических бактерий, перспективных для дальнейшего изучения возможности их использования при холере. Как показано в таблице, высоко- и среднеактивные антагонисты холерных вибрионов преимущественно относились к роду *Lactobacillus* и виду *L. acidophilus*, а из представителей рода *Bifidobacterium* – только к виду *B. bifidum*. Только штаммы *L. acidophilus* BKM В 2020 Д, *L. acidophilus* 126, *L. acidophilus* NK5, *L. plantarum* 8 RA-3 и *B. bifidum* № 1 проявили высокую и среднюю степень антагонистической активности ко всем серогруппам холерных вибрионов. Среди остальных штаммов лактобацилл и бифидобактерий отмечалась низкая активность к тем или иным биоварам и серогруппам вибрионов. Наиболее чувствительными к исследуемым пробиотическим культурам оказались штаммы холерных вибрионов O1 серогруппы классического биовара, наименее – холерные вибрионы O139 серогруппы, а штаммы *V. cholerae* O1 eltor и *V. cholerae* non O1/O139



Рис. 2. Лечебное действие пробиотических бактерий на модели кроликов-сосунков:

Результаты тестирования пробиотических бактерий по параметрам антагонистической активности по отношению к холерным вибрионам различных биоваров и серогрупп, адгезивности и активности кислотообразования\*

| Штамм                                         | Зона угнетения роста холерных вибрионов, мм |                          |                         |                                   | Адгезивность<br>СПА ЭКК** | Активность<br>кислотообразо-<br>вания, °Т |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------|
|                                               | <i>V. cholerae</i> classica                 | <i>V. cholerae</i> eltor | <i>V. cholerae</i> O139 | <i>V. cholerae</i><br>non O1/O139 |                           |                                           |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> BKM B 2020 Д | 31,1±0,9                                    | 29,3±1,4                 | 18,8±1,0                | 28,7±1,3                          | 5,7±0,3                   | 219,8±0,2                                 |
| <i>L. acidophilus</i> 12 6                    | 25,7±1,7                                    | 26,2±1,3                 | 18,0±0,8                | 24,9±1,3                          | 5,3±0,2                   | 180,0±0,0                                 |
| <i>L. acidophilus</i> K3Ш24                   | 20,9±0,8                                    | 19,9±1,5                 | 9,7±0,2                 | 16,6±0,9                          | 10,0±0,0                  | 175,2±0,1                                 |
| <i>L. acidophilus</i> NK5                     | 25,1±1,7                                    | 24,6±0,8                 | 18,9±0,3                | 24,6±0,7                          | 5,5±0,3                   | 150,6±0,1                                 |
| <i>L. acidophilus</i> NK12                    | 18,9±0,3                                    | 20,1±1,8                 | 11,4±0,3                | 17,3±1,0                          | 4,7±0,2                   | 130,2±0,1                                 |
| <i>L. acidophilus</i> NK1                     | 23,1±2,2                                    | 19,9±1,9                 | 10,3±0,2                | 18,0±1,0                          | 5,3±0,2                   | 105,5±0,0                                 |
| <i>L. acidophilus</i> NK2                     | 22,7±2,1                                    | 18,6±0,4                 | 10,2±0,1                | 15,8±1,4                          | 5,7±0,2                   | 94,8±0,1                                  |
| <i>L. acidophilus</i> BKM –D 1660             | 19,9±1,5                                    | 12,1±1,1                 | 10,3±0,2                | 16,1±1,1                          | 10,7±0,1                  | 151,4±0,8                                 |
| <i>L. acidophilus</i> Ep 317/402              | 23,9±1,8                                    | 19,0±1,2                 | 13,5±0,2                | 15,7±1,0                          | 6,7±0,2                   | 120,0±0,1                                 |
| <i>L. acidophilus</i> NCIB 4504               | 18,4±0,7                                    | 17,0±1,8                 | 10,6±0,4                | 17,0±0,6                          | 5,0±0,0                   | 130,3±0,0                                 |
| <i>L. acidophilus</i> 100 H                   | 19,8±0,4                                    | 17,8±1,6                 | 9,8±0,2                 | 16,7±0,6                          | 10,3±0,2                  | 143,0±0,1                                 |
| <i>L. acidophilus</i> La-14                   | 20,9±0,4                                    | 13,8±1,7                 | 11,5±0,2                | 7,8±0,2                           | 5,7±0,2                   | 150,6±0,1                                 |
| <i>L. delbrueckii</i> NCDO 213                | 20,5±1,8                                    | 15,5±1,7                 | 7,5±0,1                 | 12,2±1,0                          | 1,3±0,2                   | 120,0±0,1                                 |
| <i>L. plantarum</i> ATCC 10241                | 20,4±0,6                                    | 13,6±1,0                 | 12,1±0,1                | 16,1±0,9                          | 6,0±0,3                   | 90,2±0,1                                  |
| <i>L. plantarum</i> 8 RA-3                    | 25,3±0,7                                    | 23,9±1,7                 | 15,6±0,9                | 25,4±1,8                          | 6,0±0,3                   | 120,0±0,1                                 |
| <i>L. johnsonii</i> La1/Lj                    | 12,9±1,3                                    | 10,7±1,1                 | 8,6±0,2                 | 12,4±1,1                          | 2,3±0,2                   | 94,8±0,1                                  |
| <i>L. casei</i> Lc-11                         | 23,4±0,5                                    | 10,7±0,1                 | 9,8±0,3                 | 7,7±0,2                           | 1,0±0,0                   | 89,7±0,1                                  |
| <i>L. buchneri</i> 1310                       | 22,3±0,9                                    | 9,7±0,1                  | 8,6±0,2                 | 8,5±0,2                           | 1,7±0,2                   | 120,0±0,0                                 |
| <i>L. helveticus</i> ATCC 150                 | 23,2±0,7                                    | 8,7±0,1                  | 7,5±0,1                 | 8,2±0,2                           | 5,0±0,0                   | 95,2±0,1                                  |
| <i>L. rhamnosus</i> GG                        | 19,8±0,4                                    | 8,7±0,1                  | 12,7±0,2                | 11,5±0,2                          | 8,0±0,2                   | 130,3±0,1                                 |
| <i>L. fermentum</i>                           | 16,5±0,4                                    | 8,3±0,1                  | 7,7±0,2                 | 8,0±0,4                           | 4,7±0,3                   | 115,0±0,3                                 |
| <i>L. lactis</i> ATSS 8000                    | 15,7±0,3                                    | 8,6±0,3                  | 8,7±0,3                 | 8,6±0,3                           | 1,3±0,2                   | 100,0±0,3                                 |
| <i>L. zeae</i> B-57                           | 11,0±0,4                                    | 10,3±0,2                 | 8,7±0,5                 | 8,5±0,4                           | 1,0±0,3                   | 80,0±0,0                                  |
| <i>L. reuteri</i> SD 2112/MM2                 | 14,3±0,5                                    | 17,8±1,9                 | 8,6±0,3                 | 8,6±0,3                           | 2,0±0,0                   | 105,5±0,0                                 |
| <i>L. bulgaricus</i> LB-51                    | 12,6±0,4                                    | 13,2±1,0                 | 9,8±0,2                 | 9,1±0,3                           | 3,7±0,2                   | 99,5±0,1                                  |
| <i>Bifidobacterium bifidum</i> ЛБА-3          | 10,3±0,3                                    | 9,0±0,6                  | 10,9±0,4                | 10,1±0,2                          | 5,7±0,2                   | 90,2±0,1                                  |
| <i>B. bifidum</i> № 1                         | 24,7±1,3                                    | 20,2±1,9                 | 15,7±1,0                | 20,6±1,3                          | 7,7±0,2                   | 100,3±0,1                                 |
| <i>B. bifidum</i> 791                         | 10,7±1,1                                    | 6,8±0,2                  | 14,2±0,7                | 12,2±0,5                          | 10,0±0                    | 78,8±0,2                                  |
| <i>B. breve</i> 79119                         | 9,8±0,8                                     | 7,3±0,1                  | 9,2±0,3                 | 9,1±0,2                           | 0,3±0,2 ***               | 55,0±0,0                                  |
| <i>B. lactis</i> BI-04                        | 13,8±1,1                                    | 9,8±0,3                  | 5,3±0,2                 | 5,6±0,2                           | 1,7±0,2                   | 50,0±0,0                                  |
| <i>B. adolescentis</i> B-1 94-БИМ             | 10,1±0,5                                    | 9,8±0,9                  | 6,8±0,2                 | 6,7±0,2                           | 4,0±0,0                   | 80,5±0,1                                  |
| <i>B. longum</i> B 379M                       | 13,3±0,1                                    | 9,2±0,3                  | 5,4±0,1                 | 5,7±0,2                           | 2,7±0,2                   | 45,7±0,1                                  |
| <i>B. longum</i> ATCC 15707                   | 11,1±0,1                                    | 7,4±0,1                  | 7,4±0,2                 | 7,2±0,1                           | 3,3±0,2                   | 60,4±0,1                                  |
| <i>B. infantis</i> Г 73-15                    | 10,6±0,2                                    | 5,4±0,1                  | 9,8±0,9                 | 10,0±0,5                          | 3,7±0,3                   | 70,3±0,1                                  |

\* Приведены средние значения по результатам трех опытов; количественные показатели, соответствующие средней и высокой степени выраженности активности того, или иного параметра выделены **жирным шрифтом**, а соответствующие низкой – обычным шрифтом.

\*\* Средний показатель адгезивности к эпителиальным клеткам кишечника белых мышей (число микробов на 1 эпителиальную клетку).

\*\*\* Недостоверный результат ( $p > 0,05$ ).

серогрупп занимали промежуточное положение.

Адгезивность пробиотических бактерий рассматривалась нами как с точки зрения ее биологического значения в механизмах, обеспечивающих приживание микроорганизмов и формирование нормальной микрофлоры организма, так и участия в предотвращении начальных этапов развития инфекционного процесса, что особенно актуально в контексте патогенеза холеры. При изучении адгезивности 34 штаммов-пробиотиков (таблица), отобранных с учетом результатов изучения по предыдущему параметру, было установлено, что высокоадгезивными были штаммы *L. acidophilus* 100 H и *L. acidophilus* BKM –D 1660. К среднеадгезивным относились: *L. acidophilus* – BKM B 2020 Д, 126, K3Ш24, NK5, NK1, NK2, La-14, Ep 317/402; *L. plantarum* – 8 RA-3 и ATCC 10241, *L. helveticus* ATCC 150, *L. rhamnosus* GG, а также *B. bifidum* – ЛБА-3, 791 и № 1. Остальные испытываемые штаммы являлись низкоад-

гезивными. Интерпретация полученных результатов носила некоторый полемический характер, когда, на первый взгляд, желательные характеристики потенциального пробиотика могут служить в организме человека фактором патогенности. Так, рассматривая адгезивные свойства пробиотических бактерий как один из критериев выбора препарата в лечебно-профилактической практике, некоторые исследователи считают, что благоприятная колонизация кишечника задаваемыми пробиотическими штаммами возможна только в том случае, когда они обладают высокой адгезией к эпителиоцитам хозяина [5, 8]. Однако, учитывая сложный характер взаимоотношений микрофлоры человека, нельзя не принимать во внимание тезис о потенциальной патогенности (в определенных клинических ситуациях) любого компонента пристеночной микрофлоры [10, 11]. В этой связи в трактовке результатов изучения адгезивности пробиотических бактерий мы исходили из требова-

ний МУК 4.2.2602-10: штаммы с высокой и низкой адгезивной активностью не следует рекомендовать для производственного использования [8].

Пробиотические бактерии продуцируют различные кислоты, изменяющие pH среды их пребывания как *in vitro* – субстратов и питательных сред, так *in vivo* – в кишечнике [10]. Изучение штаммов пробиотических бактерий по показателю кислотообразующей активности имело существенное значение для отбора критериев селекции пробиотиков по комплексу признаков в связи с известным фактом кислотоустойчивости *V. cholerae*. Как видно из приведенной таблицы, активность кислотообразования *in vitro*, равная или превышающая 100,0 °Т, определялась у 19 штаммов (55,9 %). Из них 18 относились к роду *Lactobacillus* и один штамм – к роду *Bifidobacterium*. Отобранные в предшествующих исследованиях штаммы лактобацилл вошли в категорию сильных кислотообразователей (*L. acidophilus* ВКМ В 2020 Д, 12 б, НК5), а штаммы *L. plantarum* 8 RA-3 и *B. bifidum* № 1 – средних. Остальные бифидобактерии проявили слабую активность.

Полученные данные стали основой для проведения исследований, подтверждающих противохолеpnую активность, на экспериментальной модели холеры.

Всего исследовано 10 отобранных штаммов, в состав которых не вошли высокоадгезивные, слабые антагонисты, а также штаммы, обладающие низкой адгезивной и кислотообразующей активностью. Профилактическое действие 5 штаммов пробиотиков выражалось в защите лабораторных животных на 70–100 % (рис. 1), а лечебное – на 20–50 % (рис. 2). Не вошедшие в иллюстрацию данные по штаммам *L. acidophilus* (КЗШ24 и Ер 317/402) были на 2–3 порядка ниже, а изучение *in vivo* штаммов *L. acidophilus* (НК1, НК12 и NCIB 4504) дало отрицательные результаты.

Таким образом, установлено, что пробиотические бактерии, перспективные для использования при холере, должны соответствовать следующим критериям: антагонистическая активность по отношению к холерным вибрионам – высокая или средняя, адгезивность – только средняя, кислотообразующая активность – высокая или средняя. По разработанным критериям отобраны штаммы *L. acidophilus* ВКМ В 2020Д, *L. acidophilus* 12б, *L. acidophilus* НК5, *L. plantarum* 8 RA-3 и *B. bifidum* № 1. На экспериментальной модели холеры доказана их профилактическая и лечебная эффективность. Показано преимущество противохолеpnого действия лактобацилл и бифидобактерий по сравнению с другими пробиотическими бактериями. Определено, что штаммы *V. cholerae* классика наиболее чувствительны к действию штаммов-пробиотиков, а штаммы, принадлежащие к *V. cholerae* O139 серогруппы, – наименее. Следовательно, отбор штаммов пробиотических бактерий по разработанным критериям будет способствовать расширению спектра противохолеpnых средств за счет дополнительных препаратов выбора, а именно: существующих коммерческих пробиотиков и создаваемых на их основе новых препаратов и диетических продуктов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андрусенко И.Т., Подосинникова Л.С., Бардых И.Д. Поиск новых методов лечения холеры. Эпидемиол. и инф. бол. 2007; 5:49–52.
2. Бардых И.Д., Кругликов В.Д., Мазрухо Б.Л., Рыжко И.В., Москвитина Э.А., Цураева Р.И. и др. Экспериментальная оценка эффективности использования лактобацилл для профилактики и лечения холеры. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2001; 2:68–71.
3. Гаевская Н.Е., Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Качкина Г.В., Алиева А.А., Саямов С.Р. Отбор бактериофагов для лечения экспериментальной холеры, вызванной классическими вибрионами. Совр. наукоемкие техн. 2004; 3:11–15.
4. Дудина Н.А. Множественная лекарственная устойчивость штаммов холерного вибриона eltor, выделенных от людей в России в 2005 г. Клин. микробиол. и антимикробиол. химиотерапия. 2006; 8(2):16–17.
5. Кравцов Э.Г., Ермолаев А.В., Анохина И.В., Яшина Н.В., Чеснокова В.Л., Долин М.В. Адгезивные свойства лактобактерий как один из критериев выбора пробиотика. Бюл. эксп. биол. и медицины. 2008; 145(2):192–5.
6. Кругликов В.Д., Рыжко И.В., Цураева Р.И., Дроботковская Н.В., Пушкарёва Н.Д., Бардых И.Д. Изучение влияния приобретенной устойчивости к рифампицину на стабильность биологических свойств штамма *Lactobacillus acidophilus* ВКМ В – 2020 Д. Биотехнология. 1996; 7:32–5.
7. Маевская М.В. Возможности применения пробиотиков в гастроэнтерологии. Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. 2009; 19(6):65–72.
8. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков. Методические указания МУК 4.2.2602-10. 4.2. М.; 2010.
9. Шевелева М.А., Раменская Г.В. Современные представления о применении различных групп пробиотических средств при антибиотикотерапии. Антибиот. и химиотерапия. 2009; 54(3–4):61–8.
10. Янковский Д.С., Дымент Г.С. Бифидобактерии и лактобациллы как оптимальная основа современных пробиотиков. Совр. педиатрия. 2006; 10(3):1–10.
11. Boirivant M, Strober W. The mechanism of action of probiotics. Curr. Opin. Gastroenterol. 2007; 23(6):679–92.

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

1. Andrusenko I.T., Podosinnikova L.S., Bardykh I.D. [Search for new methods of cholera treatment]. Epidemiol. Infek. Bol. 2007; 5:49–52.
2. Bardykh I.D., Kruglikov V.D., Mazrukho B.L., Ryzhko I.V., Moskvitina E.A., Tsuraeva R.I. et al. [Experimental evaluation of efficacy of Lactobacilli in prophylaxis and treatment of cholera]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2001; 2:68–71.
3. Gaevskaya N.E., Kudryakova T.A., Makedonova L.D., Kachkina G.V., Aliyeva A.A., Sayamov S.R. [Selection of bacteriophages for treatment of experimental cholera, caused by classical cholera vibrios]. Sovrem. Naukoemkie Tekhnol. 2004; 3:11–5.
4. Dudina N.A. [Multidrug resistance of strains of *Vibrio cholerae* El Tor, isolated from people in Russia in 2005]. Klin. Mikrobiol. Antimikrob. Khimioter. 2006; 8(2):16–7.
5. Kravtsov E.G., Ermolaev A.V., Anokhina I.V., Yashina N.V., Chesnokova V.L., Dolin M.V. [Adhesion characteristics of lactobacilli is a criterion of the probiotic choice]. Byul. Eks. Biol. Med. 2008; 145(2):192–5.
6. Kruglikov V.D., Ryzhko I.V., Tsuraeva R.I., Drobotkovskaya N.V., Pushkareva N.D., Bardykh I.D. [Examination of influence of acquired resistance to rifampicin on stability of biological properties of *Lactobacillus acidophilus* ВКМ В–2020 D strain]. Biotechnologia. 1996; 7:32–5.
7. Mayevskaya M.V. [Application of probiotics in gastroenterology]. Ros. Zh. Gastroenterol. Hepatol. Koloproktol. 2009; 19(6):65–72.
8. [Control methods. Biological and microbiological factors. Pre-registration system for pre-clinical drug safety studies. Selection, control and storage of industrial strains, used in probiotics production. MR 4.2.2602-10. 4.2]. M.; 2010.
9. Sheveleva M.A., Ramenskaya G.V. [Modern concept of the use of various groups of probiotics in antibiotic therapy]. Antibiotik. Chimioter. 2009; 54(3–4):61–8.
10. Yankovsky D.S., Dyment G.S. [Bifidobacteria and lactobacilli as the optimal basis for modern probiotics]. Sovr. Peditriya. 2006; 10(3):1–10.

## Authors:

Kruglikov V.D. 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:

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

Поступила 14.03.12.

В.В.Фирстова, В.М.Павлов, Т.Б.Кравченко, Е.В.Зырина, А.И.Борзилов, И.А.Дятлов

**ИЗМЕНЕНИЕ ЭФФЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ Т-ЛИМФОЦИТОВ МЫШЕЙ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ПРОТИВ ТУЛЯРЕМИИ, ПРИ СТИМУЛЯЦИИ *IN VITRO* ТУЛЯРИНОМ**

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

Показано, что тулярин содержит антигены, которые специфически взаимодействуют с антителами сывороток мышей, вакцинированных *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ. Кроме того, показано, что тулярин в реакциях *in vitro* специфически усиливает экспрессию рецептора CD69 на поверхности CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> субпопуляций Т-лимфоцитов, а также специфически усиливает синтез цитокинов ИФН-γ и ФНО-α Т-хелперами (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> лимфоцитами), выделенных от мышей, иммунизированных против туляремии. Предлагается использовать тулярин в серологических исследованиях и реакциях *in vitro* для выявления постинфекционного или поствакцинального иммунитета к туляремии.

**Ключевые слова:** туляремия, поствакцинальный иммунитет, CD69, ИФН-γ, ФНО-α.

V.V.Firstova, V.M.Pavlov, T.B.Kravchenko, E.V.Zyrina, A.I.Borzirov, I.A.Dyatlov

**Alteration of Effector Activity of T-Lymphocytes in Mice Immunized against Tularemia, Using *in vitro* Stimulation by Tularin**

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

It has been shown that tularin contains antigens that specifically interact with antibodies of sera of mice vaccinated with *F. tularensis* 15 NIEG (15<sup>th</sup> line of production, Research Institute of Epidemiology and Hygiene). Besides, it has been established that tularin specifically intensifies expression of CD69 receptor on the surface of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> subpopulations of T-lymphocytes, and specifically enhances synthesis of IFN-γ and FNO-α cytokines by means of T-helpers (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> lymphocytes) isolated from mice, immunized against tularemia. Put forward is the proposition to use tularin in serological surveys and reactions *in vitro* for identification of postinfectious or postvaccinal immunity to tularemia.

**Key words:** tularemia, postvaccinal immunity, CD69, IFN-γ, FNO-α.

Туляремия является зоонозной инфекцией, вызываемой бактериями *Francisella tularensis*. Для профилактики туляремии в России используется живая тулярийная вакцина 15 НИИЭГ. Иммунизация данной вакциной приводит к формированию у людей длительного протективного иммунитета, аналогичного постинфекционному. В формировании постинфекционного и поствакцинального противотулярийного иммунитета ключевую роль играют Т-лимфоциты, включая CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки, формирующие в конечном итоге пул Т-клеток памяти. Т-лимфоциты памяти при повторном взаимодействии с антигенами возбудителя туляремии начинают активно пролиферировать, преобразовываясь в эффекторные клетки, активно продуцирующие такие цитокины, как ИФН-γ и ФНО-α [7]. ИФН-γ и ФНО-α, в свою очередь, подавляют способность бактерий *F. tularensis* выживать и размножаться в макрофагах [4, 6]. Таким образом, Т-клетки памяти являются ключевым элементом иммунной защиты организма от повторного заражения тулярией.

Проявление эффекторной активности клетками памяти в ответ на повторный контакт с антигенами возбудителя инфекции свидетельствует о наличии специфического иммунитета [5]. До последнего времени выявление противотулярийного иммунитета у людей проводили с использованием серологических исследований и/или реакции гипер-

чувствительности замедленного типа с тулярином. Аллергическая проба с тулярином может вызывать побочные реакции [1]. Поэтому взамен аллергических реакций *in vivo* предпочтительно использовать тесты для оценки Т-клеточного звена противотулярийного иммунитета *in vitro* – безопасные для организма. Существующий метод *in vitro* – реакция лейкоцитолиза – с использованием тулярина позволяет оценить цитотоксическую активность общего пула эффекторных клеток. Для выявления активации CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> субпопуляций Т-лимфоцитов широко используются методы цитофлюориметрии. Специфическую активацию лимфоцитов *in vitro*, как правило, индуцируют с использованием изолированных антигенов или клеточных структур. Тулярин представляет собой инактивированную суспензию клеток *F. tularensis*, содержащую широкий спектр антигенов. В литературе отсутствуют данные об использовании тулярина *in vitro* в качестве специфического индуктора изменения эффекторной активности Т-клеток у мышей, иммунизированных живой тулярийной вакциной.

Цель исследования – оценить способность тулярина специфически активировать в системе *in vitro* CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> субпопуляции Т-лимфоцитов мышей, иммунизированных вакцинным штаммом *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ, а также выявить наличие антител к тулярину в сыворотках иммунных мышей.

## Материалы и методы

**Штаммы.** В работе использовались штаммы *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ, *F. tularensis* 503; *Yersinia pestis* EV НИИЭГ; *Salmonella enteritidis* 92 из коллекции патогенных микроорганизмов ГНЦ ПМБ. Бактериальные культуры для иммунизации мышей выращивали: *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ, *F. tularensis* 503 – на FT агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ) 16 ч при 37 °С; *Yersinia pestis* EV НИИЭГ – на агаре Brain heart infusion (High Media, India) с добавлением 5 % гемолизированной крови 16–18 ч при 28 °С; *Salmonella enteritidis* 92 – на ГРМ-агаре (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) 16 ч при 37 °С.

**Животные.** Мышей линии BALB/c весом 18–20 г иммунизировали однократно подкожно клетками *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ и *Salmonella enteritidis* 92 по 20 КОЕ (14 и 7 мышей в группах соответственно), *Y. pestis* EV НИИЭГ в дозе  $1 \cdot 10^5$  КОЕ (7 мышей в группе). На 28-е сутки после иммунизации у семи мышей из каждой группы, включая интактных в качестве отрицательного контроля, отбирали кровь для получения сывороток и селезенки для выделения спленоцитов.

**Заражение.** На 28-е сутки после иммунизации по 7 мышей заражали подкожно штаммом *F. tularensis* 503 ( $LD_{50}$  меньше 10 КОЕ): интактных – в дозе 10 КОЕ/мышь; иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ – в дозе 500 КОЕ/мышь ( $50 LD_{50}$ ). Наблюдение за зараженными животными проводили в течение 21 сут. Селезенки павших животных гомогенизировали и высевали на FT агар.

**Тулярин** (аллерген туляремийный жидкий для накожного применения) – коммерческий препарат, представляющий собой взвесь туляремийных микробов вакцинного штамма *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ, убитых нагреванием в 0,9 % растворе хлорида натрия (ФГУН «НПО «Микроген», Омск).

**Определение титра антител.** Тулярин в количестве  $10^8$  кл/мл адсорбировали в лунки 96-луночного планшета фирмы Costar (США) при 4 °С в течение ночи.

Свободные центры связывания блокировали 3 % раствором сухого обезжиренного молока при 37 °С в течение 30 мин. Сыворотки мышей исходно разводили 1:20, далее титровали с шагом 1:2 и инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. После трехкратной отмывки добавляли конъюгат овечьих антител к иммуноглобулину мыши – пероксидаза хрена (Amersham) в рабочем разведении и инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. Окрашивание проводили раствором субстрата для пероксидазы хрена ортофенилендиамина (ОФД) (Sigma, США) с добавлением перекиси водорода до 0,03 %. Реакцию останавливали раствором 0,1 М соляной кислоты. Оптическую плотность в лунках планшета определяли с помощью Multiscan («Labsystem», Финляндия) при длине волны 492 нм.

**Определение поверхностных маркеров лимфоцитов и внутриклеточных цитокинов.** Спленициты

( $5 \cdot 10^5$  кл/мл) каждой группы мышей выделяли [8], пулировали и инкубировали в лунках 96-луночного планшета по 200 мкл 24 ч при 37 °С во влажной атмосфере с содержанием 5 %  $CO_2$  в присутствии тулярина ( $10^8$  м.к./мл) и без него. После инкубирования спленоциты отмывали в фосфатно-солевом буфере и обрабатывали моноклональными антителами к поверхностным маркерам CD3 PerCP (BD Biosciences Farmigen), CD4 APC, CD8 PE, CD69 FITC (Caltag, Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителей.

Для определения внутриклеточных цитокинов за 4 ч до внесения моноклональных антител в культуру спленоцитов добавляли пермеабиллизатор GolgiPlug (BD Bioscience). Затем добавляли моноклональные антитела к поверхностным рецепторам CD3 PerCP и CD4 APC. Через 15 мин добавляли 0,2 % раствор Твин-20 и моноклональные антитела IFN $\gamma$ -FITC и ФНО- $\alpha$ -PE (Caltag, Invitrogen) и инкубировали еще 20 мин.

Спленициты анализировали на проточном цитофлюориметре FACSCalibur (Becton Dickinson). Для анализа выделяли (гейтировали) клетки с близкими физическими параметрами светорассеяния и интенсивностью флуоресценции. В каждом образце анализировали 10 тыс. клеток. Процент клеток, несущих маркер CD69, а также клетки, содержащие внутриклеточные цитокины ИФН- $\gamma$  и ФНО- $\alpha$ , определяли с помощью трехцветного цитометрического анализа в программе «Cell Quest».

**Статистика.** Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

Формирование протективного противотуляремийного поствакцинального иммунитета у экспериментальных животных было подтверждено результатами экспериментальной инфекции после заражения штаммом *F. tularensis* 503: все зараженные мыши, иммунизированные *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ, оставались живыми до конца срока наблюдения, а все интактные – погибли на 4–6-й день после инфицирования.

Оценка гуморального иммунитета методом ИФА показала, что у мышей, иммунизированных *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ, титр антител составил в среднем 1:68 (таблица). Несмотря на 100 % выживаемость иммунных мышей, у одного животного из пяти проверенных титр антитела к тулярину был 1:20. У мышей, вакцинированных гетерологичными вакцинами *Salmonella enteritidis* 92 и *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, антитела к тулярину в ИФА не обнаруживались, что свидетельствует о специфичности реакции с тулярином.

Возможность использования тулярина в качестве активатора Т-лимфоцитов оценивали по изменению экспрессии поверхностного рецептора CD69 – маркера ранней активации клеток. В таблице при-

Специфическая активность гуморального и клеточного противотуляремийного иммунитета у мышей линии BALB/c

| Группы мышей<br>(n=7)                                   | Средние<br>реципрокные<br>титры антител<br>к тулярину | CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> |                           |             | CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> |                           |             |
|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|---------------------------|-------------|-----------------------------------------------------|---------------------------|-------------|
|                                                         |                                                       | Условия культивирования                             |                           | КС*         | Условия культивирования                             |                           | КС*         |
|                                                         |                                                       | без активации,<br>среда RPMI, %                     | активация<br>тулярином, % |             | без активации,<br>среда RPMI, %                     | активация<br>тулярином, % |             |
| Интактные                                               | 20                                                    | 0,46                                                | 0,77                      | 1,67        | 2,91                                                | 3,78                      | 1,30        |
| Иммунизированные<br><i>F. tularensis</i> 15 линии НИИЭГ | 68 (20÷160)                                           | 1,07                                                | <b>8,94</b>               | <b>8,36</b> | 3,82                                                | <b>7,65</b>               | <b>2,00</b> |
| Иммунизированные <i>Y. pestis</i><br>EV НИИЭГ           | 20                                                    | 1,39                                                | 2,67                      | 1,92        | 1,63                                                | 2,69                      | 1,65        |
| Иммунизированные<br><i>S. enteritidis</i> 92            | 20                                                    | 2,64                                                | 2,78                      | 1,05        | 8,58                                                | 9,36                      | 1,09        |

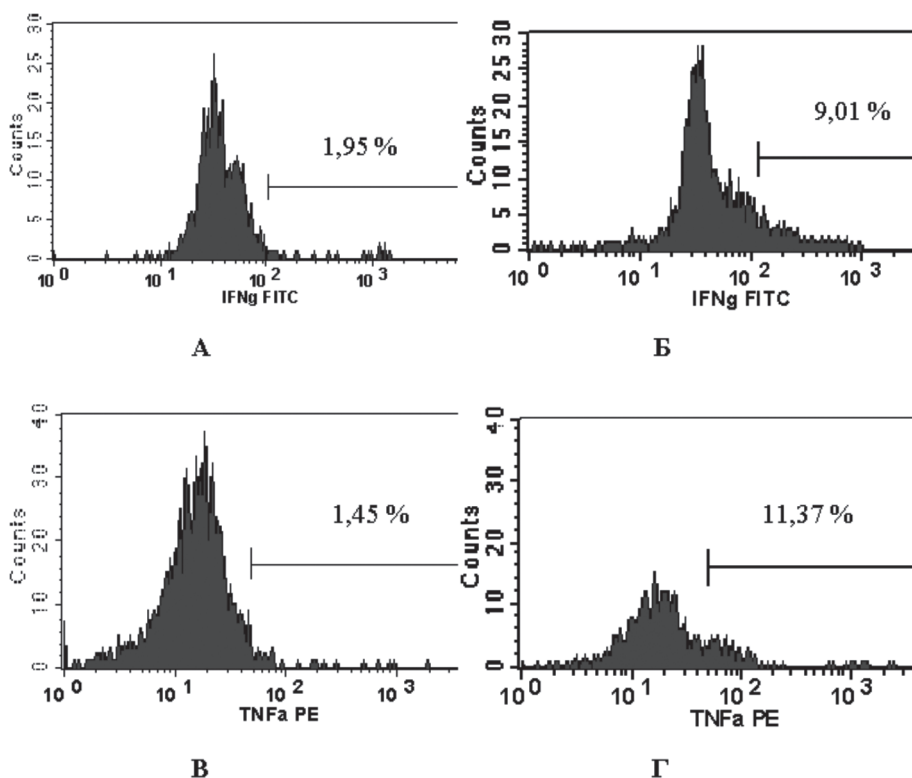
\*Коэффициент стимуляции – соотношение CD69<sup>+</sup> лимфоцитов, стимулированных *in vitro* тулярином, к количеству CD69<sup>+</sup> лимфоцитов, не стимулированных.

ведены данные процентного содержания Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) и Т-супрессоров (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), экспрессирующих маркер CD69, после стимуляции их *in vitro* тулярином в популяции лимфоцитов, полученных от интактных и иммунизированных мышей. Ранее было показано, что возбудители туляремии, чумы и сальмонеллеза имеют перекрестно реагирующие антигены [9]. Поскольку нами методом ИФА в сыворотках мышей, иммунизированных *Y. pestis* и *S. enteritidis*, не выявлено перекрестно реагирующих антител с тулярином, то для подтверждения специфичности экспрессии маркера ранней активации на Т-хелперах в ответ на стимуляцию их *in vitro* тулярином исследовались также лимфоциты, полученные от мышей, иммунизированных *Y. pestis* EV НИИЭГ и *S. enteritidis* 92 в иммуногенных дозах.

Без активации тулярином *in vitro* количество CD69-позитивных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов, выделенных

из селезенки мышей на 28-й день после иммунизации животных вакцинными штаммами *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ, *Y. pestis* EV НИИЭГ или *S. enteritidis* 92, составило 1,07, 1,39 и 2,64 % соответственно. Содержание CD69-позитивных CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у интактных мышей составило 0,46 %. Некоторое увеличение содержания CD69<sup>+</sup> Т-хелперов у иммунных животных по сравнению с лимфоцитами, полученными от интактных мышей, свидетельствует о спонтанной поствакцинальной функциональной активности лимфоцитов.

Активация спленоцитов *in vitro* тулярином приводила к увеличению CD69-позитивных Т-хелперов только в группе мышей, иммунизированных живой туляремийной вакциной. Процент лимфоцитов с маркерами CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> в этой группе животных после стимуляции тулярином увеличился до 8,94 и коэффициент стимуляции (КС) соста-



Процентное содержание Т-хелперов, синтезирующих ИФН-γ и ФНО-α без стимуляции и после стимуляции их *in vitro* тулярином, у мышей, иммунизированных *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ:

Процентное содержание CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клеток, синтезирующих ИФН-γ (А) и ФНО-α (В) без стимуляции *in vitro* тулярином; процентное содержание CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клеток, синтезирующих соответственно ИФН-γ (Б) и ФНО-α (Г) после стимуляции *in vitro* тулярином

вил 8,36. В остальных группах мышей КС не превышал 1,92. Полученные данные свидетельствуют о специфичной активации тулярином Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>) мышей со сформированным иммунитетом к туляремии.

В субпопуляции цитотоксических лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) под влиянием тулярина *in vitro* тенденция к увеличению клеток, экспрессирующих маркер CD69, отмечалась только в группе мышей, иммунизированных против туляремии (КС = 2, таблица).

Достоверное по отношению к не активированному тулярином лимфоцитам увеличение Т-хелперов, синтезирующих ИФН-γ и ФНО-α, в ответ на стимуляцию антигенами тулярийного микроба *in vitro* обнаружено только у лимфоцитов, выделенных от мышей, иммунизированных *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ (рисунок). Содержание CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> лимфоцитов, синтезирующих ИФН-γ и ФНО-α, после активации их *in vitro* тулярином составляло 9,01 и 11,37, а без стимуляции – 1,95 и 1,45 % соответственно.

Таким образом, показано, что тулярин содержит антигены, которые специфически взаимодействуют с антителами сывороток мышей, вакцинированных *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ. Молекулярные структуры, содержащиеся в тулярине, специфически усиливают экспрессию CD69 Т-хелперами мышей линии BALB/c, иммунизированных против туляремии, в системе *in vitro*. Кроме того, нами показано, что тулярин специфически усиливает синтез ИФН-γ и ФНО-α лимфоцитами CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, что согласуется с данными, полученными в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) у людей, вакцинированных *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ или переболевших тулярией. В реакции ГЗТ происходит активация фагоцитов и Т-хелперов первого типа – Th1, приводящая к продукции ИФН-γ, ФНО-α и усилению экспрессии CD69 [6]. Поэтому предлагаемая нами реакция с тулярином *in vitro*, позволяющая выявить специфическую экспрессию рецептора CD69

на поверхности CD4<sup>+</sup> субпопуляции Т-лимфоцитов и усиление синтеза ИФН-γ и ФНО-α лимфоцитами CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, может быть использована для выявления постинфекционного или поствакцинального иммунитета к туляремии.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мейл Д., Бростофф Дж., Рот Д.Б., Роитт А. Иммунология. М.: Логосфера; 2007. 568 с.
2. Cowley S.C., Elkins K.L. Immunity to *Francisella*. Front. Microbiol. 2011; 2:1–26. doi:10.3389/fmicb.2011.00026.
3. Cowley S.C., Hamilton E., Frelinger J.A., Su J., Forman J., Elkins K.L. CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells control intracellular bacterial infections both *in vitro* and *in vivo*. J. Exp. Med. 2005; 202(2):309–19.
4. Elkins K.L., Colombini S.M., Meierovics A.I., Chu M.C., Chou A.Y., Cowley S.C. Survival of secondary lethal systemic *Francisella* LVS challenge depends largely on interferon gamma. Microbes Infect. 2010;12:28–36.
5. Elkins K.L., Cowley S.C., Bosio C.M. Innate and adaptive immunity to *Francisella*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2007; 1105:284–324.
6. Katkere B., Wilson J.E., Drake J.R. Effects of interferon-γ and *Francisella tularensis* elicited soluble factors on macrophage antigen processing. FASEB J. 2008; 22:1068.8.
7. Wenk M.K., Fernandez A.Z. A manual for biochemistry protocols. Vol. 3. National University of Singapore. 2007. 142 p.
8. Wickstrum J.R., Hong K.J., Bokhari S., Reed N., McWilliams N., Horvat R.T., Parmely M.J. Coactivating signals for the hepatic lymphocyte gamma interferon response to *Francisella tularensis*. Infect. Immun. 2007; 75:1335–42.
9. Yazg H., Uyanik M.H. et al. [Tularemia seroprevalence in the risky population living in both rural and urban areas of Erzurum]. Mikrobiyol. Bul. 2011; 45(1):67–74.

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

1. Male D., Brostoff J., Roth D., Roitt A. Immunology. Elsevier; 2006. 552 p.

#### Authors:

Firstova V.V., Pavlov V.M., Kravchenko T.B., Zyrina E.V., Borzilov A.I., Dyatlov I.A. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

#### Об авторах:

Фирстова В.В., Павлов В.М., Кравченко Т.Б., Зырина Е.В., Борзилов А.И., Дятлов И.А. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Московская обл., п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org

Поступила 20.07.12.

Т.П.Шмелькова, С.Н.Клюева, С.А.Бугоркова, А.Л.Кравцов, О.В.Громова, О.А.Волох,  
С.А.Еремин, А.К.Никифоров, Т.Н.Щуковская

## ОЦЕНКА ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ O1 И O139 АНТИГЕНОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

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

Проведена оценка иммунобиологических свойств экспериментальных препаратов О-антигена *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп на лабораторных мышах: определение токсичности, анализ морфологических изменений в органах и проточно-цитометрический мониторинг клеточного цикла лейкоцитов, спленоцитов и клеток костного мозга. Показано, что в дозе 100 мкг на мышь О-антиген не вызывает значимых повреждений паренхиматозных органов, нарушения баланса апоптоза и пролиферации иммунокомпетентных клеток. Комплексная оценка иммунобиологических свойств препаратов позволяет получить представление об их влиянии на макроорганизм, возможности дальнейшего изучения и использования в качестве компонентов химической вакцины.

**Ключевые слова:** O1 и O139 антигены холерного вибриона, токсичность, морфологический анализ, апоптоз, пролиферация.

T.P.Shmel'kova, S.N.Klyueva, S.A.Bugorkova, A.L.Kravtsov, O.V.Gromova, O.A.Volokh, S.A.Eremin,  
A.K.Nikiforov, T.N.Shchukovskaya

## Evaluation of Immunobiological Properties of Cholera Vibrio O1 and O139 Antigens

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Evaluated are immunobiological properties of experimental preparation on the basis of *Vibrio cholerae* O-antigen, O1 and O139 serogroups on the mouse model: determination of toxicity, analysis of morphological changes in organs, and flow-cytometric monitoring of cell cycle of leukocytes, splenocytes and bone marrow cells. It is demonstrated that O-antigen 100 µg dose per mouse does not initiate either significant changes in parenchymatous organs, or imbalance of apoptosis and proliferation of immune-competent cells. Comprehensive assessment of immunobiological properties of the preparations allows to get an insight about their effect on macroorganism, possibility for further studies and their application as chemical vaccine components.

**Key words:** cholera vibrio O1 and O139 antigens, toxicity, morphological analysis, apoptosis, proliferation.

Согласно мнению экспертов Независимой группы ООН по расследованию причин вспышки холеры на Гаити в 2011 г. вакцинация – один из наиболее действенных способов предотвращения эпидемий холеры [8]. Разработка безопасных, эффективных, простых в применении и экономичных вакцин нового поколения с использованием современных достижений молекулярной биологии, генной инженерии и биотехнологии является приоритетным направлением развития вакцинологии [2, 7]. Особое внимание уделяют исследованиям, направленным на разработку химической вакцины против холеры, вызываемой как *V. cholerae* O1 серогруппы, так и *V. cholerae* O139. Так, по данным ВОЗ, в странах Азии холера, обусловленная *V. cholerae* O139, ежегодно составляет до 30 % и более от общей заболеваемости холерой [3].

О-антиген *V. cholerae* – важный протективный антиген, ответственный за выработку противобактериального иммунитета [1]. Использование O1 и O139 антигенов в качестве компонентов химической вакцины предполагает их тщательное изучение, в первую очередь, с позиции токсичности и безопасности.

Цель работы – оценка иммунобиологических свойств экспериментальных препаратов О-антигена

холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп как компонентов химической вакцины против холеры.

## Материалы и методы

Экспериментальные препараты О-антигена получены из культур *V. cholerae* O1 серогруппы классического биовара серовара Огава (штамм М-41) и эльтор биовара серовара Инаба (штамм М-569), *V. cholerae* O139 серогруппы (штамм М 377/1) с использованием установки по ультрафильтрации на различных мембранных модулях и последующим осаждением сульфатом аммония. Все препараты прошли контроль специфической стерильности. Лиофильно высушенные антигены растворяли в физиологическом растворе и вводили аутбредным и инбредным мышам в дозах 100 или 250 мкг/мышь. В контрольную группу входили мыши, которым вводили 0,9 % раствор натрия хлорида. Токсичность препаратов оценивали в классическом тесте на смешанном поголовье аутбредных мышей массой 18–20 г по следующим признакам: особенность поведения, интенсивность и характер двигательной активности, состояние волосяного и кожного покровов, консистенция фекальных масс, изменению массы тела, уровень смертности. Наблюдение за животными осуществля-

ли ежедневно в течение 7 сут [4]. Морфологическую оценку изменений у мышей на введение О-антигена холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп, а также проточно-цитометрический мониторинг клеточного цикла иммунокомпетентных клеток проводили на инбредных мышах линии BALb/c массой 18–20 г на 1-е и 7-е сутки после иммунизации. Для морфологического исследования у декапитированных животных были забраны кусочки внутренних органов (сердца, легких, почки, печени, селезенки, тонкого и толстого кишечника), которые фиксировали в 10 % водном растворе формалина. Приготовленные по стандартной методике [5] полутонкие парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином и просматривали на световом микроскопе. Количество клеточных элементов подсчитывали в 10 полях зрения правильно ориентированных срезах органов. При проточно-цитометрическом анализе в качестве показателя безопасности препаратов определяли баланс процессов апоптоза и пролиферации иммунокомпетентных клеток в процессе формирования иммунного ответа посредством распределения лейкоцитов крови, спленоцитов и клеток костного мозга по клеточному циклу с определением коэффициента соотношения апоптотических и пролиферирующих клеток [10]. Клетки в апоптозе идентифицировали как клетки с пониженным содержанием ДНК (<2С), пролиферирующие клетки характеризовались повышенным содержанием ДНК (>2С). Содержание ДНК в клетках соотносили с интенсивностью флуоресценции клеток, выделенных и окрашенных смесью красителей митрамицина и этидиум бромид [8].

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel. Определяли среднее значение (М), стандартную ошибку (m). Достоверность различий оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Разница считалась достоверной при значении  $p \leq 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Все препараты О-антигена холерного вибриона О1 и О139 серогрупп не обладали токсичностью в дозе 100 мкг/мышь. При увеличении дозы О-антигена в 2,5 раза мыши, иммунизированные О-антигеном О1 серогруппы серовара Огава или О-антигеном О139 серогруппы, к концу срока наблюдения имели обычное поведение, удовлетворительный внешний вид, не отказывались от пищи, прибавили в весе. Однако первые 2 сут у животных, иммунизированных О-антигеном О1 серогруппы серовара Огава, наблюдали внешние признаки интоксикации – взъерошенный вид, сонливость, снижение массы тела на  $(3,2 \pm 1,7) \%$ . В последующие дни периода наблюдения мыши возвратились к исходному состоянию, отмечалось увеличение массы тела на  $(7,6 \pm 2,6) \%$ . Через 1 сут после иммунизации О-антигеном О1 серогруппы серовара Инаба регистрировалась гибель 4 мышей из 5. Общее состояние оставшейся мыши из

данной группы оставалось в пределах нормы, прибавка в весе в конце эксперимента составила 11 %.

Дальнейшие морфологические и проточно-цитометрические исследования О-антигена холерного вибриона О1 и О139 серогрупп проводили с заведомо нетоксичной дозой для всех препаратов – 100 мкг/мышь.

Выявленные при морфологическом исследовании изменения у мышей, иммунизированных препаратами О-антигена, носили адаптационно-компенсаторный характер и заключались в умеренном полнокровии сосудов внутренних органов, очаговом функциональном напряжении отдельных паренхимных элементов на фоне относительной активации звездчатых ретикулоэндотелиальных клеток в печени (клеток Купфера), различной степени выраженности гиперпластических процессов в селезенке и отсутствии альтеративно-экссудативных реакций в кишечнике. При этом установлены некоторые колебания описываемых адаптационно-компенсаторных процессов у животных в ответ на введение препаратов О-антигена холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп. Так, на введение О139 антигена были отмечены компенсированные гемодинамические нарушения и очаговые дистрофические изменения эпителия извитых канальцев почек и признаки функционального напряжения гепатоцитов, сохраняющиеся до 7-х суток наблюдения, более выраженные гиперпластические процессы в селезенке регистрировались при введении О-антигена холерных вибрионов О1 серогруппы сероваров Инаба и Огава. Сравнивая реакцию клеток эффекторной зоны иммунной системы кишечника: клеток собственной пластинки слизистой (СПС) и межэпителиальных лимфоцитов (МЭЛ), отмечали умеренную лимфогистиоцитарную инфильтрацию и появление зрелых плазматических клеток в СПС тонкого кишечника всех иммунизированных мышей, но при введении О-антигена холерного вибриона О139 серогруппы регистрировали в этой зоне еще и незначительное увеличение количества лейкоцитов и эозинофилов. Активация МЭЛ в тонком кишечнике животных была достоверной в ответ на введение О-антигенов холерного вибриона О1 серогруппы. Со стороны клеток Панета – клеток кишечника, обеспечивающих антибактериальную защиту [6], в указанные сроки отмечали на введение О-антигена холерных вибрионов О1 серогруппы сероваров Инаба и Огава умеренное опустошение, в то время как при введении О-антигена холерного вибриона О139 серогруппы регистрировали гипертрофию этих элементов.

Проточно-цитометрический мониторинг распределения лейкоцитов крови, спленоцитов и клеток костного мозга показал, что под влиянием О-антигена холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп происходило повышение количества клеток пролиферирующих и в апоптозе среди спленоцитов и клеток костного мозга. Наибольшей способностью вызывать изменения в клеточном цикле иммунокомпетентных

Показатели апоптоза и пролиферации иммунокомпетентных клеток мышей под воздействием О-антигена *V. cholerae* (n=6)

| Препараты<br>О-антигена | Лейкоциты крови, % |         |              |         | Спленоциты, % |           |              |           | Клетки костного мозга, % |           |              |          |
|-------------------------|--------------------|---------|--------------|---------|---------------|-----------|--------------|-----------|--------------------------|-----------|--------------|----------|
|                         | апоптоз            |         | пролиферация |         | апоптоз       |           | пролиферация |           | апоптоз                  |           | пролиферация |          |
|                         | 1 сут              | 7 сут   | 1 сут        | 7 сут   | 1 сут         | 7 сут     | 1 сут        | 7 сут     | 1 сут                    | 7 сут     | 1 сут        | 7 сут    |
| Инаба                   | 1,8±0,5            | 1,9±0,7 | 11,1±2,5     | 5,9±1,3 | 6,8±1,1*      | 5,4±1,3*  | 17,3±2,3     | 20,3±2,9* | 1,5±0,2*                 | 2,2±0,4   | 32,2±3,4     | 26,1±3,5 |
| Огава                   | 2,3±0,6            | 1,9±0,4 | 13,1±0,8     | 4,7±0,4 | 4,5±1,4       | 4,5±0,4** | 18,6±2,0     | 20,8±5,4  | 0,7±0,2                  | 1,1±0,2   | 34,3±2,0     | 30,7±1,8 |
| O139                    | 1,8±0,4            | 1,6±0,2 | 16,3±0,9     | 5,5±0,8 | 3,3±0,8       | 3,1±0,3*  | 20,2±2,3     | 16,6±1,4  | 0,8±0,2                  | 2,6±0,2** | 31,1±1,7     | 27,4±0,7 |
| Контроль                | 2,3±1,0            | 1,9±0,1 | 13,3±3,0     | 6,2±0,3 | 3,7±1,0       | 1,7±0,5   | 17,0±2,6     | 12,7±0,7  | 1,0±0,1                  | 1,3±0,3   | 28,1±2,7     | 27,1±1,2 |

Примечание. Достоверность различия между опытом и контролем: \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,001$ .

клеток обладал О-антиген холерного вибриона O1 серогруппы серовара Инаба. Все зарегистрированные показатели пролиферации и апоптоза (таблица) являются реакцией макроорганизма на введение препарата, обладающего иммунобиологической активностью. В целом, препараты О-антигена холерных вибрионов O1- и O139 серогрупп не вызывали нарушения баланса апоптоза и пролиферации иммунокомпетентных клеток в процессе иммуногенеза (коэффициент соотношения  $< 1$ , т.е. количество клеток в апоптозе не превысило количество пролиферирующих клеток).

Интересно отметить, что О-антиген O1 серогруппы серовара Инаба обладал токсичностью в дозе 250 мкг/мышь и способностью вызывать наибольшие изменения в клеточном цикле спленоцитов и клеток костного мозга в нетоксичной для мышей дозе 100 мкг, в отличие от О-антигена O1 серогруппы серовара Огава и O139 антигена. Установление связи между этими событиями требует дальнейших наблюдений.

Таким образом, в дозе 100 мкг/мышь все перечисленные препараты O1 и O139 антигенов холерных вибрионов не обладали токсичностью на уровне макроорганизма, не вызывали значимых изменений во внутренних органах и нарушения баланса процессов апоптоза и пролиферации иммунокомпетентных клеток в условиях данного эксперимента, что может служить обоснованием их дальнейшего изучения и использования в качестве компонентов холерной химической вакцины.

Работа проведена в рамках выполнения Распоряжения Правительства Российской Федерации № 1426-р от 02.10.2009 г.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Захарова Т.Л., Заднова С.П., Ливанова Л.Ф., Киреев М.Н., Смирнова Н.И. Использование рекомбинантных штаммов для одновременного получения нескольких очищенных основных протективных антигенов холерного вибриона. Пробл. особо опасных инф. 2009; 2(100):68–71.
2. Кутырев В.В., Шуковская Т.Н. Холерные вакцины. В кн.: Вакцина и вакцинация: национальное руководство. М.; 2011.

С. 431–45.

3. Ломов Ю.М., Москвитина Э.А. Эпидемиологическая обстановка по холере в мире, странах СНГ и России. Прогноз. Пробл. особо опасных инф. 2010; 2(104):11–3.
4. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям. МУК 4.1/4.2.588-96. М., 1996.
5. Саркисова Д.С., Перова Ю.Л., редакторы. Микроскопическая техника. Руководство. М.: Медицина; 1996. 544 с.
6. Шахламов В.А., Солнышкова Т.Г. Ультроструктурный и морфологический анализ реакции клеток Панета на введение холерного токсина. Бюл. эксп. биол. и мед. 1992; 63(4):415.
7. Шуковская Т.Н., Саяпина Л.В., Кутырев В.В. Вакцинопрофилактика холеры: современное состояние вопроса. Эпидемиол. и вакцинопрофилактика. 2009; 2(45):62–7.
8. Barlogie B., Spidzer G., Hart G. et al. DNA histogram analysis of human hemopoietic cells. Blood. 1976; 48(2):245–57.
9. Final Report of the Independent Panel of Experts on the Cholera Outbreak in Haiti. 04 May 2011. Available from: <http://www.un.org/News/dh/infocus/haiti/UN-cholera-report-final>
10. 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.

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

1. Zakharova T.L., Zadnova S.P., Livanova L.F., Kireev M.N., Smirnova N.I. [Recombinant strains application for simultaneous preparation of several purified cholera vibrio antigens]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2009; (100):68–71.
2. Kutyrev V.V., Shchukovskaya T.N. [Cholera vaccines]. In: [Vaccine and Vaccination: National Guidelines]. M.; 2011. P. 431–45.
3. Lomov Yu.M., Moskvitina E.A. [Epidemiologic situation on cholera in the world, CIS countries and Russia. Prognosis]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2010; (104):11–3.
4. [Methods of quality control over immunobiological preparations administered to humans. MR 4.1/4.2.588-96]. M.; 1996.
5. Sarkisova D.S., Perova Yu.L., editors. [Microscopy Equipment: Operating Manual]. M.: Meditsina; 1996. 544 p.
6. Shakhlov V.A., Solnyshkova T.G. [Ultra-structural and morphological analysis of Paneth cell reaction to cholera toxin administration]. Byul. Eksp. Biol. Med. 1992; 63(4):415.
7. Shchukovskaya T.N., Sayapina L.V., Kutyrev V.V. [Vaccine prophylaxis of cholera: current state of the issue]. Epidemiol. Vaktsinoprofilakt. 2009; 2(45):62–7.

#### Authors:

Shmel'kova T.P., Klyueva S.N., Bugorkova S.A., Kravtsov A.L., Gromova O.V., Volokh O.A., Eremin S.A., Nikiforov A.K., Shchukovskaya T.N. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru)

#### Об авторах:

Шмелькова Т.П., Ключева С.Н., Бугоркова С.А., Кравцов А.Л., Громова О.В., Волох О.А., Еремин С.А., Никифоров А.К., Шуковская Т.Н. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru)

Поступила 10.01.12.

А.С.Волынкина, А.Н.Куличенко

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ВИРУСА  
КРЫМСКОЙ-КОНГО ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ  
НА ЮГЕ ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ В 2011 г.**

*ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь*

Представлены результаты генотипирования вируса ККГЛ, выявленного в клиническом материале от больных КГЛ из Ставропольского края, Ростовской и Астраханской областей в 2011 г. Определены нуклеотидные последовательности фрагментов 115-652 и 984-1469 S-сегмента и фрагмента 4620-5075 М-сегмента генома вируса для 28 образцов. Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей показал, что в 2011 г. в исследуемых регионах циркулировали типичные для данной местности штаммы, заноса новых генетических вариантов вируса не наблюдалось. Впервые в клиническом материале от больного КГЛ выявлен и охарактеризован по фрагментам S- и М-сегментов генома вариант вируса ККГЛ, относящийся к подгруппе «Астрахань-2».

*Ключевые слова:* вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки, генетическое типирование, секвенирование, филогенетический анализ.

A.S.Volynkina, A.N.Kulichenko

**Genetic Monitoring of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in the South of the European Part of Russia**

*Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol*

Presented are the results of gene-typing of CCHF virus detected in clinical samples from CHF patients from the Stavropol, Rostov and Astrakhan Regions in 2011. For 28 samples determined are nucleotide sequences of the fragments 115–652 (S segment) and fragments 984–1469 (M segment). Phylogenetic analysis of these nucleotide sequences demonstrated that typical strains circulated in 2011 in the regions under surveillance, importation of the new genetic variants of the virus did not take place. CCHF virus variant affiliated to the subgroup “Astrakhan-2” was detected in the clinical samples for the first time and characterized for its genome S- and M-segment fragments.

*Key word:* Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, gene-typing, sequencing, phylogenetic analysis.

Крымская геморрагическая лихорадка – эндемичное заболевание для юга европейской части России, которое в последние годы по эпидемическим проявлениям является одной из наиболее актуальных для данного региона инфекцией. В период с 1999 по 2011 год в субъектах ЮФО и СКФО выявлен 1501 случай заболевания КГЛ, 68 из них (4,5 %) закончились летально. В 2011 г. было зарегистрировано 99 случаев заболевания с пятью летальными исходами [1]. Ситуация по КГЛ на юге России остается напряженной, что обуславливает необходимость дальнейшего изучения не только эпидемиологических и эпизоотологических аспектов КГЛ, но и генетических особенностей вируса.

Геном вируса ККГЛ представлен одноцепочечной РНК отрицательной полярности, состоит из 3 сегментов: малого (S) – 1670 п.о., среднего (M) – 5360 п.о. и большого (L) – 12160 п.о., кодирующих соответственно нуклеокапсидный белок (N), оболочечные гликопротеины (G1, G2) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp) [5, 6].

В настоящее время, на основании частичных и полных нуклеотидных последовательностей S- и

L-сегментов генома вируса ККГЛ выделяют 7 генотипов вируса, имеющих корреляцию с географическим местом выделения: генотип I или «Африка-1», II или «Африка-2», III или «Африка-3», IVa или «Азия-1», IVb или «Азия-2», V или «Европа-1», VI или «Европа-2» [6]. Большинство случаев заболевания КГЛ в России, Турции и на Балканском полуострове вызваны вирусом с генотипом «Европа-1», в пределах которого можно выделить несколько топовариантов: подгруппы «Волгоград-Ростов-Ставрополь», «Ставрополь-Ростов-Астрахань-1», а также максимально генетически удаленные от прочих «Балканскую» подгруппу и «Астрахань-2» [3].

Анализ частичных и полных последовательностей М-сегмента, позволяет выделить 5 генетических групп: М-1, М-2, М-3, М-4 и М-5 [6]. Все южнороссийские изоляты вируса входят в группу М-4, образуя 2 кластера, разделяющихся по географическому принципу: «Волгоград-Ростов-Ставрополь» и «Ставрополь-Ростов-Астрахань-1» [8]. В результате миграции возбудителя с инфицированными домашними животными или в клещах, питающихся на перелетных птицах, возможен занос новых генова-

риантов, приводящий к нарушению генетической однородности популяции и географической привязки генотипов вируса ККГЛ [7].

Целью настоящей работы явилась генетическая характеристика вариантов вируса ККГЛ, выявленного в клиническом материале от больных из Ставропольского края, Ростовской и Астраханской областей в 2011 г., оценка состояния популяции вируса ККГЛ, циркулирующего на юге европейской части России, определение преобладающих геновариантов вируса.

### Материалы и методы

Материалом для исследования служили образцы сывороток крови больных КГЛ с достаточной вирусной нагрузкой, собранных в эпидсезон 2011 г. (15 образцов из Ставропольского края, 11 – из Ростовской и 2 – из Астраханской области). Исследуемые образцы доставлены из 11 административных районов Ставропольского края (Нефтекумского, Ипатовского, Апанасенковского, Андроповского, Новоалександровского, Степновского, Благодарненского, Шпаковского, Туркменского, Труновского, Буденновского), из 5 районов Ростовской области (Волгодонского, Егорлыкского, Песчанокопского, Сальского, Мартыновского) и 2 районов Астраханской области (Приволжского и Камызякского). Заражение всех больных произошло вследствие укуса клеща при выполнении сельскохозяйственных работ по месту жительства, выездов в другие регионы не было. Заболевание протекало в среднетяжелой (25 случаев) и тяжелой форме (3 случая, из них 1 летальный), преимущественно без геморрагических проявлений (19 случаев).

Экстракцию РНК из клинических образцов осуществляли с помощью набора реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва). Получение комплементарной ДНК производили при помощи набора реагентов «РЕВЕРТА-L-100» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва).

Генетическое типирование изолятов РНК осуществляли методом прямого секвенирования 3 участков генома вируса: фрагментов 115-652 и 984-1469 кодирующей области малого (S) сегмента генома длиной 538 п.о. и 486 п.о., и фрагмента 4620-5075 кодирующей области среднего (M) сегмента генома вируса ККГЛ длиной 435 п.о. с последующим проведением филогенетического анализа (позиции фрагментов приводятся по полноразмерным последовательностям S- и M-сегментов генома штамма ROS/HUVLV-100, GenBank: DQ206447, DQ206448). Адекватность использования участка 4620-5075 кодирующей области M-сегмента генома вируса ККГЛ для выявления генетических групп была доказана ранее. Фрагменты 115-652 и 984-1469 S-сегмента представляют собой более протяженные участки, включающие в себя соответственно FR и PS области S-сегмента генома вируса ККГЛ, используемые ра-

нее для генетической характеристики штаммов вируса КГЛ [4, 8]. Филогенетические деревья, построенные по участкам 115-652 и 984-1469 кодирующей области малого (S) сегмента генома вируса ККГЛ и полноразмерному S-сегменту идентично отражают филогенетические взаимоотношения между штаммами, т.е. исследуемые участки являются конгруэнтными полноразмерному S-сегменту, что доказывает возможность их использования для генетического типирования вируса ККГЛ.

Для получения специфических ампликонов использовали 3 пары праймеров с авторскими модификациями состава реакционной смеси и режима амплификации: 24 (M-4621f): cagccatgccccaaac(t/c)tc и 25 (M-5076r): ct(a/g)tcagcta(a/g)tctttcacc(a/g)tcaag, S-100f: gatgagatgaacaagtgtttga и S-680r: tgcctttgacaaattccctgcacca, S-960f: gcacagattgacacc(c/g)ctttcagct и S-1490r: cactggtggcattgcccttga, разработанные Л.С.Карань (ФБУН ЦНИИЭ, Москва).

Очистку ПЦР продуктов проводили с помощью набора реагентов AxyPrep™ PCR Cleanup Kit (Axygen Biosciences, США). Расшифровку нуклеотидных последовательностей полученных ПЦР продуктов проводили на автоматическом секвенаторе «ABI-Prism DNA Sequencer 3500» (Applied Biosystems, США) с набором реагентов «ABI Prism Big Dye Terminator Kit v.3.1.», амплифицированная ДНК была секвенирована по обоим цепям.

Нуклеотидные последовательности фрагментов генома вируса ККГЛ, полученные в данной работе, сравнивали с имеющимися последовательностями штаммов вируса, полученными из базы данных GenBank. Для сравнения использовали полноразмерные и частичные последовательности M- и S-сегментов штаммов STV/HU29223, ROS/TI28044, ROS/HUVLV-100, VLG/TI29414, Kasmanov, 9553/2001, Kosovo-Hoti, Turkey-Kelkit-06, Turkey 200310849, V42/81, AP92, Congo 3010, Semunya, ArD8194, ArD15786, HY-13, 7001, 79121, Matin, Iran-52, IbAr 10200, SPU415/85, SPU 4/81, Sudan AB1 2009 (GenBank: AF481802, AY277672, DQ206447, DQ211644, AF428144, DQ133507, GQ337053, DQ211649, GU477489, DQ211638, DQ144418, DQ076413, DQ211639, DQ211640, CHU88413, AF415236, AF358784, AF527810, DQ446212, CHU88410, DQ211648, DQ076416, HQ378179, AF489586, DQ206448, AY179961, DQ211631, AY675511, EU037902, GQ337054, DQ211636, DQ211627, GU477490, DQ211625, DQ019222, DQ094832, DQ211626, AY900145, AB069670, AB069673, AF467769, DQ446215, AF467768, DQ211635, HQ378187).

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программы Vector NTI Suite 8.0. Анализ уровня генетического родства и построение филогенетических деревьев проводили в программе Mega 5.05 с использованием метода Neighbor joining, по алгоритму Kimura-2, статистическую достоверность

топологии филогенетических деревьев проверяли с помощью Bootstrap анализа, вычисления проводили для 1000 итераций.

### Результаты и обсуждение

Проведено генетическое типирование 28 образцов вируса ККГЛ, выявленного в клиническом материале от больных КГЛ. Определена нуклеотидная последовательность 84 фрагментов генома вариантов вируса ККГЛ. Анализ секвенограмм показал, что случаев микст-инфицирования больных разными штаммами вируса ККГЛ не происходило.

Полученные фрагменты использовали для проведения филогенетического анализа. Для определения кластерной позиции изучаемых образцов нами построено 3 филогенетических дерева, по 3 исследуемым участкам генома. Деревья, построенные по участкам S-сегмента идентичны по характеру ветвления, в работе приведено лишь одно из них.

На филогенетических деревьях, построенных по участкам S-сегмента, все изучаемые образцы вошли в группу «Европа-1» (V) (рис. 1), на филогенетическом дереве, построенном по участку М-сегмента, – в группу М-4 (рис. 2), это позволяет сделать вывод о том, что в эпидсезон 2011 г. на юге европейской части России циркулировали штаммы, характерные для данной территории. Заноса новых генетических вариантов из других географических областей не происходило.

Как видно из рис. 1 и 2, в группе российских штаммов наблюдается деление на 3 подгруппы. Подгруппа «Ставрополь-Ростов-Астрахань-1» включила в себя 13 образцов из Ставропольского края, 5 – из Ростовской области и 1 – из Астраханской области, кластеризующихся со штаммом STV/HU29223, являющимся типичным представителем данной подгруппы.

В подгруппу «Волгоград-Ростов-Ставрополь» вошли 6 образцов из Ростовской области, класте-

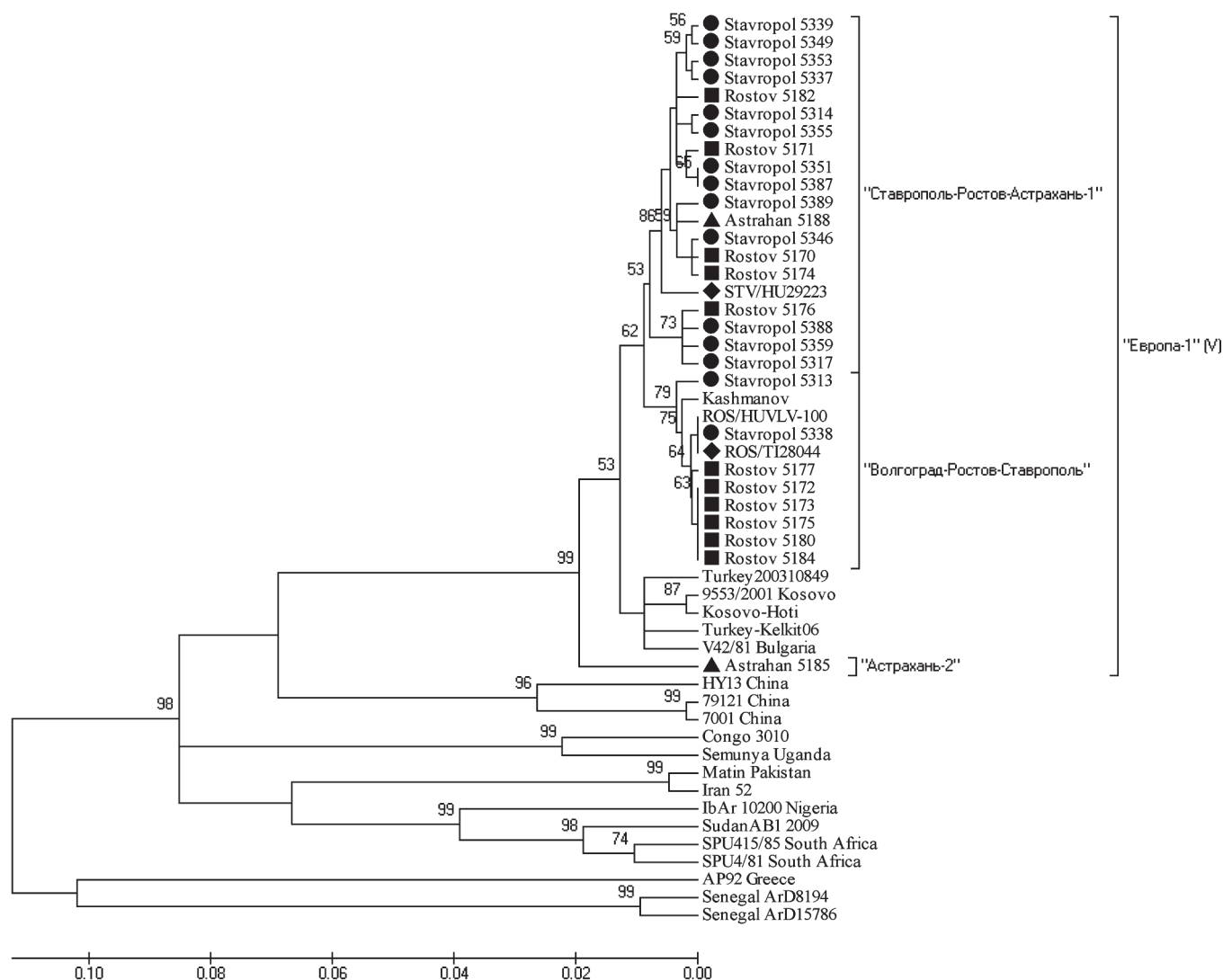


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное по участку 115-652 кодирующей области малого (S) сегмента генома вируса ККГЛ длиной 538 п.о. (Neighbour joining, Kimura-2), указаны индексы поддержки со значением >50:

◆ – типовые представители генетических подгрупп; ● – образцы из Ставропольского края; ■ – из Ростовской области; ▲ – из Астраханской области



Различия нуклеотидной / аминокислотной последовательности (%) по фрагменту М-сегмента

| Генотип<br>Участок<br>генома | М-4                                                  |                                                    |                           | М-1                     | М-2                    | М-3           | М-5                     |
|------------------------------|------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|---------------------------|-------------------------|------------------------|---------------|-------------------------|
|                              | Подгруппа<br>«Ставрополь-<br>Ростов-<br>Астрахань-1» | Подгруппа<br>«Волгоград-<br>Ростов-<br>Ставрополь» | «Балканская<br>подгруппа» |                         |                        |               |                         |
| М 4620-5075                  | 5,8–7,4/<br>4,8–6,9                                  | 1,8–3,2/<br>1,4–2,8                                | 4,1–6,2/<br>3,5–8,3       | 15,9–17,5/<br>10,3–13,1 | 16,3–18,9/<br>9,7–13,1 | 25,1/<br>22,8 | 24,1–27,4/<br>21,4–23,5 |

ми подгрупп «Ставрополь-Ростов-Астрахань-1» и «Волгоград-Ростов-Ставрополь», так и со штаммами «Балканской» подгруппы. На участке М 4620-5075 образец «Астрахань-5185» имеет наибольший процент различий нуклеотидной последовательности с представителями подгруппы «Ставрополь-Ростов-Астрахань-1», наименьший – с образцами подгруппы «Волгоград-Ростов-Ставрополь». По аминокислотной последовательности в пределах генотипа исследуемый образец наиболее отличается от штаммов «Балканской» подгруппы, наименьший процент отличий – с образцами подгруппы «Волгоград-Ростов-Ставрополь».

С представителями других генотипов различия по фрагментам S 115-652, S 984-1469 и М 4620-5075 составляют соответственно 11,7–20,1, 8,6–15,4 и 15,9–27,4 % по нуклеотидной последовательности, 6,2–11,2, 1,9–3,7 и 9,7–23,5 % по аминокислотной.

В пределах генетических подгрупп «Ставрополь-Ростов-Астрахань-1» и «Волгоград-Ростов-Ставрополь» процент различий нуклеотидной последовательности фрагментов S 115-652, S 984-1469 и М 4620-5075 представителей подгруппы «Ставрополь-Ростов-Астрахань-1» не превышает соответственно 2,4, 2,7 и 3,2 %, среди представителей подгруппы «Волгоград-Ростов-Ставрополь» – 0,9, 1,4 и 2,1 %. Аминокислотные последовательности на этих же участках в пределах подгруппы «Ставрополь-Ростов-Астрахань-1» максимально различаются на 1,1, 1,2 и 3,5 %, у штаммов подгруппы «Волгоград-Ростов-Ставрополь» – на 1,1, 0,6 и 2,2 %.

Анализ различий нуклеотидной и аминокислотной последовательностей подтверждает выделение образца «Астрахань-5185» по участкам S-сегмента в отдельную генетическую подгруппу в пределах генотипа «Европа-1», по фрагменту М-сегмента образец близок к представителям подгруппы «Волгоград-Ростов-Ставрополь».

Проведенный филогенетический анализ позволил установить корреляцию (статистически не значимую, в связи с малым числом выборки) между принадлежностью штамма к генетическим подгруппам, тяжестью течения заболевания и наличием геморрагических проявлений. Все случаи заболевания с тяжелым течением, из исследованных нами в 2011 г., вызваны представителями подгруппы «Ставрополь-Ростов-Астрахань-1», один из них закончился летально. Внутрибольничная вспышка КГЛ в мае 2011 г. в Ростовской области также была вызвана

штаммом этой подгруппы [2]. Штаммы подгруппы «Волгоград-Ростов-Ставрополь» вызывали заболевание средней тяжести, геморрагические проявления наблюдались в 2 случаях из 8 (25 %). Представители подгруппы «Ставрополь-Ростов-Астрахань-1» вызывали геморрагические проявления в 31,6 % случаев (6 случаев из 19).

Таким образом, образцы из Ставропольского края вошли в 2 подгруппы: «Ставрополь-Ростов-Астрахань-1» (13 образцов) и «Волгоград-Ростов-Ставрополь» (2 образца). Варианты вируса, циркулирующие в Ростовской области, относились к подгруппе «Волгоград-Ростов-Ставрополь» (6 образцов) и к подгруппе «Ставрополь-Ростов-Астрахань-1» (5 образцов). Один образец из Астраханской области образовал подгруппу «Астрахань-2», другой – вошел в подгруппу «Ставрополь-Ростов-Астрахань-1».

Анализ территориального распространения геновариантов вируса ККГЛ на юге России показал, что наблюдается перекрытие ареалов циркуляции генетических вариантов вируса. Представители подгруппы «Ставрополь-Ростов-Астрахань-1» имеют наиболее широкий ареал распространения и циркулируют на территории Ставропольского края, Астраханской области, а также в южной и юго-восточной части Ростовской области. Для территории Ставропольского края данный геновариант является преобладающим. Штаммы вируса подгруппы «Волгоград-Ростов-Ставрополь» встречаются преимущественно в Ростовской области, а также в северных и восточных районах Ставропольского края. Таким образом, на территории Ростовской области одновременно циркулируют и, приблизительно с равной частотой, встречаются геноварианты «Волгоград-Ростов-Ставрополь» и «Ставрополь-Ростов-Астрахань-1». Изоляты вируса ККГЛ, относящиеся к геноварианту «Астрахань-2», в настоящее время известны только для Астраханской области (Приволжский район), что свидетельствует о существовании на данной территории локального очага вируса ККГЛ, штаммы которого генетически отличаются от представителей основной популяции вируса.

Проведенные исследования позволяют сделать вывод о том, что в эпидсезон 2011 г. на территории Ставропольского края, Ростовской и Астраханской областей циркулировали штаммы вируса ККГЛ, типичные для данной территории, случаев заноса новых генетических вариантов вируса не наблюдалось.

В настоящее время популяция вируса ККГЛ, циркулирующего на юге России, остается стабильной, однако необходимы дальнейшие исследования, в частности, генетическая характеристика штаммов вируса из Республики Калмыкия и Дагестан.

# СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Василенко Н.Ф., Смоленский В.Ю., Волюнкина А.С., Варфоломеева Н.Г., Заикина И.Н., Малецкая О.В. и др. Особенности эпидемиологической обстановки по Крымской геморрагической лихорадке в Российской Федерации в 2011 г. Пробл. особо опасных инф. 2012; 1(111):22–5.
2. Волюнкина А.С., Карань Л.С., Василенко Н.Ф., Варфоломеева Н.Г. Генетическая идентификация вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, вызвавшего внутрибольничное заражение. Инфекция и иммунитет. 2012; 2(1–2):475–6.
3. Карань Л.С., Платонов А.Е., Смирнова С.Е., Вышемирский О.И., Журавлев В.И. и др. Генетические исследования при КГЛ: от диагностики до молекулярной эпидемиологии. В кн.: Арбовирусы и арбовирусные инфекции. М.: Гриф и К; 2007. С. 57–61.
4. Яшина Л.Н., Петров В.С., Вышемирский О.И., Аристова В.А., Москвина Т.М., Львов Д.К. Характеристика вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулирующего в России и республиках Средней Азии. Вopr. вирусол. 2002; 47(3):11–5.
5. Flick R. Molecular biology of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. In: Crimean-Congo hemorrhagic fever: a global perspective. Springer; 2007. P. 35–44.
6. Hewson R. Molecular epidemiology, genomics, and phylogeny of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. In: Crimean-Congo hemorrhagic fever: a global perspective. Springer; 2007. P. 45–55.
7. Mild M., Simon M., Albert J., Mirazimi A. Towards an

understanding of the migration of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. J. Gen. Virol. 2010; 91:199–207.

8. Yashina L., Vyshemirskii O., Seregin S., Petrova I., Samokhvalov E., Lvov D. et al. Genetic analysis of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in Russia. J. Clin. Microbiol. 2003; 41(2):860–2.

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

1. Vasilenko N.F., Smolensky V.Yu., Volynkina A.S., Varfolomeeva N.G., Zaikina I.N., Maletskaya O.V. et al. [Peculiar aspects of epidemiological situation on Crimean hemorrhagic fever in the Russian Federation in 2011]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2012; (111):22–5.
2. Volynkina A.S., Karan' L.S., Vasilenko N.F., Varfolomeeva N.G. [Genetic identification of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus that has caused hospital infection]. Infektsiya Immunitet. 2012; 2(1–2):475–6.
3. Karan' L.S., Platonov A.E., Smirnova S.E., Vyshemirsky O.I., Zhuravlev V.I. et al. [Genetic investigations at CHF: from diagnostics to molecular epidemiology]. In: [Arboviruses and Arboviral Infections]. M.: Grif i Co; 2007. P. 57–61.
4. Yashina L.N., Petrov V.S., Vyshemirsky O.I., Aristova V.A., Moskvina T.M., L'vov D.K. [Characterization of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus circulating in Russia and Central Asia republics]. Vopr. virusol. 2002; 47(3):11–5.

## Authors:

Volynkina A.S., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

## Об авторах:

Волюнкина А.С., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 11.10.12.

О.В.Грачиева, Г.А.Харченко, Д.Н.Рассказов, Р.А.Садретдинов

## ДИАГНОСТИКА МИКРОЦИРКУЛЯТОРНЫХ НАРУШЕНИЙ У ДЕТЕЙ С ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИЕЙ

ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия», Астрахань

Представлены результаты обследования методом лазерной доплеровской флоуметрии детей (43 – больных энтеровирусной инфекцией, 34 – Астраханской риккетсиозной лихорадкой и 40 – здоровых). По данным ЛДФ тестирования, проведена термопроба и амплитудно-частотный анализ показателей периферической микроциркуляции при инфекционных заболеваниях. Выявлены ранние изменения в микроциркуляторном русле у больных по типу микроангиопатий сосудов.

**Ключевые слова:** дети, Астраханская риккетсиозная лихорадка, энтеровирусная инфекция, лазерная доплеровская флоуметрия, микроциркуляция.

O.V.Grachieva, G.A.Kharchenko, D.N.Rasskazov, R.A.Sadretdinov

## Diagnostics of Microcirculatory Disorders in Children with Infectious Pathology

Astrakhan State Medical Academy, Astrakhan

Laser Doppler flowmetry method (LDF) was used to examine children (43 patients with enteroviral infection, 34 patients with Astrakhan rickettsial fever, and 40 healthy controls). In addition, in view of LDF survey data, carried out was thermal assay and amplitude-frequency analysis of peripheral microcirculation predictors. Detected were incipient changes in microvasculature relative to microangiopathy.

**Key words:** children, Astrakhan rickettsial fever, enteroviral infection, laser Doppler flowmetry, microcirculation.

В последние годы на территории Астраханской области существенно осложнилась эпидемиологическая ситуация по энтеровирусной инфекции (ЭВИ).

Восприимчивость к энтеровирусной инфекции особенно велика у детей дошкольного и школьного возраста (от 2 до 10 лет) и у молодых лиц. В общем количестве больных удельный вес детей составляет 80–90 %, достигая 50 % у детей младшего возраста. Среди заболевших серозным менингитом дети и подростки составляют 65–78 %. Пятнисто-папулезные высыпания отмечаются при инфекциях, вызванных вирусами ЕСНО-4, ЕСНО-11, ЕСНО-16 и ЕСНО-19 [7].

При Астраханской риккетсиозной лихорадке также выявляются обширные поражения кожи в виде острого продуктивного васкулита с вовлечением преимущественно мелких артерий, вен и капилляров, окруженных отеком и клетками воспаления с формированием инфильтративных «муфт», фибриноидного некроза стенок сосудов и тромбоза. Однако характер сосудистых нарушений и их роль в органной патологии при различных инфекционных болезнях изучены мало [5]. Ранние микроциркуляторные нарушения наблюдаются уже в самом начале формирования инфекционных васкулитов, и неинвазивные методы оценки этих изменений позволят на доклиническом уровне установить степень гемодинамических сдвигов, обосновать необходимость более детального обследования для раннего выявления сосудистых осложнений [6].

Учитывая ограничения в применении существующих методик, становится актуальным поиск новых информативных неинвазивных методов изучения сосудистой перфузии, к которым можно отнести высокотехнологичный метод изучения микроциркуляции (МЦ) – лазерную доплеровскую флоуметрию

(ЛДФ) [2].

Цель исследования – анализ амплитудно-частотного спектра и термопроб методом ЛДФ у детей, больных энтеровирусной инфекцией и Астраханской риккетсиозной лихорадкой до и после лечения.

## Материалы и методы

Обследованы 43 детей, больных энтеровирусной инфекцией (ЭВИ), и 34 – Астраханской риккетсиозной лихорадкой (АРЛ), в возрасте от 2 до 15 лет, находившихся на стационарном лечении в Астраханской областной инфекционной клинической больнице им. А.М.Ничоги за период 2009–2011 гг. Группу контроля составили 40 клинически здоровых детей без хронических кожных или соматических заболеваний в анамнезе. Состояние периферического кровотока оценивалось нами в четырех точках на поверхности кожи с помощью аппарата «ЛАКК-01» (НПП «ЛАЗМА», Москва), их выбор связан с тем, что в данных участках кожа бедна артерио-венозными анастомозами, исследуется кровоток в так называемых «нутритивных» микрососудах, он менее подвержен внешним воздействиям по сравнению с областями, богатыми анастомозами. Первая точка – на коже правого предплечья, вторая – на тыльной поверхности правой кисти, третья – в области нижней трети правой голени, четвертая – на коже тыла правой стопы. Для проведения термопробы была выбрана наружная поверхность нижней трети голени.

Различия величин показателей микроциркуляции в выбранных точках обусловлено, по-видимому, анатомической особенностью строения микроциркуляторного русла данных областей кожного покрова:

плотностью расположения микрососудов, их диаметром, интенсивностью МЦ, наличием артериоло-венулярных анастомозов, местным набором физиологически активных веществ [4].

В одном кожном локусе информация о регионарном кровотоке выводится в виде 9 абсолютных и 11 нормированных величин. В связи с этим сравнение данных с различных областей исследования проводилось по базисному показателю микроциркуляции (ПМ), характеризующему перфузию тканей в зондируемом участке. Важным компонентом осцилляций тканевого кровотока следует рассматривать пульсовые волны (CF), отличающиеся малой амплитудой колебаний флаксмоций и обусловленные перепадами внутрисосудистого давления, которые в большей или меньшей степени синхронизированы с кардиоритмом [1].

Нами проведен анализ колебаний перфузии, зарегистрированных в ЛДФ-грамме у детей, больных ЭВИ и АРЛ. Ритмическая структура флаксмоций – результат интегральной суперпозиции различных прямых (эндотелиальных, нейрогенных, миогенных) и опосредованных влияний на состояние микроциркуляторного русла (МЦР) [2]. В результате спектрального разложения доплерограммы на гармонические составляющие колебаний тканевого кровотока (при помощи вейвлет-анализа) появляется возможность дифференцирования различных ритмических составляющих флаксмоций, что важно для диагностики нарушений модуляций кровотока.

Колебания эндотелиальной природы регистрируются при записи более 10 мин, при меньшей по времени записи их регистрация недостоверна. В связи с этим в амплитудно-частотном спектре (АЧС) мы регистрировали лишь нейрогенные, миогенные, дыхательные и сердечные колебания и в дальнейшем анализировали лишь их, исключая эндотелиальную активность. Каждая ритмическая компонента при спектральном анализе ЛДФ-граммы характеризуется двумя параметрами: частотой (F) и амплитудой (A).

### Результаты и обсуждение

Проведенное исследование не выявило существенного изменения частот ритмических составляющих флаксмоций у больных обеих групп ЭВИ и АРЛ между собой и по сравнению с данными показателями в группе контроля. Частоты колебаний у больных, по данным амплитудно-частотного спектра, не изменялись и в процессе лечения. Данное утверждение касалось обеих областей тестирования ( $p > 0,05$ ). Частоты нейрогенных колебаний регистрировались в диапазоне 0,03–0,04 Гц, миогенных колебаний – 0,09–0,11 Гц, колебаний в области дыхательной волны – 0,31–0,32 Гц, кардиоколебаний – 0,83–0,92 Гц.

У больных зарегистрированы существенные изменения в амплитудно-частотном спектре ЛДФ-граммы. Значительное снижение амплитуды миогенных (AmaxM) и нейрогенных (AmaxH) колебаний свидетельствовало о подавлении механизма активной модуляции тканевого кровотока. Угнетение ак-

тивных регуляторных систем чаще всего, при условии сохранения компенсаторных способностей, сопровождалось возрастанием роли пассивной модуляции, что способствует разгрузке веноулярного звена микроциркуляторной системы. Именно в этой связи следует рассматривать общую тенденцию к возрастанию вклада респираторных и кардиочастотных ритмических составляющих в общий уровень флаксмоций. При этом у обеих групп больных максимальная величина дыхательных колебаний (AmaxD) в обоих кожных локусах превышала таковую в группе здоровых ( $p < 0,05$ ). Так, значения данного параметра составили в точке 3 на коже голени ( $0,19 \pm 0,04$ ) пф.ед. и ( $0,17 \pm 0,04$ ) пф.ед. у больных двух групп ЭВИ и АРЛ соответственно против ( $0,07 \pm 0,01$ ) пф.ед. в контроле. На коже правого предплечья в точке 1 максимальная величина дыхательных колебаний у больных ЭВИ и АРЛ первой и второй группы составила ( $0,25 \pm 0,050$  и ( $0,23 \pm 0,04$ ) пф.ед. соответственно против ( $0,16 \pm 0,02$ ) пф.ед. в группе контроля.

Амплитуда сердечных колебаний (AmaxC) в исследуемых группах больных ЭВИ и АРЛ недостоверно превышала таковую в группе контроля ( $p > 0,05$ ).

Учитывая высокий показатель микроциркуляции у больных ЭВИ и АРЛ и превышение амплитуды дыхательных колебаний (AmaxD) в данных группах больных в сравнении с группой контроля, можно говорить о наличии застойных явлений в венозном звене МЦР в обоих кожных локусах исследуемых пациентов. Амплитуда дыхательной волны в первой группе пациентов достоверно превышала значение данного показателя в контроле. Амплитуда сердечных волн изменялась незначительно в сторону уменьшения значений данного показателя в обеих кожных точках. Такое изменение характерно для больных как первой, так и второй групп. Достоверных отличий между собой во всех обследованных группах по AmaxC не отмечено. Значения амплитуд нейрогенных и миогенных колебаний у больных второй группы (АРЛ) имели ту же тенденцию к увеличению, что и в первой группе пациентов (ЭВИ), по сравнению с контролем, не достигая значений достоверности.

У больных обеих групп ЭВИ и АРЛ наблюдалась динамика показателей АЧС с возрастанием удельного веса активных регуляторных механизмов. Достоверное возрастание AmaxD в обеих группах пациентов свидетельствовало о перераспределении кровотока именно в пользу «нутритивных» путей модуля микроциркуляции, что обеспечивает большее снабжение тканей и клеток кислородом и питательными веществами. Снижение же показателей Ад и Ас можно расценивать как уменьшение ишемии тканей и несостоятельности веноулярного отдела МЦР и как свидетельство уменьшения застойных явлений в венозном звене [3].

Из-за разброса результатов измерений амплитуд колебаний осуществлять диагностику работы того или иного механизма регуляции по величинам амплитуд затруднительно. Целесообразно анализировать нормированные характеристики ритмов колебаний, т.е. определять вклад амплитуды колебаний опреде-

ленной группы ритмов относительно средней модуляции кровотока СКО. Такая нормировка позволяет исключить влияние нестандартных условий проведения исследований, так как увеличение или уменьшение амплитуды и флукса происходит в одну сторону.

Наиболее значимыми в результате обработки данных термопробы являлись: исходный уровень микроциркуляции, максимальный показатель микроциркуляции (ПМмах), прирост показателя микроциркуляции (ПМуувел), время от начала подъема показателя микроциркуляции до достижения его максимального уровня (Т2-Т4); время восстановления кровотока (Т4-Т6); резерв капиллярного кровотока (РКК), вычислявшийся по формуле  $M_{\max}/M_{\text{сисх}} \times 100\%$ .

При сравнении величин термопробы между группами больных АРЛ и ЭВИ отмечены более низкие величины, особенно показателя РКК, где у больных АРЛ он составил  $208,25 \pm 17,53$  против  $249,16 \pm 30,30$  у больных ЭВИ. Остальные показатели практически не отличались друг от друга, имея однонаправленную тенденцию к снижению по сравнению с контрольной группой.

В различных возрастных группах анализ реакции микроциркуляторного русла на термопробу установил, что в коже у больных АРЛ длительность интервала Т4-Т6 имела тенденцию к снижению с увеличением возраста. Причем разница между 1 и 2 возрастными группами была достоверной ( $p < 0,05$ ).

Выявлено, что в обеих группах больных как АРЛ, так и ЭВИ отмечалась однонаправленная тенденция к снижению большинства показателей термопробы с возрастом и преобладание интервала Т2-Т4 над Т4-Т6, что говорит о несостоятельности микроциркуляторного звена в 1-й группе детей дошкольного возраста и более зрелой микроциркуляторной системе детей более старшего, среднего и младшего школьного возраста. В группе больных с тяжелым течением заболевания отмечалась тенденция к снижению всех величин. Отмечено достоверное снижение величин РКК и интервала Т6-Т4, а также величины ПМуувел, что свидетельствует о разнонаправленных нарушениях микроциркуляторного русла наиболее выраженных у больных с тяжелым течением, медленным восстановлением показателей микроциркуляции у больных, особенно РКК.

При сравнении показателей 1-й и 2-й групп больных ЭВИ и АРЛ между собой наиболее низкие величины отмечены у больных АРЛ, особенно с тяжелым течением. У больных ЭВИ с тяжелым течением наблюдалась тенденция к снижению всех величин термопробы.

Повышение показателя М обусловлено более интенсивным функционированием механизмов активного контроля микроциркуляции. В то же время чрезмерно высокая колеблемость потока эритроцитов свидетельствует о патологических процессах в микроциркуляторном русле. В наших исследованиях высокий уровень показателя М указывает на то, что в группе больных детей как ЭВИ, так и АРЛ преобладает спазм микрососудов.

Таким образом, показано, что у больных АРЛ и ЭВИ после лечения, несмотря на положительную динамику клинических симптомов, сохраняются достаточно выраженные изменения показателей базальной перфузии тканей кровью (ПМ и СКО) во всех точках. Это свидетельствует о существовании скрытых нарушений микроциркуляторного русла у больных при выписке из стационара, даже при положительной клинической симптоматике в период ранней реконвалесценции, для разрешения которых требуется определенное время. Возникновение подобных изменений в микроциркуляторном русле у больных может быть связано с длительной риккетсимией, появлением осложнений со стороны сосудистого звена. Полученные данные доказывают наличие нарушений в микроциркуляторном русле у больных в период ранней реконвалесценции, что свидетельствует о начальном этапе формирования осложнений со стороны сосудистого звена с возможной трансформацией в хроническую патологию.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Козлов В.И., Морозов М.В., Ибрагим Р.Х., Станишевская Т.И. Биоритмические составляющие ЛДФ-сигнала и их значение в оценке состояния микроциркуляции. *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2004; 10(3):63.
2. Козлов В.И., Корси Л.В., Соколов В.Г. Лазерная доплеровская флоуметрия и анализ коллективных процессов в системе микроциркуляции. *Физиология человека*. 1998; 24(6):112–21.
3. Манухина Е.Б., Малышев И.И., Архипенко И.В. Оксид азота в сердечно-сосудистой системе: роль в адаптационной защите. *Вестник РАМН*. 2000; 4:16–21.
4. Позин А.А., Коршунов Н.И. Неинвазивная диагностика поражения периферических сосудов у больных сахарным диабетом. *Клиническая медицина*. 1991; 69(2): 53–5.
5. Сорокина М.Н., Скрипченко Н.В. Вирусные энцефалиты и менингиты у детей: руководство для врачей. М.: Медицина; 2004. 416 с.
6. Шор Н.А., Тютюнник А.А. Значение показателей микроциркуляции для оценки результатов восстановительных операций у больных с хронической критической ишемией нижних конечностей. *Ангиология и сосудистая хирургия*. 2004; 10(3):24–5.
7. Эмонд Р., Роуланд Х., Уэлси Ф. Инфекционные болезни. Пер. с англ. М.: Mosby-Wolfe-Практика; 1998. 439 с.

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

1. Kozlov V.I., Morozov M.V., Ibragim R.Kh., Stanishevskaya T.I. [Biorhythmic predictors of LDF-signal and their role in assessment of microcirculation conditions]. *Angiol. Sosudistaya Khirurgiya*. 2004; 10(3):63.
2. Kozlov V.I., Korsi L.V., Sokolov V.G. [Laser Doppler flowmetry and analysis of cooperative processes within microcirculation system]. *Fiziologiya Cheloveka*. 1998; 24(6):112–21.
3. Manukhina E.B., Malyshev I.I., Arkhipenko I.V. [Nitric oxide in cardio-vascular system: its role in adaptation protection]. *RAMS Bull.* 2000; 4:16–21.
4. Pozin A.A., Korshunov N.I. [Non-invasive diagnostics of peripheral vessel lesion in patients with diabetes]. *Klinicheskaya Meditsina*. 1991; 69(2):53–5.
5. Sorokina M.N., Skripchenko N.V. [Viral Encephalitis and Meningitis in Children: Practice Guidelines for Physicians]. М.: Meditsina; 2004. 416 p.
6. Shor N.A., Tyutyunnik A.A. [Significance of microcirculation factors for the assessment of results of reparative operations in patients with chronic critical lower limb ischemia]. *Angiol. Sosudistaya Khirurgiya*. 2004; 10(3):24–5.
7. Emond R., Rowland H., Welsby F. [Color Atlas of Infectious Diseases. 3rd edition. Mosby-Wolfe Publisher]. Translated from English. М.: Praktika; 1998. 439 p.

#### Authors:

Gracheva O.V., Kharchenko G.A., Rasskazov D.N., Sadretidinov R.A. Astrakhan State Medical Academy. 121, Bakinskaya St., Astrakhan, 41400, Russia. E-mail: olgadybal78@mail.ru

#### Об авторах:

Грачева О.В., Харченко Г.А., Рассказов Д.Н., Садретдинов Р.А. Астраханская государственная медицинская академия. 41400, Астрахань, ул. Бакинская, д. 121. E-mail: olgadybal78@mail.ru

Поступила 10.11.12.

Е.В.Найденова, Н.А.Осина, В.Е.Куклев, Ю.И.Яшечкин, Т.В.Бугоркова, И.В.Шульгина,  
О.А.Лобовикова, С.А.Щербакова, В.В.Кутырев

## ВНЕДРЕНИЕ В ПРАКТИКУ НОВЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ГЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ЛИХОРАДКИ ДЕНГЕ И ХОЛЕРЫ

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

Представлена информация о проведении этапов государственной регистрации препаратов для генной диагностики лихорадки денге и холеры нового поколения, основанных на принципе многофакторного анализа и позволяющих не только выявлять патоген, но и проводить его ускоренную идентификацию по эпидемической значимости и таксономическому положению.

**Ключевые слова:** лихорадка денге, холера, генная диагностика, мультилокусная ПЦР, многофакторный анализ.

E.V.Naidenova, N.A.Osina, V.E.Kouklev, Yu.I.Yashechkin, T.V.Bugorkova, I.V.Shul'gina, O.A.Lobovikova,  
S.A.Shcherbakova, V.V.Kutyrev

## Introduction of New Preparations for Gene Diagnostics of Dengue Fever and Cholera

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Presented is the information on technical and medical trials of new generation preparations for gene diagnostics of Dengue fever and cholera, based on the multiple factor analysis. Application of these preparations makes it possible not only to detect pathogen but also to carry out its expedited identification in accordance with epidemiological significance and taxonomic status.

**Key words:** Dengue fever, cholera, gene diagnostics, multilocus PCR, multiple factor analysis.

Ежегодно из неблагополучных по холере и лихорадке денге стран на территорию Российской Федерации прибывает более 1 млн человек и регистрируются завозные случаи этих инфекций [1, 2]. В связи с этим остается актуальной задача по разработке качественно новых препаратов для генной диагностики данных инфекционных болезней, позволяющих быстро (в течение 2–3 ч), с высокой чувствительностью и специфичностью осуществлять не только детекцию патогенов, но и их ускоренную идентификацию по эпидемической значимости и таксономическому положению. Один из наиболее перспективных способов решения поставленной задачи – разработка генодиагностических препаратов, основанных на принципе многофакторного анализа [5].

До последнего времени в нашей стране отсутствовали зарегистрированные наборы реагентов для выявления РНК вирусов Денге и ДНК холерных вибрионов с одновременным определением таксономического положения возбудителей: субтипы I–IV вируса Денге и принадлежность к O1, O139 серогруппам, биовару возбудителя холеры, и их эпидемической значимости методом ПЦР с электрофоретическим учетом результатов. В то же время разработаны и подготовлены экспериментальные серии двух генодиагностических препаратов, позволяющих успешно осуществить индикацию и ускоренную идентификацию возбудителей лихорадки денге и холеры: «Набор реагентов для выявления и ускоренной идентификации ДНК *Vibrio cholerae* методом мультилокусной полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов (Ген *Vibrio*

*cholerae* – идентификация – РЭФ)», «Набор реагентов для выявления РНК вирусов Денге (I–IV типов) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов (Ген Денге – РЭФ)».

Неотъемлемой частью процесса внедрения новых диагностических препаратов в практику здравоохранения является их государственная регистрация по установленной схеме.

Целью работы являлись подготовка и осуществление технических и медицинских испытаний новых препаратов для генной диагностики лихорадки Денге и холеры.

## Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали экспериментальные серии наборов реагентов «Ген *Vibrio cholerae* – идентификация – РЭФ» и «Ген Денге – РЭФ» (серии 01 и 02, дата изготовления 06.2011 г., срок годности – 12.2011 г.), бактериальные суспензии чистых культур возбудителя холеры и гетерологичных микроорганизмов (166 проб), пробы биологического материала и объектов окружающей среды, искусственно инфицированных холерными вибрионами и гетерологичными микроорганизмами (129 проб), препараты кДНК штаммов вирусов Денге I–IV типов и гетерологичных вирусов, относящихся к семействам *Flaviviridae* и *Bunyaviridae* (8 проб), пробы биологического материала, искусственно инфицированные кДНК штаммов вирусов Денге I–IV типов (41 проба).

Штаммы *V. cholerae* (27 изолятов), *Vibrio parahaemolyticus* (2), *Escherichia coli* (3), *Shigella flexneri* (3), *Aeromonas spp.* (1), *Pseudomonas aeruginosa* (1), *Proteus vulgaris* (2) получены из Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» (ГКПБ «М») ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», государственной коллекции ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии», коллекции живых культур ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока». Панель кДНК вирусов Денге I–IV типа (4 изолята) и гетерологичных вирусов (4) получена в ГБУН «НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского».

Для проведения работ применяли нормативно-методические документы для каждого набора реагентов: ТУ 9398-033-01898109-2011 («Ген Денге – РЭФ»), ТУ 9398-039-01898109-2011 («Ген *Vibrio cholerae* – идентификация – РЭФ»), инструкцию по применению.

Подготовку проб и проведение исследований осуществляли в соответствии с инструкциями по применению и ТУ. Характеристика штаммов и искусственно инфицированных проб, использованных для контроля, будет представлена ниже. Амплификацию проводили на программируемом амплификаторе «Терцик».

### Результаты и обсуждение

Технические испытания проводили на базе лаборатории молекулярной диагностики ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» в соответствии с техническими условиями и инструкциями по применению. Для контроля набора реагентов «Ген Денге – РЭФ» подготовлены СОП: СОП К+ Денге I (NS3), СОП К+ Денге II (NS), СОП К+ Денге III (NS3), СОП К+ Денге IV (NS3), СОП К+ Денге I (NS5), СОП К+ Денге II (NS5), СОП К+ Денге III (NS5), СОП К+ Денге IV (NS5), представляющие разведение плазмидной ДНК, выделенной из рекомбинантных штаммов *Escherichia coli*, несущих в составе плазмиды фрагменты NS3 и NS5 локусов вирусов Денге I–IV типа. Штаммы для получения обозначенных выше СОП депонированы в ГКПБ «М» ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб» (всего 8 культур). Для контроля набора реагентов «Ген *Vibrio cholerae* – идентификация – РЭФ» предусмотрено использование бактериальных суспензий штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы классического и эльтор биоваров, O139 и неO1/неO139 серогрупп с различным набором маркеров эпидемической значимости: *ctxA* и *tcpA* генов: *Vibrio cholerae* O1 биовар *cholerae* 569B, *Vibrio cholerae* O1 биовар *eltor* M-1298 (*ctxA*+*tcpA*+), *Vibrio cholerae* O1 биовар *eltor* KM-26 (*ctxA*- *tcpA*-), *Vibrio cholerae* O139 P-16064 (*ctxA*+ *tcpA*+), *Vibrio cholerae* O139 M-377 (*ctxA*- *tcpA*-), *Vibrio cholerae* не-O1 не-O139 P-9741 (*ctxA*- *tcpA*-), *E. coli* 12226 O-55, *Vibrio parahaemolyticus* 764. Полученные рекомбинантные

штаммы *E. coli* и природные культуры холерных вибрионов и гетерологичных микроорганизмов, представленные выше, позволяют в полной мере охарактеризовать чувствительность и специфичность контролируемых наборов реагентов. По результатам технических испытаний диагностические препараты «Ген *Vibrio cholerae* – идентификация – РЭФ» и «Ген Денге – РЭФ» соответствуют требованиям технических условий.

Медицинские испытания набора «Ген Денге – РЭФ» проводили на базе лаборатории вирусологии ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» и кафедры клинической лабораторной диагностики Российской медицинской академии последиplomного образования. Для определения специфичности препарата исследовали кДНК штаммов вирусов Денге I–IV типов и гетерологичных вирусов. Установлено, что положительный ответ зарегистрирован только в случае анализа проб, содержащих кДНК вируса Денге I–IV типа, при этом отмечено полное соответствие размера образовавшихся ампликонов и типа, к которому относился вирус Денге. Дополнительно изучали пробы биологического материала (суспензия комаров, кровь доноров), искусственно инфицированные кДНК вирусов Денге I–IV типов и гетерологичных микроорганизмов. Наличие специфичной амплификации наблюдали только при исследовании проб, содержащих кДНК возбудителя. Чувствительность набора реагентов «Ген Денге – РЭФ» была оценена на основании изучения разведений плазмидной ДНК рекомбинантных штаммов *E. coli*, содержащих фрагменты генома вирусов Денге I–IV типов, соответствующие  $1 \cdot 10^6$  –  $1 \cdot 10^3$  ГЭ вирусных частиц в мл. Установлено, что в 100 % случаев вне зависимости от типа вируса Денге положительный ответ в ПЦР регистрировался при наличии в пробе  $1 \cdot 10^4$  ГЭ в 1 мл.

Таким образом, по результатам технических и медицинских испытаний набор реагентов «Ген Денге – РЭФ» характеризуется следующими показателями: чувствительность –  $1 \cdot 10^4$  ГЭ/мл; специфичность – 100 %; воспроизводимость – 100 %.

Медицинские испытания набора реагентов «Ген *Vibrio cholerae* – идентификация – РЭФ» проходили на базе ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» (лаборатория холеры) и ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» (отдел особо опасных инфекций).

Для определения чувствительности и специфичности препарата исследовали бактериальные суспензии холерных вибрионов и гетерологичных микроорганизмов с концентрацией  $1 \cdot 10^4$  –  $1 \cdot 10^2$  м.к./мл. Для анализа были выбраны эпидемически опасные и эпидемически безопасные штаммы *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп, а также неO1/неO139 серогрупп классического и эльтор биоваров. Установлено, что в 100 % случаев положительный ответ в ПЦР регистрировался при исследовании проб, содержащих

$1 \cdot 10^4$  м.к./мл вибрионов. При этом в полной мере удавалось не только детектировать патоген, но и провести его ускоренную идентификацию по эпидемической значимости и таксономическому положению. При наличии в пробах  $1 \cdot 10^3$  м.к./мл патогенов специфичная многофакторная амплификация отмечена в 95,65 % образцов,  $1 \cdot 10^2$  м.к./мл – 50 %. При исследовании проб, содержащих гетерологичные микроорганизмы, в ПЦР во всех случаях зафиксирован отрицательный результат.

Дополнительно определена чувствительность и специфичность набора реагентов «Ген *Vibrio cholerae* – идентификация – РЭФ» при исследовании проб биологического материала (испражнения, желчь, ректальные мазки) и объектов окружающей среды (питьевая вода, смывы с поверхностей, пищевые продукты), искусственно инфицированные холерными вибрионами и гетерологичными микроорганизмами. Для контаминации образцов использовали эпидемически опасные и безопасные штаммы *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп. Установлено, что чувствительность препарата при исследовании проб, содержащих  $1 \cdot 10^4$  м.к./мл вибрионов, вне зависимости от вида исследуемого материала и эпидемической значимости патогена составила 100 %. Штаммы холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп (ctxA+ tcpA+) в концентрации  $1 \cdot 10^3$  м.к./мл выявлены в пробах биологического материала и объектов окружающей среды в 100 и 87,5 % случаев соответственно. При исследовании образцов, содержащих  $1 \cdot 10^3$  м.к./мл культур холерных вибрионов (ctxA- tcpA-), положительный ответ в ПЦР зафиксирован в 93,7 % (клинический материал) и 91,6 % (объекты окружающей среды). Полученные результаты указывают на высокую эффективность испытуемого набора реагентов как при выявлении этиологических агентов холеры (*V. cholerae* O1, O139 (ctxA+tcpA+)), так и эпидемически безопасных штаммов холерных вибрионов разных серогрупп, которые могут вызывать локальные и спорадические случаи заболевания у людей [3, 4].

Таким образом, результаты технических и медицинских испытаний свидетельствуют о том, что наборы реагентов «Ген Денге – РЭФ» и «Ген *Vibrio cholerae* – идентификация – РЭФ» характеризуются высокой чувствительностью –  $1 \cdot 10^4$  ГЭ/мл или м.к./мл соответственно, специфичностью – 100 %,

воспроизводимостью – 100 % и могут быть рекомендованы для серийного производства с целью практического использования при мониторинге холеры и лихорадки денге.

Разработанные препараты зарегистрированы в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения и социального развития: «Ген Денге – РЭФ» – регистрационное удостоверение ФСР 2012/13441 от 21.05.2012 г., «Ген *Vibrio cholerae* – идентификация – РЭФ» – регистрационное удостоверение ФСР 2012/13430 от 21.05.2012 г.

Работа проведена в рамках выполнения Распоряжения Правительства Российской Федерации № 1426-р от 02.10.2009 г.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ларичев В.Ф., Сайфуллин М.А., Акиншина Ю.А., Хуторецкая Н.В., Бутенко А.М. Завозные случаи арбовирусных инфекций в Российской Федерации. Эпидемиол. и инф. бол. 2012; 1:35–39.
2. Москвитина Э.А., Мазрухо А.Б., Адаменко О.Л., Кругликов В.Д., Назаретян А.А. Холера в период седьмой пандемии: особенности эпидемиологии и профилактики. Холера и патогенные для человека вибрионы. 2012; 25:17–22.
3. Blake P.A., Weaver R.W., Hollins D.G. Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios. Annu. Rev. Microbiol. 1980; 34:341–367.
4. Theophilo G.N., Rodrigues D.P., Leal N.C., Hofer E. Distribution of virulence markers in clinical and environmental *Vibrio cholerae* non-O1/ non-O139 strains isolated in Brazil from 1991 to 2000. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 2006; 48:65–70.
5. WHO. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control; WHO: Geneva, Switzerland, 2009. 160 p

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

1. Larichev V.F., Saifullin M.A., Akinshina Yu.A., Khutoretskaya N.V., Butenko A.M. [Imported cases of arbovirus infections in the territory of the Russian Federation]. Epidemiol. Infek. Bol. 2012; 1:35–9.
2. Moskvitina E.A., Mazrukho A.B., Adamenko O.L., Kruglikov V.D., Nazaretyan A.A. [Cholera during the period of the seventh pandemic: peculiarities of its epidemiology and prophylaxis]. Kholera i Patogen. dlya Cheloveka Vibriony. 2012; 25:17–22.

#### Authors:

Naidenova E.V., Osina N.A., Kouklev V.E., Yashechkin Yu.I., Bugorkova T.V., Shul'gina I.V., Lobovikova O.A., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Найденова Е.В., Осина Н.А., Куклев В.Е., Яшечкин Ю.И., Бугоркова Т.В., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 30.10.12.

Л.В.Саяпина<sup>1</sup>, А.С.Абдрашитова<sup>2</sup>, Р.Н.Лобач<sup>3</sup>, А.В.Комратов<sup>1</sup>, А.Н.Малахаева<sup>2</sup>, О.Ю.Ляшова<sup>2</sup>,  
Т.В.Валова<sup>2</sup>, М.В.Храмов<sup>4</sup>, Н.Г.Гефан<sup>5</sup>

## ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ СИБИРЕЯЗВЕННЫХ ВЕГЕТАТИВНЫХ АДсорБИРОВАННЫХ ПО ДАННЫМ МЕДИЦИНСКИХ ИСПЫТАНИИ

<sup>1</sup>ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», Москва,

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

<sup>3</sup>ФГКУ «294-й Центр по проведению спасательных операций особого риска» МЧС России, Москва;

<sup>4</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk;

<sup>5</sup>ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и ДВ», Иркутск

Изучена диагностическая эффективность (специфическая активность, чувствительность, специфичность, воспроизводимость) иммуноглобулинов флуоресцирующих сибиреязвенных вегетативных. На основании данных, полученных в медицинских исследованиях, препарат рекомендован к регистрации в Российской Федерации в качестве изделия медицинского назначения.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, *Bacillus spp.*, иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие вегетативные сибиреязвенные, диагностическая эффективность.

L.V.Sayapina<sup>1</sup>, A.S.Abdrashitova<sup>2</sup>, R.N.Lobach<sup>3</sup>, A.V.Komratov<sup>1</sup>, A.N.Malakhaeva<sup>2</sup>, O.Yu.Lyashova<sup>2</sup>,  
T.V.Valova<sup>2</sup>, M.V.Khramov<sup>4</sup>, N.G.Gefan<sup>5</sup>

## Diagnostic Efficiency of Adsorbed Anthrax Vegetative Fluorescent Immunoglobulins Demonstrated in the Medical Trials

<sup>1</sup>Scientific Center for Expertise of Medical Products, Moscow; <sup>2</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov; <sup>3</sup>294<sup>th</sup> Center for Carrying out Rescue Operations of Extra Risk, Moscow; <sup>4</sup>State Scientific Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk; <sup>5</sup>Irkutsk Research Anti-Plague Institute, Irkutsk

Studied is the diagnostic efficiency (specific activity, sensitivity, specificity, reproducibility) of anthrax vegetative fluorescent immunoglobulins. Based on the data, received in medical trials, this preparation is recommended for registration as a product for medical application in the Russian Federation.

Key words: *Bacillus anthracis*, *Bacillus spp.*, anthrax vegetative fluorescent diagnostic immunoglobulins, diagnostic efficiency.

Сибирская язва – инфекционная болезнь животных и человека, которая, возникнув в какой-либо местности, может сохраняться на многие десятилетия и вызывать повторные вспышки [13]. На территории России за период с 1900 по 2010 год зарегистрировано более 35 тыс. стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов и более 70 тыс. вспышек инфекции. На протяжении последних 5 лет заболеваемость остается на высоком уровне и не имеет тенденции к снижению [4, 6]. Анализ заболеваемости сибирской язвой людей, проведенный А.Г.Рязановой и соавт. [8], позволяет прогнозировать сохранение заболеваемости на территории Российской Федерации в среднем до 10 случаев в год.

Лабораторными критериями установления диагноза сибирской язвы являются положительные результаты в ПЦР, МФА, иммуносерологических методах, выделение и идентификация культуры сибиреязвенного микроба бактериологическим методом [7, 9]. Несмотря на постоянное усовершенствование лабораторной диагностики сибирской язвы, эта проблема до сих пор в достаточной мере не решена [3, 6]. Одной из основных причин является недостаточное обеспечение лабораторных служб зарегистрированными

препаратами. В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что важную роль в лабораторной диагностике сибирской язвы играет ПЦР-анализ [1, 5, 10, 13]. Особое значение метод приобретает при подтверждении заболевания, когда выделение культуры затруднено.

Метод флуоресцирующих антител (МФА) также относится к основным методам индикации, так как является достаточно информативным, обеспечивающим быстрое и достоверное обнаружение возбудителя сибирской язвы на этапах ранней диагностики. Предварительное заключение с использованием данного метода может быть дано через 3–5 ч после поступления материала.

Положительные результаты, полученные с помощью МФА, позволяют сделать предварительный вывод о наличии возбудителя сибирской язвы или его антигенов в исследуемом биологическом материале или объектах внешней среды и своевременно начать проведение противоэпидемиологических, профилактических и терапевтических мероприятий.

До настоящего времени зарегистрированные препараты для выявления возбудителя сибирской язвы в объектах окружающей среды и биологи-

ческом материале методом МФА отсутствовали. Учитывая вышеизложенное, в Ставропольском научно-исследовательском противочумном институте разработаны иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибиреязвенные вегетативные адсорбированные сухие, представляющие собой иммуноглобулиновую фракцию к водорастворимому антигену вегетативной формы *Bacillus anthracis*, выделенную из гипериммунной кроличьей сыворотки, адсорбированную на основе магноиммосорбентов водорастворимыми антигенами штаммов *B. cereus* 8, *B. cereus* 104, *B. cereus* 111, *B. cereus* 250. Иммуноглобулины предназначены для обнаружения вегетативной формы *B. anthracis* в реакции иммунофлуоресценции (РИФ) в мазках из чистых культур, объектах окружающей среды (почва, подстилка, вода, продовольственное сырье, фураж) и биологического материала.

Основная цель работы – определение диагностической эффективности (специфическая активность, чувствительность, специфичность, воспроизводимость) иммуноглобулинов для решения вопроса о целесообразности их регистрации в качестве изделий медицинского назначения в Российской Федерации.

Предварительно в ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича была проведена оценка качества трех лабораторных серий препарата на соответствие требованиям проекта технических условий (ТУ) и подготовлен протокол медицинских испытаний. Ученым советом ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича (протокол № 6 от 27 апреля 2010 г.) принято решение о проведении медицинских исследований иммуноглобулинов на четырех базах (лаборатории препаратов против чумы и других особо опасных инфекций ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», ФКУЗ ИркутскНИПЧИ Сибири и Дальнего Востока и ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболensk).

### Материалы и методы

В работе была изучена экспериментальная серия иммуноглобулинов № 1–08 в течение срока ее годности. В связи с тем, что отсутствует препарат сравнения, в качестве сравнения применяли широко используемый бактериологический тест на гемолиз. Материалами для исследования служили чистые культуры *Bacillus anthracis* и других видов *Bacillus*, которые были подобраны в ГКПБ «М» РосНИПЧИ «Микроб». Исследование проб объектов окружающей среды (вода, почва) проведены на базе ФКУЗ ИркутскНИПЧИ Сибири и Дальнего Востока; пробы объектов окружающей среды (смывы с объектов внешней среды, корма) и биологического материала (мясо от животного) – на базе ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболensk). Каждый опыт проводили с соблюдением принципов строго контролируемого эксперимента в соответствии с протоколом медицинских исследований препарата. Используемые в работе штаммы были зашифрованы сотрудниками, не принимающими уча-

ствия в приготовлении мазков и учете результатов.

Всего исследовано 47 штаммов *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. anthracoides*, 225 проб объектов внешней среды (вода, почва, смывы с объектов внешней среды, корма) и биологического материала (мясо), искусственно инфицированных *B. anthracis* в концентрациях  $1 \cdot 10^6$ ,  $1 \cdot 10^7$ ,  $1 \cdot 10^8$  м.к./мл и гетерологичными микроорганизмами (*B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracoides*) в концентрации  $1 \cdot 10^8$  м.к./мл. Все штаммы были типичными по культурально-морфологическим, биохимическим и генетическим свойствам.

Учитывая назначение сибиреязвенных иммуноглобулинов, особое внимание уделялось подготовке проб из объектов окружающей среды, почвы, фуража и мяса для получения вегетативной формы сибиреязвенного микроба.

Препарат изучали по физико-химическим свойствам; определению рабочего разведения (наибольшее разведение препарата, при котором возможно достоверное обнаружение возбудителя); чувствительности (способность препарата в рабочем разведении выявлять в исследуемых пробах чистых культур минимальные концентрации *B. anthracis*); специфической активности (процент правильно идентифицированных штаммов *B. anthracis* и выявленных положительных проб объектов окружающей среды и биологического материала к числу инфицированных); специфичности (процент отрицательных результатов при исследовании проб, инфицированных гетерологичными микроорганизмами); воспроизводимости (процент совпадений результатов исследования положительных и отрицательных проб); продолжительности анализа в часах.

Микроскопию мазков осуществляли с помощью люминесцентного микроскопа «Carl Zeiss Primo Star» под иммерсионным объективом, применяя иммерсионное не флуоресцирующее масло.

Результаты оценивали по 4-крестовой системе: 4 креста – сверкающая флуоресценция зеленовато-желтого цвета оболочки микробной клетки, четко контрастирующая с темным телом клетки; 3 креста – яркая флуоресценция зеленовато-желтого цвета оболочки микробной клетки; 2 креста или 1 крест – слабое свечение всей клетки. Специфическим считали свечение с яркостью на 4 или 3 креста (при просмотре 30 и более полей зрения), свечение с яркостью 2 или 1 крест считали неспецифическим и не учитывали.

При постановке теста на гемолиз (метод сравнения) исследуемые культуры высевали бактериологической петлей секторами на чашки Петри с агаром Хоттингера (рН  $7,1 \pm 0,1$ ) с 5 % дефибрированной крови барана и инкубировали в термостате при температуре  $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$  в течение  $(20 \pm 2)$  ч, после чего учитывали результат. Сибиреязвенный микроб не должен лизировать эритроциты барана в отличие от большинства родственных спорообразующих сапро-

фитов, образующих широкую зону гемолиза вокруг выросших колоний.

### Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что испытуемый препарат представляет собой аморфную пористую массу желто-оранжевого цвета, после растворения в 0,5 мл дистиллированной воды в течение 1 мин – прозрачная опалесцирующая жидкость желто-оранжевого цвета, pH растворенного препарата – 8,0 (норма от 7,5 до 8,5).

Согласно паспортным данным иммуноглобулины выявляли штаммы сибиреязвенного микроба в рабочем разведении 1:128. Специфическую активность иммуноглобулинов определяли при просмотре мазков, приготовленных из 16 штаммов *B. anthracis* в концентрации  $1,0 \cdot 10^8$  м.к./мл и окрашенных препаратом в разведениях от 1:8 до 1:256. Было установлено, что препарат в рабочем разведении 1:128 выявлял только 62,5 % исследуемых штаммов сибиреязвенного микроба. Поэтому за рабочее разведение опытных иммуноглобулинов было принято разведение 1:64, о чем свидетельствовало яркое зеленовато-желтое свечение интенсивностью на 3–4 креста у 93,8 % исследованных штаммов *B. anthracis*. Полученные данные соответствуют требованиям проекта нормативной документации, так как препарат в рабочем разведении не менее 1:16 должен вызывать специфическое свечение вегетативной формы сибиреязвенного микроба в концентрации  $1,0 \cdot 10^8$  м.к./мл с интенсивностью на 3–4 креста.

Определение чувствительности препарата по способности выявлять в рабочем разведении минимальные концентрации сибиреязвенного микроба в мазках, приготовленных из взвесей чистых культур 5 штаммов *B. anthracis* с концентрациями от  $1 \cdot 10^4$  до  $1 \cdot 10^8$  м.к./мл, позволило выявить высокую чувствительность испытуемого препарата. При просмотре 30 полей зрения в мазках наблюдали специфическое свечение с интенсивностью на 3–4 креста 1–2 и более микробных клеток *B. anthracis* в концентрации  $5,0 \cdot 10^5$  м.к./мл. В тесте на гемолиз (метод сравнения) чистые культуры штаммов *B. anthracis* были правильно идентифицированы в 100 % случаев. Все исследуемые штаммы *B. anthracis* не лизировали эритроциты барана.

Специфичность новых иммуноглобулинов изучали на 32 близкородственных и гетерологичных штаммах микроорганизмов. В результате проведенных испытаний зарегистрировано специфическое свечение на 3 креста 8 штаммов других видов *Bacillus*, окрашенных сибиреязвенными иммуноглобулинами в рабочем разведении 1:64. В общей сложности неспецифические реакции были обнаружены в 25 % случаев, что составляет достаточно высокий процент. Невысокую специфичность препарата (75 %) можно объяснить генетическим родством (до 90 % гомологии) сибиреязвенного микроорганизма с

другими видами рода *Bacillus* [11]. Анализ 5000 хромосомных генов сибиреязвенного микроба выявил лишь 150 отличий между ними и генами *B. cereus* и *B. thuringiensis*. При высеве всех гетерологичных штаммов на агаре Хоттингера с кровью барана вокруг выросших колоний отмечалась зона гемолиза.

Воспроизводимость совпадения положительных и отрицательных результатов с помощью исследуемых иммуноглобулинов составила 100 %. Исследования, проведенные в 10 повторностях, при постановке анализа в разные дни и разными исполнителями показали, что во всех определениях со штаммом *B. anthracis* получены совпадающие положительные результаты, во всех случаях со штаммом *B. cereus* – отрицательные результаты.

Продолжительность анализа при исследовании чистых культур с помощью иммуноглобулинов составила 2,5–3 ч и  $(20 \pm 2)$  ч при исследовании объектов окружающей среды и биологического материала. Показано, что положительный ответ при исследовании чистых культур методом гемолиза можно выдать через 20 ч и через 40 ч при исследовании проб объектов окружающей среды и биологического материала. Несомненно, по срокам получения заключения при исследовании подозрительного материала с помощью сибиреязвенных иммуноглобулинов метод МФА имеет преимущество перед бактериологическим методом.

Анализ результатов исследований, проведенных на базе ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболensk), проб объектов окружающей среды (смывы с объектов внешней среды, корма) и биологического материала (мясо), искусственно инфицированных *B. anthracis*, показал, что сибиреязвенный микроб с помощью испытуемых иммуноглобулинов обнаружен в 100 % случаев. В разведении 1:128 иммуноглобулины вызывали специфическое свечение сибиреязвенного микроба в мазках интенсивностью на 3–4 креста. Чувствительность препарата составила  $1,0 \cdot 10^6$  м.к./мл. Отмечена высокая специфичность препарата, так как со всеми гетерологичными штаммами были получены отрицательные результаты. На базе ФКУЗ ИркутскНИПЧИ Сибири и Дальнего Востока при испытании иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих во время исследования проб объектов окружающей среды (вода, почва), искусственно инфицированных *B. anthracis*, также подтверждена высокая диагностическая эффективность испытуемого препарата. В разведении 1:128 препарат выявлял *B. anthracis* в минимальной концентрации  $1,0 \cdot 10^6$  спор/мл в 100 % случаев.

Сводные данные о результатах изучения диагностической эффективности иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих сибиреязвенных вегетативных адсорбированных сухих представлены в таблице.

Полученные данные позволили внести изменения в проект нормативной документации, касающиеся уточнения названия, состава и назначения

Сводные данные испытаний диагностической эффективности иммуноглобулинов флуоресцирующих сибирезвездных вегетативных адсорбированных сухих

| Показатели                                                                                                     | Количество проб | Результаты исследований                                                                                                    |                                                                                                                         |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                |                 | иммуноглобулины сибирезвездные вегетативные                                                                                | тест на гемолиз                                                                                                         |
| Минимальное количество микроорганизмов <i>B. anthracis</i> , выявляемое в МФА, м.к./мл                         | 5               | $5,0 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$                                                                                            | -                                                                                                                       |
| Процент (Р±р) – правильно идентифицированных штаммов <i>B. anthracis</i>                                       | 16              | 1:64–93,8                                                                                                                  | 100                                                                                                                     |
| Процент (Р±р) отрицательных результатов с гетерологичными микроорганизмами                                     | 32              | 1:64–75                                                                                                                    | 100                                                                                                                     |
| Процент (Р±р) выявляемых штаммов <i>B. anthracis</i> в пробах объектов окружающей среды                        | 225             | 100                                                                                                                        | -                                                                                                                       |
| Процент (Р± р) отрицательных результатов с гетерологичными микроорганизмами в пробах объектов окружающей среды | 225             | 100                                                                                                                        | -                                                                                                                       |
| Процент (Р±р) правильно установленных видов микроорганизмов при проведении теста на гемолиз                    | 48              | -                                                                                                                          | 100                                                                                                                     |
| Воспроизводимость- Процент (Р±р) совпадений результатов исследования положительных и отрицательных проб        | 20              | 100                                                                                                                        | -                                                                                                                       |
| Скорость учета результатов (с учетом подготовки всех материалов), в ч                                          | -               | 20 при исследовании проб чистых культур и 2,5–3 при исследовании проб объектов окружающей среды и биологического материала | 20 при исследовании проб чистых культур и 40 при исследовании проб объектов окружающей среды и биологического материала |

препарата, дополнить раздел «Спецификация». Существенные изменения были внесены в методику обеззараживания мазков при приготовлении их из спорообразующих микроорганизмов. При оценке качества поступивших первых серий сибирезвездных вегетативных иммуноглобулинов на соответствие препарата требованиям нормативной документации было выявлено, что иммуноглобулины, даже в разведении 1:16 (норма не менее 1:16), не вызывали специфического свечения сибирезвездных штаммов. Вместе с тем, по данным авторов, иммуноглобулины выявляли штаммы сибирезвездного микроба в разведении 1:128. При выяснении причин было установлено, что обеззараживание мазков, приготовленных из сибирезвездных штаммов, авторы проводили 96 % спиртом без добавления 3 % перекиси водорода, использование которой негативно воздействует на специфическое свечение при окраске мазков препаратом. В процессе нашей работы мазки обеззараживали в соответствии с требованиями СП 1.3.1285-03 [2], которые предусматривают обязательное добавление к спирту перекиси водорода. Авторам было рекомендовано провести дополнительные исследования на этапе приготовления мазков. В дальнейшем в проект нормативной документации были внесены дополнения по приготовлению мазков, заключающиеся в промывке стекол с мазками после их обеззараживания в дистиллированной воде в течение 5 мин.

Таким образом, в результате медицинских исследований на четырех базах установлена высокая специфическая активность сибирезвездных иммуноглобулинов, обеспечивающих специфическое зеленовато-желтое свечение штаммов *B. anthracis* в вегетативной форме в мазках из чистых культур, биологического материала и объектов внешней среды в концентрации  $1,0 \cdot 10^8$  м.к./мл. Чувствительность

препарата по результатам всех исследований установлена от  $5,0 \cdot 10^5$  до  $1 \cdot 10^6$  м.к./мл. Показана диагностическая равноценность иммуноглобулинов и теста на гемолиз при исследовании специфической активности. При изучении специфичности препарата с гетерологичными микроорганизмами более точным оказался тест на гемолиз (100 %), тогда как специфичность испытуемых иммуноглобулинов составила 75 %. При этом получение результатов значительно быстрее при исследовании с помощью иммуноглобулинов, чем при исследовании бактериологическим методом.

Проведенные исследования позволили рекомендовать иммуноглобулины флуоресцирующие сибирезвездные вегетативные к регистрации в качестве изделия медицинского назначения для специфической индикации при исследовании чистых культур возбудителя сибирезвездного микроба, биологического материала и объектов внешней среды при диагностике сибирской язвы учреждениями здравоохранения (Регистрационное удостоверение № ФСР 2011/11338 от 12 июля 2011 г.).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдрашитова А.С., Саяпина Л.В., Малахаева А.Н. и др. Изучение диагностической ценности Наборов реагентов для выявления ДНК *Bacillus anthracis* и *Brucella spp.* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в медицинских приемочных испытаниях. В кн.: Диагностика, лечение и профилактика опасных и особо опасных инфекционных заболеваний. Биотехнология. Киров; 2008. С. 30–3.
2. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). СП 1.3.1285-03. Бюл. норм. и метод. док. Госсанэпиднадзора. 2003; 3(13):61–144.
3. Куличенко А.Н., Еременко Е.И., Буравцева Н.П., Рязанова А.Г. Диагностика сибирской язвы в Российской Федерации. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2010; 5:62–6.
4. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Дубянский В.М., Еременко Е.И. Актуальность проблемы болезней, общих для человека и животных (бруцеллез, сибирская язва), и КГЛ в рамках пригра-

ничного сотрудничества. В кн.: Вопросы реагирования на чрезвычайные ситуации санитарно-эпидемиологического характера. Астрахань; 2011. С. 81–4.

5. Окунев В.Б., Пикалов И.Н., Тучков И.В. Опыт использования генодиагностики в целях оптимизации эпидемиологического надзора за сибирской язвой. Эпидемиол. и инф. бол. 2000; 4:17–20.

6. Онищенко Г.Г., Кожухов В.В., редакторы. Сибирская язва: актуальные проблемы разработки и внедрения медицинских средств защиты. М.: Медицина; 2010. 423 с.

7. Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Цыганкова О.И., Цыганкова Е.А. Усовершенствование методов идентификации атипичных штаммов возбудителя сибирской язвы и их дифференциация от близкородственных бацилл. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2009; 3:76–80.

8. Рязанова А.Г., Еременко Е.И., Буравцева Н.П., Цыганкова О.И., Цыганкова Е.А., Аксенова Л.Ю. и др. Эпидемиологическая ситуация по сибирской язве в Российской Федерации: анализ заболеваемости в 2010 г. и прогноз на 2011 г. Пробл. особо опасных инф. 2011; 1(107):42–5.

9. Саяпина Л.В., Абдрашитова А.С., Малахаева А.Н. и др. Характеристика нового бактериофага диагностического сибиреязвенного гамма А-26 жидкого. Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2011; 1(41):36–9.

10. Саяпина Л.В., Анисимова Т.И., Тучков И.В. и др. Изучение активности и специфичности тест-системы для выявления ДНК *Bacillus anthracis* методом полимеразной цепной реакции. В кн.: Диагностика, лечение и профилактика опасных инфекционных заболеваний. Биотехнология. Ветеринария. Киров; 1998. С. 213–14.

11. Цыганкова О.И., Еременко Е.И., Цыганкова Е.А., Буравцева Н.П., Рязанова А.Г. Фенотипические и генетические особенности культурально-морфологических вариантов *Bacillus anthracis*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2008; 4:6–11.

12. Черкасский Б.Л. Эпидемиология и профилактика сибирской язвы. М.; 2002. 384 с.

13. Read T.D., Peterson S.N., Tourasse N. et al. The genome sequence of *B. anthracis* Ames and comparison to closely-related bacteria. Nature. 2003; 423:81–6.

Character]. Astrakhan, 2011. P.81–4.

5. Okunev V.B., Pikalov I.N., Tuckov I.V. [The experience of use of gene diagnostics for the purpose of optimization of epidemiological surveillance for anthrax]. Epidemiol. Infek. Bol. 2000; 4:17–20.

6. Onishchenko G.G., Kozhukhov V.V., editors. [Anthrax: Current Problems of Development and Introduction of Medical Protection Means]. M.; 2010. 423p.

7. Ryzanova A.G., Eremenko E.I., Tsygankova O.I., Tsygankova E.A. [Improvement of methods for identification of atypical anthrax strains and their differentiation from closely related bacilli]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2009; 3:76–80.

8. Ryzanova A.G., Eremenko E.I., Buravtseva N.P., Tsygankova O.I., Tsygankova E.A., Akseanova L.Yu. et al. [Epidemiological situation on anthrax in the Russian Federation: analysis of morbidity in 2010, prognosis for 2011]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2011; 1(107):42–5.

9. Sayapina L.V., Abdrashitova A.S., Malakhaeva A.N. et al. [Characteristics of new anthrax diagnostic liquid bacteriophage gamma A-26]. Biopreparaty. Prophylak. Diagn. Lechenie. 2011; 1(41):36–9.

10. Sayapina L.V., Anisimova T.I., Tuckov I.V. et al. [Examination of the activity and specificity of test system for *Bacillus anthracis* DNA detection by polymerase chain reaction]. In: [Diagnostics, Treatment and Prophylaxis of Dangerous Infectious Diseases]. Kirov; 1998. P.213–14.

11. Tsygankova O.I., Eremenko E.I., Tsygankova E.A., Buravtseva N.P., Ryzanova A.G. [Phenotypic and genetic features of cultural-morphologic variants of *Bacillus anthracis*]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2008; 4:6–11.

12. Cherkassky B.L. [Epidemiology and Prophylaxis of Anthrax]. M.; 2002. 384p.

#### Authors:

Sayapina L.V., Komratov A.V. Scientific Center for Expertise of Medical Products. 8, Petrovsky Bulvar, Moscow, 127051, Russia.

Abdrashitova A.S., Malakhaeva A.N., Lyashova O.Yu., Valova T.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrap@microbe.ru

Lobach R.N. 294<sup>th</sup> Center for Carrying out Rescue Operations of Extra Risk. Moscow, Russia.

Khranov M.V. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russia. E-mail: info@obolensk.org

Gefan N.G. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russia. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

#### Об авторах:

Саяпина Л.В., Комратов А.В. Научный центр экспертизы средств медицинского применения. 127051, Москва, Петровский бульвар, 8.

Абдрашитова А.С., Малахаева А.Н., Ляшова О.Ю., Валова Т.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Лобач Р.Н. 294-й Центр по проведению спасательных операций особого риска МЧС России. Москва.

Храмов М.В. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Московская обл., п. Оболенск. E-mail: info@obolensk.org

Гефан Н.Г. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. 664047, Иркутск, ул. Триллссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

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

1. Abdrashitova A.S., Sayapina L.V., Malakhaeva A.N. et al. [Examination of diagnostic value of reagent kit for *Bacillus anthracis* and *Brucella spp* DNA detection in biological material and environmental objects by means of PCR with hybridization-fluorescent detection in medical accepting trials]. In: [Diagnostics, Treatment and Prevention of Dangerous and Particularly Dangerous Infectious Diseases]. Kirov; 2008. P.30–3

2. [Safety of work with microorganisms of the I-II pathogenicity groups. SR 1.3.1285-03]. Byul. Norm. Metod. Dok. Gossanepidnadzora. 2003; 3(13):61–144.

3. Kulichenko A.N., Eremenko E.I., Buravtseva N.P., Ryzanova A.G. [Diagnostic of anthrax in Russia]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2010; 5:62–6.

4. Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Dubyansky V.M., Eremenko E.I. [Diseases common to man and animals (brucellosis, anthrax) and CCHF in the scope of cross-border cooperation. The Importance of Problem]. In: [Problems of Response to the Emergency Situations of Sanitary and Epidemiological

Поступила 16.03.12.

**О XI ЗАСЕДАНИИ КООРДИНАЦИОННОГО СОВЕТА  
ПО ПРОБЛЕМАМ САНИТАРНОЙ ОХРАНЫ ТЕРРИТОРИЙ ГОСУДАРСТВ-УЧАСТНИКОВ СНГ  
ОТ ЗАВОЗА И РАСПРОСТРАНЕНИЯ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ  
(17 октября 2012 г., Саратов)**

В заседании приняли участие члены Координационного совета и представители от Азербайджанской Республики, Республики Армения, Республики Беларусь, Республики Казахстан, Кыргызской Республики, Республики Молдова, Российской Федерации, Республики Таджикистан, Туркменистана, Республики Узбекистан, Украины, Исполнительного комитета СНГ.

С отчетным докладом выступил председатель Координационного совета (КС) В.В.Кутырев, директор ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», академик РАМН. В числе основных результатов деятельности Координационного совета за отчетный период названы:

- завершение реализации Межгосударственной программы сотрудничества в области санитарной охраны территорий государств-участников СНГ от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней на период до 2011 г.;

- завершение реализации Программы сотрудничества и взаимодействия государств-участников СНГ по проблемам биологической безопасности и противодействия биологическому терроризму на 2007–2011 гг.;

- создание на базе модернизированных СПЭБ систем мобильных противоэпидемических комплексов, предназначенных для предупреждения и оперативного реагирования на ЧС в области общественного здравоохранения, имеющих международное значение, разработка нормативно-методической базы их применения на территории государств-участников СНГ;

- разработка методологии реализации Международных медико-санитарных правил (2005 г.) на национальном уровне и внедрение ее при осуществлении санитарной охраны Таможенного союза, создание научной и методической основы внедрения этого документа на территории государств-участников СНГ;

- проведение XI Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ «Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера» (16–17 октября 2012 г., Саратов, Российская Федерация), в которой приняли участие представители всех стран СНГ.

Определены следующие основные задачи на 2013–2014 гг.:

- разработка Межгосударственной программы сотрудничества в области санитарной охраны тер-

риторий государств-участников СНГ от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней на 2014–2018 гг.;

- разработка Программы сотрудничества и взаимодействия государств-участников СНГ по проблемам биологической безопасности и противодействия биологическому терроризму на 2014–2018 гг.;

- гармонизация с ММСП (2005 г.) Положения о порядке осуществления информационного обмена между государствами-участниками СНГ об эпидемиологическом надзоре за карантинными и другими опасными инфекционными болезнями и о контроле за потенциально опасными для здоровья населения товарами и грузами; Санитарных правил и норм «Санитарная охрана территорий государств-участников Содружества Независимых Государств»;

- рассмотрение в установленном порядке разработанных КС проектов документов для внедрения на межгосударственном уровне: Соглашения о сотрудничестве государств-участников СНГ при ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения с участием российских СПЭБ; Положения о Межгосударственном информационно-аналитическом центре по вопросам оперативного оповещения и реагирования на чрезвычайные ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения государств-участников СНГ; МУ «Организация, обеспечение и оценка противоэпидемической готовности медицинских учреждений к проведению мероприятий в случае завоза или возникновения особо опасных инфекций, контагиозных вирусных геморрагических лихорадок, инфекционных болезней неясной этиологии, имеющих важное международное значение»; МУ «Профилактика холеры. Организационные мероприятия. Оценка противоэпидемической готовности медицинских учреждений к проведению мероприятий на случай возникновения очага холеры»;

- проведение в 2014 г. XII Межгосударственной научно-практической конференции на тему «Вклад государств-участников СНГ в обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения в современных условиях»;

- проведение XII расширенного заседания КС в г. Ильичевск в Украине в 2013 г. на тему: «Мероприятия по ликвидации заноса и распространения холеры на водном транспорте».

По вопросу «О решении Совета по сотрудничеству в области здравоохранения СНГ от 18.11.2011 г. о преобразовании Координационного совета по проблемам санитарной охраны террито-

рий государств-участников СНГ от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней в Координационный совет по вопросам обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения государств-участников СНГ и о предложениях по кандидатурам для включения в состав реорганизованного Координационного совета и его председателе» выступил представитель Исполкома СНГ Нарушевич Г.А. Согласно его информации, данный вопрос внесен в повестку дня предстоящего 23 ноября 2012 г. в Ялте (Украина) XXI заседания Совета по сотрудничеству в области здравоохранения СНГ.

В связи с информацией представителя Исполкома СНГ на заседании КС акцентировано внимание на высокой потенциальной опасности и специфичности эпидемиологического пространства государств-участников СНГ, обусловленных наличием, прежде всего, 45 природных очагов чумы, а также эндемич-

ных территорий по другим особо опасным инфекционным болезням, частых заносов холеры, координация надзора и контроля которых требует соответствующей специализации, которой обладает КС; выражена озабоченность в связи с намеченной реорганизацией КС на XXI заседании Совета по сотрудничеству в области здравоохранения СНГ; высказана просьба к Совету по сотрудничеству в области здравоохранения СНГ об исключении из повестки дня XXI заседания вопроса о реорганизации КС.

В числе других вопросов повестки дня XI заседания КС было обсуждение состояния обмена эпидемиологической информацией в государствах-участниках СНГ и хода рассмотрения на межгосударственном уровне проектов нормативно-методических документов, разработанных Координационным советом по проблемам санитарной охраны территорий государств-участников СНГ от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней.

**РЕЗОЛЮЦИЯ  
XI МЕЖГОСУДАРСТВЕННОЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ  
ГОСУДАРСТВ-УЧАСТНИКОВ СНГ  
«СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В СОВЕРШЕНСТВОВАНИИ МЕР ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ  
И ОТВЕТНЫХ ДЕЙСТВИЙ НА ЧРЕЗВЫЧАЙНЫЕ СИТУАЦИИ В ОБЛАСТИ ОБЩЕСТВЕННОГО  
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО ХАРАКТЕРА»  
(17 октября 2012 г., Российская Федерация, Саратов)**

Участники XI Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ «Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера» от Азербайджанской Республики, Республики Армения, Республики Беларусь, Республики Казахстан, Кыргызской Республики, Республики Молдова, Российской Федерации, Республики Таджикистан, Туркменистана, Республики Узбекистан, Украины и Исполкома СНГ констатировали актуальность, своевременность и полноту обсуждения проблем, соответствующих тематике конференции.

Участники конференции отметили широту проблем, связанных с понятием чрезвычайная ситуация санитарно-эпидемиологического характера, определение которой имеется в Международных медико-санитарных правилах (ММСП 2005) и учитывается при их реализации на территории Содружества Независимых Государств (СНГ).

Современные вызовы и угрозы обосновывают необходимость совершенствования всего комплекса мер, направленных на обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения, включающих эпидемиологический надзор за инфекционными и паразитарными болезнями, санитарную охрану территории, предупреждение и ликвидацию чрезвычайных ситуаций (ЧС) санитарно-

эпидемиологического характера, в том числе возникающих в условиях природных, техногенных катастроф и гуманитарных конфликтов, обеспечение биологической безопасности.

Участники конференции констатируют, что в большинстве докладов и опубликованных материалов конференции освещены, обсуждены и даны конкретные предложения по оптимизации противоэпидемических мер в условиях ЧС на основе внедрения современных информационных, диагностических, профилактических, производственных (разработка иммунобиологических препаратов), организационных технологий на национальном уровне.

Отмечена принципиальная важность рассмотренных проблем в условиях современных эпидемиологических, социально-экономических и геополитических реалий.

В создавшейся напряженной эпидемиологической обстановке, как подчеркнуто в целом ряде докладов, главная задача на пространстве СНГ состоит в создании межгосударственной системы мониторинга и контроля ЧС в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения, которая должна стать одной из составляющих целостной системы биологической безопасности.

Участники конференции отмечают, что в основу этой системы должны быть положены инициативы саммитов «Большой Восьмерки G8», ШОС в области борьбы с инфекционными болезнями, стратегия ВОЗ

и положения ММСП (2005 г.).

Важным при создании системы является учет опыта Российской Федерации по оптимизации лабораторной сети в целях обеспечения мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней, а также широкое использование специализированных мобильных формирований (специализированных противоэпидемических бригад – СПЭБ), созданных и модернизированных в последние годы на базе противочумных институтов Роспотребнадзора для предупреждения и ликвидации чрезвычайных ситуаций различной природы.

Участники конференции подчеркивают принципиальную важность координации научных исследований на уровне СНГ по созданию системы противодействия ЧС на национальном уровне, в том числе в рамках реализации ММСП (2005 г.). Организационную, методическую и экспертную помощь в этих вопросах может оказать Российская Федерация, которая имеет достаточно большой опыт международного сотрудничества в этой сфере деятельности.

В целом участники XI Межгосударственной научно-практической конференции отмечают наличие достаточно большого опыта межгосударственного сотрудничества на пространстве СНГ в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения, в том числе по вопросам санитарной охраны территории, оперативного реагирования на ЧС санитарно-эпидемиологического характера. Основным технологическим инструментом для консолидации усилий на международном уровне по данной проблематике на сегодняшний день остаются ММСП-2005.

Конференция отмечает, что в целях обеспечения совместных ответных действий на ЧС санитарно-эпидемиологического характера необходимо решение следующих задач:

- создание единой базы данных о чрезвычайных

ситуациях санитарно-эпидемиологического характера и условиях их возникновения;

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

- унификация гармонизированной с ММСП (2005 г.) нормативно-методической базы в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения, касающейся: эпидемиологического надзора за инфекционными, в том числе природно-очаговыми, зоонозными и паразитарными болезнями, санитарной охраны территории, предупреждения и противодействия чрезвычайным ситуациям, возникающим в условиях стихийных бедствий и кризисных ситуаций антропогенного характера, включая биологический терроризм;

- создание и совершенствование систем готовности к ЧС санитарно-эпидемиологического характера, адекватных требованиям Международных медико-санитарных правил (2005 г.), в том числе с участием российских СПЭБ;

- стандартизация процедур скрининга, мониторинга, индикации и идентификации биологических патогенов, профилактики и контроля инфекционных болезней, в том числе новых (неизвестных) при осуществлении деятельности по предупреждению и ликвидации санитарно-эпидемиологических последствий чрезвычайных ситуаций.

С целью укрепления сотрудничества, реализации обозначенных целей и признавая важность обсужденной проблематики, участники научного форума поддержали инициативу проведения в 2014 году XII Межгосударственной научно-практической конференции на тему: «Вклад государств-участников Содружества Независимых Государств в обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения в современных условиях».

## **О МЕЖВЕДОМСТВЕННОМ СОВЕЩАНИИ ПО ПРОБЛЕМАМ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ОХРАНЫ ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

В соответствии с Планом основных организационных мероприятий Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на 2012 г. (п. 1.4.43.) и во исполнение Приказа Роспотребнадзора № 879 от 31.08.2012 г. 18 октября 2012 г. в Саратове на базе ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» проведено Межведомственное совещание по проблемам санитарно-эпидемиологической охраны территории Российской Федерации (Пленум Координационного научного совета (КНС) по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации).

КНС (48.00) координирует научные исследования, выполняемые в РосНИПЧИ «Микроб», Ростовском, Волгоградском, Ставропольском, Иркутском НИПЧИ, Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии, Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» и совместные исследования с рядом институтов Роспотребнадзора, Минздрава России, Федерального медико-биологического агентства, Российской академии медицинских наук, Российской академии сельскохозяйственных наук, Минобороны России, МЧС России, с Центрами гигиены и эпидемиологии регионов РФ.

В совещании приняли участие представители учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Российской академии медицинских наук, Российской академии сельскохозяйственных наук, Минобороны России, МЧС России.

Согласно утвержденной программе на совещании рассмотрены вопросы санитарно-эпидемиологической охраны территории Российской Федерации; современное состояние эпидемиологии и генной диагностики возбудителей особо опасных и вирусных инфекций; внедрение МИБП для профилактики, диагностики и лечения особо опасных инфекционных и вирусных заболеваний; выполнение «Сетевого графика разработки и внедрения препаратов для диагностики и профилактики особо опасных инфекционных болезней»; выполнение плана переработки документов по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации и обсуждение проекта плана разработки нормативно-методических документов на 2013 год; выполнение научно-исследовательских работ в рамках ФЦП «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 гг.)» и отраслевой научно-исследовательской программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» на 2011–2015 гг.; проблемы совершенствования нормирования биологической безопасности.

Проведено обсуждение и утверждение отчетных за 2012 г. и плановых на 2013 г. материалов КНС.

В соответствии с Планом основных организационных мероприятий Роспотребнадзора на 2012 г., Планом КНС по обеспечению гармонизации национальной нормативно-методической базы с

Международными медико-санитарными правилами (2005 г) и Планом КНС по разработке и переработке нормативно-методических документов по санитарной охране территории Российской Федерации и эпидемиологическому надзору за ООИ на 2012 г. специалистами учреждений Координационного научного совета разработано 18 нормативно-методических документов, из них 4 утверждены на федеральном уровне, 10 проектов документов направлено в Роспотребнадзор, 4 документа – межгосударственного уровня.

В рамках КНС в 2012 г. выполнялось 130 отраслевых тем. Завершено 26 НИР, выполняемых по отраслевым заданиям. Разработано 233 наименования научной продукции для внедрения в практику здравоохранения в 2012 г.

На заседаниях проблемных комиссий КНС рассмотрены 23 регистрационные карты на темы, планируемые к исполнению с 2013 г. По тематике КНС в 2013 г. будет выполняться 127 тем. Для включения в план внедрения результатов НИР в практику в 2013 г. на федеральном, региональном и учрежденческом уровнях представлено 122 предложения. Одобрены и направлены в Роспотребнадзор предложения КНС к Плану основных организационных мероприятий Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на 2013 г. Одобрены и направлены в отделение профилактической медицины РАМН основные направления развития научных исследований, выполняемых в рамках Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации на 2013 г.

Отчет о работе Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации в 2012 г. направлен в Роспотребнадзор и РАМН.

---

*Редакционная коллегия и редакционный совет  
научно-практического журнала «Проблемы особо опасных инфекций»  
поздравляют*

*с 65-летием **Николая Владимировича Попова**  
заведующего лабораторией эпизоотологического мониторинга РосНИПЧИ «Микроб»,  
доктора биологических наук, профессора,*

*с 50-летием **Алексея Константиновича Никифорова**  
заместителя директора РосНИПЧИ «Микроб» по научной и производственной работе,  
кандидата медицинских наук*

*и желают им крепкого здоровья, долгой плодотворной творческой жизни,  
счастья и благополучия, успеха во всех начинаниях*