

ПРОБЛЕМЫ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Научно-практический журнал

Выходит четыре раза в год

Основан в 1968 году

Главный редактор член-корреспондент РАМН,
доктор медицинских наук, профессор **В.В.Кутырев**

*Журнал входит в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий ВАК,
в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций
на соискание ученой степени доктора и кандидата наук*

Выпуск 101

3 · 2009

САРАТОВ

Адрес редакции:

410005, Саратов,
ул. Университетская, 46
Тел. (845-2) 51-82-22
Факс (845-2) 51-52-12
E-mail: microbe@san.ru
www.microbe.ru

Зав. редакцией Л.С.Пронина

Тел. (845-2) 51-82-22

Редактор *Л.С.Пронина*

Технический редактор
Т.К.Меркулова

Перевод на английский
Т.Б.Каравасовой
А.Ю.Мощиной

Подписано в печать 23.09.09

Формат 60×88 1/8

Бумага офсетная

Печать офсетная

Усл. печ. л. 9,75

Гарнитура Таймс

Заказ 925

Подписной индекс – 24687

ISSN 0370-1069. Пробл. особо

опасных инф. 2009. Вып. 101. 1–78

Журнал отпечатан

в ООО «ИППОЛит-XXI век»

410012, Саратов, Б. Казачья, 79/85

ISSN 0370-1069



9 770370 106008 >

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

В.В.Алексеев, докт. мед. наук, профессор (Волгоград),
В.Е.Безсмертный, канд. мед. наук (Москва),
И.В.Борисевич, докт. мед. наук (Киров),
А.Л.Гинцбург, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва),
И.Г.Дроздов, докт. мед. наук, профессор (Кольцово),
И.А.Дятлов, докт. мед. наук, профессор (Оболенск),
А.Н.Куличенко, докт. мед. наук, профессор (Ставрополь),
В.В.Кутырев, докт. мед. наук, член-корр. РАМН (Саратов),
Ю.М.Ломов, докт. мед. наук, профессор (Ростов-на-Дону),
Д.К.Львов, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва),
В.П.Бондарев, докт. мед. наук (Сергиев Посад),
В.В.Малеев, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва),
В.П.Сергиев, докт. мед. наук, академик РАМН (Москва),
Ю.М.Федоров, докт. мед. наук (Москва)

*Журнал включен в Реферативный журнал и Базы данных ВИНТИ.
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)*

© Федеральное государственное учреждение здравоохранения
Российский научно-исследовательский противочумный
институт «Микроб», 2009

**Problemy
osobo opasnyh infekcij**

ISSN 0370-1069

**Problems
of Particularly Dangerous Infections**

СОДЕРЖАНИЕ

Онищенко Г.Г., Агафонов А.П., Демина О.К., Сергеев А.А., Терновой В.А., Шишкина Л.Н., Бормотов Н.И., Кабанов А.С., Скарнович М.О., Шиков А.Н., Семенцова А.О., Шестопалов А.М., Шпынов С.Н., Ставский Е.А., Дроздов И.Г. Свойства штаммов пандемического вируса гриппа, выделенных на территории России 5

Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Топорков А.В., Карнаухов И.Г., Щербаков Д.А., Казакова Е.С., Щербакова С.А. Обеспечение модернизации специализированных противоэпидемических бригад (СПЭБ) на современном этапе 10

Эпидемиология, биобезопасность

Базарова Г.Р., Нematov А.С., Хусанов О.А., Ахмадбек кизи С. Оптимизация эпидразведки и прогнозирование эпизоотий в Кызылкумском автономном очаге чумы в современных условиях в пределах Узбекистана 19

Лукин Е.П., Кириллова С.Л., Кириллов В.Б. Основание кумулятивного коэффициента, характеризующего интенсивность передачи эпидемического сыпного тифа в зависимости от времени года 22

Малиюкова Т.А., Сазанова Е.В., Костюкова Т.А., Головки Е.М., Бойко А.В. Выбор и обеззараживание адсорбентов, используемых при транспортировании патогенных биологических агентов 24

Русанова Д.В., Лямкин Г.И. Эпидемиологические особенности бруцеллеза в Ставропольском крае 27

Топорков В.П., Кологоров А.И., Осина Н.А., Бугоркова Т.В., Щербакова С.А., Портенко С.А., Кучимова Н.А., Мавлютов О.М., Фарвазова Л.А., Галлямов Р.Г., Иванова И.А., Коробов Л.И., Сыса А.М., Короткова Ю.А. Ретроспективный анализ заносных случаев холеры в г. Белорецк Республики Башкортостан в 2008 году 31

Шарова И.Н., Кутырев И.В., Красовская Т.Ю., Чекашов В.Н., Матросов А.Н., Шилов М.М., Удовиков А.И., Дмитриенко В.В., Жуковская А.П., Бачаев Б.М., Тюнникова В.Д., Санджиев В.Б.-Х., Кулик А.А., Гайворонский И.Н., Подсвилов А.В., Журавлев В.И., Богданова Т.А., Лещук В.А., Кабин В.В., Топорков А.В., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Полевые испытания мобильной лаборатории эпидразведки и индикации. Сообщение 2. Полевые испытания мобильной лаборатории эпидразведки и индикации на территории Астраханской и Саратовской областей, Республики Калмыкия 34

Микробиология

Заднова С.П., Ливанова Л.Ф., Лозовский Ю.В., Смирнова Н.И. Выявление в природных популяциях холерного вибриона клонов с различной экспрессией факторов вирулентности и персистенции и их фенотипический анализ 39

CONTENTS

Onischenko G.G., Agafonov A.P., Demina O.K., Sergeev A.A., Ternovoy V.A., Shishkina L.N., Bormotov N.I., Kabanov A.S., Skarnovich M.O., Shikov A.N., Sementsova A.O., Shestopalov A.M., Shpynov S.N., Stavskiy E.A., Drozdov I.G. Properties of Pandemic Influenza Virus Strains Isolated in the Territory of Russia

Onischenko G.G., Kutyrev V.V., Toporkov A.V., Karnaukhov I.G., Scherbakov D.A., Kazakova E.S., Scherbakova S.A. Provision of Specialized Anti-Epidemic Teams (SAET) Modernization at the Present Stage

Epidemiology, Biosafety

Bazarova G.R., Nematov A.S., Husanov O.A., Ahmadbek kizi S. Optimization of Epidemic Survey and Epizootics Prognostication in Kyzylkum Autonomous Plague Focus in Modern Conditions within Uzbekistan

Lukin E.P., Kirillova S.L., Kirillov V.B. Substantiation of Cumulative Coefficient Characterizing Epidemic Typhus Fever Transmission Activity Depending on Seasons

Malyukova T.A., Sazanova E.V., Kostyukova T.A., Golovko E.M., Boyko A.V. Selection and Disinfection of Adsorbents Used for Transportation of Pathogenic Biological Agents

Rusanova D.V., Lyamkin G.I. Epidemiologic Features of Brucellosis in Stavropol Region

Toporkov V.P., Kologorov A.I., Ossina N.A., Bugorkova T.V., Scherbakova S.A., Portenko S.A., Kuchimova N.A., Mavlyutov O.M., Pharvazova L.A., Gallyamov R.G., Ivanova I.A., Korobov L.I., Sysa A.M., Korotkova Yu.A. Post-Event Analysis of Imported Cholera Cases in Beloretsk, the Republic of Bashkortostan, in 2008

Sharova I.N., Kutyrev I.V., Krasovskaya T.Yu., Chekashov V.N., Matrosov A.N., Shilov M.M., Udovikov A.I., Dmitrienko V.V., Zhukovskaya A.P., Bachaev B.M., Tyunnikova V.D., Sandzhiev V.B.-Kh., Kulik A.A., Gayvoronskiy I.N., Podsvirov A.V., Zhuravlev V.I., Bogdanova T.A., Leschuk V.A., Kabin V.V., Toporkov A.V., Scherbakova S.A., Kutyrev V.V. Field Trial of Mobile Laboratory of Epidemiologic Survey and Indication. Communication 2. Field Trial of Mobile Laboratory of Epidemiologic Survey and Indication on the Territory of Astrakhan and Saratov Regions, Republic of Kalmykia

Microbiology

Zadnova S.P., Livanova L.F., Lozovskiy Yu.V., Smirnova N.I. Detection of Clones with Different Expression of Virulence and Persistence Factors in Natural Populations of Cholera Vibrio and Their Phenotypic Analysis

Иммунология, патогенез

Бикетов С.Ф., Фирстова В.В., Любимов И.И. Особенности этиологии и иммунопатогенеза иксодовых клещевых боррелиозов 44

Бугоркова С.А., Барулина И.С., Щуковская Т.Н., Саяпина Л.В. Нейроэндокринные аспекты изучения реакции лимфоидных органов биомодели на введение живой противотуляремийной вакцины 50

Диагностика

Помелова В.Г., Быченкова Т.А., Осин Н.С. Иммуночип на основе микропланшетной технологии ФОСФАН для определения иммуноглобулинов G к вирусам Западного Нила, Крымской-Конго геморрагической лихорадки и клещевого энцефалита 54

Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Ляпуста Л.В., Коготкова О.И., Жарникова И.В., Ефременко В.И., Будыка Д.А., Василенко Н.Ф., Афанасьева Е.Е., Куличенко А.Н. Иммуномагнитные сорбенты для экспресс-диагностики опасных инфекционных заболеваний: аспекты биотехнологии и опыт применения 59

Биотехнология

Антонычева М.В., Кузьмиченко И.А., Никифоров А.К., Волох О.А., Шульгина И.В., Нижегородцев С.А. Эффективность автолиза пекарских дрожжей, индуцированного ферментными препаратами 62

Курилова А.А., Таран Т.В., Катунина Л.С., Головнева С.И. Разработка питательных сред из растительного сырья для культивирования возбудителей особо опасных инфекций 66

Ляпуста Л.В., Омелянчук П.А., Лямкин Г.И., Вилинская С.В., Головнева С.И., Коготкова О.И., Будыка Д.А., Русанова Д.В., Куличенко А.Н. Совершенствование технологии производства бруцеллезных диагностических бактериофагов 69

Краткие сообщения

Сергеева И.В. Диагностические ошибки при хронической форме бруцеллеза 73

Информация

IX Московский международный салон инноваций и инвестиций 75

Юбилей

К 80-летию со дня рождения Павла Ивановича Анисимова 76

Правила для авторов 78

Immunology, Pathogenesis

Bicketov S.F., Firstova V.V., Lyubimov I.I. Etiology and Immunopathogenesis Peculiarities of Ixodic Tick-Borne Borreliosis

Bugorkova S.A., Barulina I.S., Schukovskaya T.N., Sayapina L.V. Neuroendocrinal Aspects of Analysis of Biomodel Lymphoid Organs Response to Administration of Live Tularemia Vaccine

Diagnostics

Pomelova V.G., Bychenkova T.A., Ossin N.S. PHOSPHAN Microplate Technology-Based Microarray For Detection of IgG Antibodies against West Nile, Crimean Congo Hemorrhagic Fever and Tick-Borne Encephalitis Viruses

Tyumentseva I.S., Afanas'ev E.N., Lyapustina L.V., Kogotkova O.I., Zharnikova I.V., Efremenko V.I., Budyka D.A., Vasilenko N.F., Afanas'eva E.E., Kulichenko A.N. Immune-Magnetic Absorbents Used for Express Diagnosis of Dangerous Infectious Diseases: Biotechnology Aspects and Experience of Application

Biotechnology

Antonycheva M.V., Kuzmichenko I.A., Nikiforov A.K., Volokh O.A., Shulgina I.V., Nizhegorodtsev S.A. The Efficiency of Baker's Yeast Autolysis Induced by Enzyme Preparations

Kurilova A.A., Taran T.V., Katunina L.S., Golovneva S.I. Development of Nutrient Media out of Vegetable Material for Culturing Particularly Dangerous Infections Agents

Lyapustina L.V., Omelyanchuk P.A., Lyamkin G.I., Vilinskaya S.V., Golovneva S.I., Kogotkova O.I., Budyka D.A., Rusanova D.V., Kulichenko A.N. Mastering of Technology of Production of Brucellosis Diagnostic Bacteriophages

Brief Communications

Sergeeva I.V. Diagnostic Mistakes as Regards Chronic Form of Brucellosis

Information

IX Moscow International Salon of Innovations and Investments

Anniversaries

To the 80-th anniversary of Pavel Ivanovich Anisimov

Instruction to Authors

Г.Г.Онищенко¹, А.П.Агафонов², О.К.Демина², А.А.Сергеев², В.А.Терновой², Л.Н.Шишкина²,
Н.И.Бормотов², А.С.Кабанов², М.О.Скарнович², А.Н.Шиков², А.О.Семенцова², А.М.Шестопапов²,
С.Н.Шпынов², Е.А.Ставский², И.Г.Дроздов²

СВОЙСТВА ШТАММОВ ПАНДЕМИЧЕСКОГО ВИРУСА ГРИППА, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

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

²ФГУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово

Первые случаи заболевания, вызванного пандемическим (H1N1) 2009 вирусом гриппа, на территории Российской Федерации зарегистрированы в конце мая 2009 г. От заболевших были выделены три штамма пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа. Свойства выделенных на территории России штаммов были изучены в сравнении с двумя референс-штаммами A/California/04/2009(H1N1)v и A/California/07/2009(H1N1)v. На основании анализа первичной последовательности генов и при изучении биологических свойств выделенных на территории РФ штаммов было показано их близкое родство со штаммами A/California/04/2009(H1N1)v и A/California/07/2009(H1N1)v.

Ключевые слова: пандемический (H1N1) 2009 вирус гриппа, агглютинирующая активность, антигенные свойства, лекарственная устойчивость.

В лаборатории Центра контроля за инфекционными заболеваниями (CDC, США) 15 апреля 2009 г. из клинического образца 10-летнего ребенка с выраженными признаками респираторного заболевания (лихорадка, кашель, рвота) был выделен новый вариант вируса гриппа А субтипа H1N1 [7]. Ретроспективный анализ показал, что новый вариант возник после реассортации в геноме штаммов вируса гриппа свиней Евроазиатской линии и штаммов вируса гриппа свиней Североамериканской линии, которая произошла в конце 1990-х в результате взаимодействия субтипов H1N1, H3N2 и H1N2 [5, 8, 9]. Заболевание, вызванное новым вариантом вируса, вначале охватило территории Мексики и США в связи с существующими между этими странами людскими потоками высокой степени интенсивности, а затем с потоком туристов распространилось на территории других государств мира. ВОЗ 11 июня 2009 г. впервые более чем за 40 лет объявила о введении шестого, максимального уровня угрозы – пандемии. К середине июля 2009 г. количество официально подтвержденных случаев заболевания людей пандемическим вирусом гриппа А(H1N1) в мире составило более 105 тыс., из которых более 450 закончились летальным исходом. Единичные случаи и вспышки заболевания были зарегистрированы в 136 странах и обособленных территориях. В Российской Федерации, не имеющей, в отличие от США, столь интенсивных туристических связей с Мексикой и другими странами, в которых наблюдалось эпидемическое распространение указанного заболевания, тем не менее, также были выявлены его единичные случаи. В связи с вышеизложенными фактами было актуальным выделить из клинических образцов российских граждан, больных пандемическим гриппом, штаммы возбудителя и провести их сравнительное изучение со штаммами вируса гриппа, выделенными в США.

Материалы и методы

На территории Российской Федерации из клинического материала заболевших гриппом типа А людей были выделены три штамма вируса и изучены их свойства. При этом в качестве референс-штаммов были использованы штаммы A/California/04/2009(H1N1)v и A/California/07/2009(H1N1)v пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа, полученные в мае 2009 г. из CDC (США). Штаммы прошли два пассажа на РКЭ.

Сыворотка к штамму A/California/04/2009(H1N1)v была получена следующим образом: мышам линии BALB/c 3-кратно интраназально вводили вирус гриппа на 0, 21 и 37-е сутки в дозе 4,2 lg ТЦД₅₀/животное. Сыворотку крови получали на 20, 36 и 52-е сутки после первичного введения вируса.

Для проведения ОТ-ПЦР использовали РНК, выделенную из клинических образцов набором «РибоСорб» (пр-во «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно прилагаемой инструкции. Реакцию проводили с использованием набора «АмплиСенс Influenza virus A/H1-swine-FL» (пр-во «ИнтерЛабСервис», Россия) и лабораторных вариантов тест-систем с праймерами, рекомендованными ВОЗ для выявления пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа (праймеры рассчитаны на Н, N, М и NS гены).

Для выделения вируса были использованы 9–10 дневные развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ) и культура клеток МДСК.

Для изучения патогенности выделенных изолятов вируса гриппа были использованы мыши (линии BALB/c, CBA, C57Black, ICR, вес 12–14 г), морские свинки (б/п, вес 150–200 г) и кролики (порода шиншилла, вес 1,3–1,5 кг), полученные из питомника ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор». Животные содержались

на стандартном рационе с достаточным количеством воды. Все манипуляции с животными при поведении эксперимента проводили с применением седативных средств в соответствии с ветеринарным законодательством и правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных. Оценка эффективности лекарственных препаратов проводилась на 5-е сутки после заражения по ингибированию репликации вируса в культуре клеток МДСК (*in vitro*) и по ингибированию репликации вируса в легких у мышей линии ICR (*in vivo*), определяемой титрованием на РКЭ [2].

Статистическую обработку данных проводили общепринятыми методами. Вычисление значений 50 % инфицирующих доз вируса гриппа, а также их сравнение проводили по методу Спирмена-Кербера [1].

Результаты и обсуждение

Первые диагностические исследования с пробами, подозрительными на содержание пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа, были проведены в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора 6 мая 2009 г. Пробы поступили из Управления Роспотребнадзора по Свердловской области и были получены от больной М.О., которая вернулась из туристической поездки с Виргинских островов через США. После проведенных молекулярно-биологических и вирусологических исследований диагноз «заболевание, вызванное вирусом гриппа А субтипа H1N1» не подтвердился.

Первый случай заболевания пандемическим (H1N1) 2009 вирусом гриппа на территории Российской Федерации был зарегистрирован 22 мая 2009 г. Больной М.Д., гражданин России, прибыл в Москву из Нью-Йорка. Признаки заболевания появились 20 мая, и в ночь на 21 мая он был госпитализирован в инфекционную больницу. От больного забраны образцы мазков из носоглотки и ротоглотки, которые были исследованы на наличие генетического материала (РНК) вируса гриппа методом ОТ-ПЦР и использованы для выделения изолята на чувствительных моделях. В обеих пробах методом ОТ-ПЦР обнаружен генетический материал пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа. На 3-и сутки наблюдения за клетками МДСК выявлены изменения монослоя. На 5-е сутки собрана культуральная вирусосодержащая жидкость. Методом ОТ-ПЦР подтверждено наличие РНК пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа. Титр вируса при титровании на культуре клеток составил $5,7 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$, определенный в РГА с эритроцитами петуха – 1:32.

Всего за период с 6 мая по 1 июля 2009 г. в ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» доставлены образцы от 7 больных людей с подозрением на заболевание пандемическим (H1N1) 2009 вирусом гриппа. В результате проведенных исследований в пяти случаях методом ОТ-ПЦР в клинических образцах больных был об-

наружен генетический материал пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа. При этом в четырех случаях РНК пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа выявлены у больных, возвратившихся после поездки в США, и в одном – из Доминиканской Республики. Течение заболевания у всех инфицированных протекало в не осложненной форме и закончилось выздоровлением. Из полученных от 3 больных образцов носоглоточных смывов были выделены изоляты пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа, названные согласно рекомендациям WHO OIE & FAO A/Moscow/225/2009(H1N1)v, A/Moscow/226/2009(H1N1)v, A/Moscow/227/2009(H1N1)v. Штаммы депонированы в коллекции культур микроорганизмов ГНЦ ВБ «Вектор»

Изучение изолятов в РГА показало, что эритроциты кролика, морской свинки, петуха, барана и гуся агглютинируются как референс-штаммом A/California/04/2009(H1N1)v, так и всеми выделенными изолятами, причем эритроциты кролика и морской свинки – в высоких титрах у всех изученных штаммов. Ни один из исследованных штаммов пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа не агглютинировал эритроциты макаки резус.

Для изучения патогенности нового пандемического варианта вируса гриппа лабораторным животным интраназально вводили штаммы A/California/04/2009(H1N1)v с титром $6,5 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$ и A/Moscow/225/2009(H1N1)v с титром $6,7 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$. Мышей заражали в объеме 30 мкл, морских свинок – 80 мкл и кроликов – 150 мкл. За животными наблюдали в течение 16 сут. На 5-е сутки после заражения у животных забирали легкие и определяли наличие РНК вируса гриппа методом ОТ-ПЦР. В легких мышей всех линий обнаружена РНК вируса гриппа. В легких морских свинок и кроликов РНК вируса гриппа не выявлена. Инфекция, вызванная пандемическим (H1N1) 2009 вирусом гриппа, для всех видов животных была не летальной. Следует отметить, что последовательное, интраназальное, проведенное по схеме 0, 21, 37-е сутки, заражение мышей линии BALB/c дозой вируса $4,2 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{животное}$, штамм A/California/04/2009(H1N1)v, приводило к репродукции вируса в легких (табл. 1). При изучении штаммов в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) было показано (табл. 1), что выделенные изоляты пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа A/Moscow/225/2009(H1N1)v и A/Moscow/226/2009(H1N1)v находятся в близком антигенном родстве с полученными из CDC штаммами A/California/04/2009(H1N1)v и A/California/07/2009(H1N1)v. Были определены значения 50 % инфицирующих доз штаммов вирусов гриппа для мышей, которые составили $1,1 \pm 0,5 \lg \text{ЭИД}_{50}$ для штамма A/California/04/2009(H1N1)v и $0,59 \pm 0,5 \lg \text{ЭИД}_{50}$ – для штамма A/Moscow/225/2009(H1N1)v.

Выделенные изоляты были проверены на восприимчивость к действию противогриппозных

Таблица 1

Результаты эксперимента по и/н заражению мышей линии BALB/c штаммом A/California/04/2009(H1N1)v пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа

Используемый для постановки РГА антиген	Наличие РНК пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа в легких/титр сыворотки в РТГА/срок получения образцов (сут) от первичного введения вируса					
	Однократное введение вируса		Двукратное введение вируса		Трехкратное введение вируса	
	Наличие РНК ¹	РТГА	Наличие РНК ²	РТГА	Наличие РНК ³	РТГА
A/California/04/2009(H1N1)v	+	1:400	+	1:3200	+	1:51200
A/Moscow/225/2009(H1N1)v	+	1:200	+	1:800	+	1:12800
A/Moscow/225/2009(H1N1)v	+	1:200	+	1:800	+	1:12800
A/Moscow/225/2009(H1N1)v	+	1:200	+	1:400	+	1:12800
Контроль 1 A/Novosibirsk 01/2009(H1N1)*		1:100		1:100		1:400
Контроль 2 A/Turkey/Suzdalka/Nov-1/2005 (H5N1)**		<1:50		<1:50		<1:50

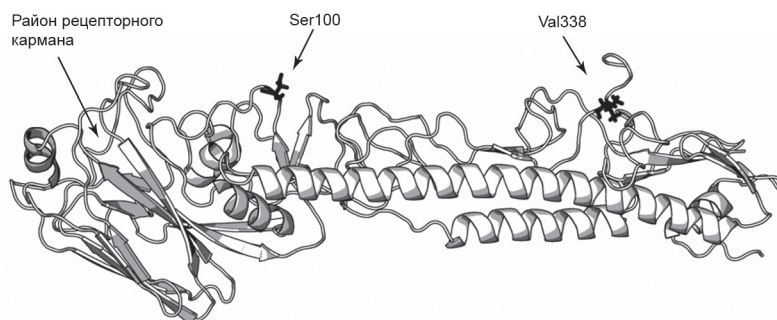
Примечания: ¹ – РНК вируса определяли в легких, полученных через 5 сут после первичного введения вируса; ² – РНК вируса определяли в легких, полученных через 5 сут после вторичного введения вируса; ³ – РНК вируса определяли в легких, полученных через 5 сут после третьего введения вируса; * – штамм «сезонного» вируса гриппа, выделенного от больного в г. Новосибирске в сезон 2008–2009 г.; ** – штамм вируса гриппа А субтипа H5N1, выделенного на территории Новосибирской области в 2005 г.

препаратов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. Проведенные исследования показали, что штаммы A/Moscow/225/2009 (H1N1)v, A/Moscow/226/2009(H1N1)v, A/Moscow/227/2009(H1N1)v (табл. 2), как и штаммы A/California/04/2009(H1N1)v и A/California/07/2009(H1N1)v чувствительны к действию ремантадина, ингавирина, реферона и тамифлю при изучении противовирусной активности *in vitro*. В экспериментах на мышах было установлено, что изученные штаммы обладают восприимчивостью к действию ингавирина, ремантадина, рибавирина, реферона и тамифлю при использовании терапевтических доз, эквивалентных установленным для лечения человека.

Последовательности генов выделенных изолятов были секвенированы и депонированы в международной базе данных GenBank. Анализ последовательностей генов NA и М изолятов, выделенных на территории России, подтвердил, что оба гена схожи

с соответствующими геномами вируса гриппа свиной субтипа H1N1 Евроазиатской линии – A/Swine/England/195852/92(H1N1) с процентом гомологии 94 %. Изучение PB1, PB2, PA, NP, NS генов свидетельствует о том, что выделенные изоляты имеют сходство со штаммами вируса гриппа А субтипа H1N2, циркулирующего на территории Северной или Центральной Америки в 1999–2001 гг. среди свиней. При этом гомология нуклеотидных последовательностей со штаммами A/Swine/Indiana/9K035/99, A/Swine/Indiana/P12439/00, A/Swine/Minnesota/55551/00 и A/Swine/Illinois/100084/01 составляет 96 %. Ген гемагглютинаина также наиболее близок к гену гемагглютинаина штаммов субтипа H1N2. Анализ участка последовательности гена гемагглютинаина, отвечающего за взаимодействие с рецептором Neu5Aca2-6Galh1 человека (Asp190—Gln192—Ser193—Lys222—Asp225—Gln226), показал, что замены, характерные для «свиных» штаммов, присутствуют и у штаммов

	100	214	220	251	338
A/California/07/2009 (H1N1)v	... SWSYIVETP	... NADAYVFVGS	... VEPGDKITFE	... LATGLRNIPS	...
A/California/04/2009 (H1N1)v	...	...	...	...	...
A/SaoPaulo/1454/2009 (H1N1)v	...	...	...	...	...
A/Moscow/225/2009 (H1N1)v	...	...	...	...	...
A/Moscow/226/2009 (H1N1)v	...	...	...	...	...
A/Moscow/227/2009 (H1N1)v	...	...	...	...	...



Схематичное изображение пространственной структуры гемагглютинаина штамма A/Moscow/226/2009(H1N1)v с элементами вторичной структуры. Стрелками на модели структуры гемагглютинаина указаны участок рецепторного кармана [6] и аминокислотные остатки Ser100 и Val338, их боковые радикалы окрашены в черный цвет

Чувствительность штаммов пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа к противовирусным препаратам

Штаммы вируса гриппа	Индексы нейтрализации (ИД ₅₀ опыт – ИД ₅₀ контроль, в Ig, ±I ₉₅) вируса при использовании разных доз препаратов									
	Тамифлю			Ингавирин		Римантадин		Реаферон		
	<i>in vitro</i> , (мкг/мл)	<i>in vivo</i> (мг/г)		<i>in vitro</i> (мкг/мл)	<i>in vivo</i> (мг/г)	<i>in vitro</i> (мкг/мл)	<i>in vivo</i> (мг/г)	<i>in vitro</i> (МЕ/мл)	<i>in vivo</i> (МЕ/г)	
	100	10	0,025	200	0,015	10	0,05	250000	100000	100
A/California/04/2009(H1N1)v	2,4±0,4	1,7±0,4	1,3±0,5	0,6±0,2	1,0±0,5	0,5±0,6	0,8±0,5	1,0±0,6	0,9±0,4	0,5±0,5
A/California/07/2009(H1N1)v	2,2±0,4	1,2±0,2	1,3±0,5	0,7±0,3	1,0±0,5	0,5±0,5	0,8±0,5	1,6±0,5	1,2±0,7	0,5±0,5
A/Moscow/225/09(H1N1)v	2,4±0,5	1,2±0,2	1,0±0,5	0,7±0,4	0,8±0,5	0,4±0,7	0,3±0,5	1,4±0,4	1,0±0,3	0,5±0,5
A/Moscow/226/09(H1N1)v	2,1±0,4	1,2±0,2	1,0±0,6	0,8±0,5	0,8±0,6	0,3±0,6	0,3±0,6	1,4±0,4	0,9±0,2	0,5±0,6
A/Novosibirsk/01/09(H1N1)v	2,2±0,4	1,3±0,1	1,0±0,4	0,6±0,2	0,8±0,4	0,7±0,5	0,5±0,4	1,0±0,6	0,9±0,4	0,6±0,4
A/Turkey/Suzdalka/ Nov-1/2005 (H5N1)	2,9±0,4	1,2±0,2	2,0±0,5	1,1±0,2	н/о	1,1±0,5	0,8±0,5	1,2±0,4	0,7±0,5	1,3±0,5
A/Aichi/2/68(H3N2)	2,7±0,4	1,4±0,1	2,3±0,5	0,5±0,4	н/о	0,5±0,4	0,3±0,5	0,8±0,4	0,5±0,3	1,0±0,5

Примечание: n/o – не определяли.

A/California/04/2009(H1N1)v и A/California/07/2009(H1N1)v так же, как и в штаммах A/Moscow/225/2009(H1N1)v, A/Moscow/226/2009(H1N1)v, A/Moscow/227/2009(H1N1)v [3, 4]. Анализ доступных в базе данных GenBank 585 последовательностей гена гемагглютинина показал, что значимых с точки зрения изменения конформации рецепторного «кармана» замен у штаммов пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа не произошло. В позициях 100, 220 и 338 Н гена штаммов, выделенных на территории России, были найдены повторяющиеся мутации. Эти мутации обнаружены в большинстве штаммов пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа, однако в штаммах A/California/04/2009(H1N1)v и A/California/07/2009(H1N1)v, геномы которых были использованы нами как референс последовательности, эти мутации отсутствуют. Интересно отметить, что аминокислота изолейцин в позиции 338 встречается только в последовательностях, содержащих пролин в позиции 100. Аминокислотные замены Pro100Ser и Ile338Val, характерные для штаммов A/Moscow/225/2009(H1N1)v, A/Moscow/226/2009(H1N1)v и A/Moscow/227/2009(H1N1)v, расположены в петлевых районах «ножки» гемагглютинина и, по-видимому, не участвуют ни в связывании гликанов, ни в тримеризации и, следовательно, существенным образом не влияют на структурно-функциональные свойства молекулы гемагглютинина. Кроме того, замена Ile338Val является консервативной, поскольку по своим физико-химическим характеристикам и структурным особенностям эти аминокислотные остатки очень близки.

Таким образом, были изучены свойства трех штаммов пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа, выделенных на территории Российской Федерации, и двух референс штаммов, полученных из CDC. Штаммы пандемического (H1N1) 2009 вируса гриппа репродуцировались в монослойной культуре клеток МДСК, 9–10-дневных РКЭ и легких мышей 4 линий, агглютинировали эритроциты кро-

лика, морской свинки, петуха, барана, гуся и не агглютинировали эритроциты макаки резус. Штаммы вируса гриппа оказались в разной степени чувствительными к действию противогриппозных препаратов, используемых на территории России. На основании анализа первичной последовательности генов и при изучении антигенных свойств выделенных на территории России изолятов показано их близкое родство со штаммами A/California/04/2009(H1N1)v и A/California/07/2009(H1N1)v.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Закс Л. Статистическое оценивание. М.: Статистика; 1976. 118 с.
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармацевтических веществ. Под ред. чл.-корр. РАМН Хабриева Р.У. М.: Медицина; 2005. 832 с.
3. Chandrasekaran A., Srinivasan A., Raman R., et al. Glycan topology determines human adaptation of avian H5N1 virus hemagglutinin. Nat. Biotechnol. 2008; 26:107–13.
4. Chandrasekaran A., Srinivasan A., Raman R., et al. Quantitative biochemical rationale for differences in transmissibility of 1918 pandemic influenza A viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2008; 105:2800–5.
5. Garten R.J., Davis C. T., Russell C.A. et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. Science, sciencexpress. 2009; 1126/1176225:1–10.
6. Matrosovich M., Tuzikov A., Bovin N., et al. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. J. Virol. 2000; 74: 8502–12.
7. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. N. Engl. J. Med. 2009; 360:2605–15.
8. Shinde V., Bridges C.B., Uyeki T.M., et al. Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005–2009. N. Engl. J. Med. 2009; 360:1–10.
9. Zimmer S.M., Burke D.S. Historical perspective – emergence of influenza A (H1N1) viruses. N. Engl. J. Med. 2009; 361: 279–85.

Об авторах:

Онищенко Г.Г. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Москва.

Агафонов А.П., Демина О.К., Сергеев А.А., Терновой В.А., Шишкина Л.Н., Бормотов Н.И., Кабанов А.С., Скарнович М.О., Шиков А.Н., Семенцова А.О., Шестопалов А.М., Шынов С.Н., Ставский Е.А., Дроздов И.Г. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru

G.G.Onischenko, A.P.Agaonov, O.K.Demina, A.A.Sergeev, V.A.Ternovoy, L.N.Shishkina, N.I.Bormotov, A.S.Kabanov, M.O.Skarnovich, A.N.Shikov, A.O.Sementsova, A.M.Shestopalov, S.N.Shpynov, E.A.Stavskiy, I.G.Drozdov

Properties of Pandemic Influenza Virus Strains Isolated in the Territory of Russia

Federal Service for Supervision in the Sphere of Consumer's Rights Protection and Human Welfare, Moscow; State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo

The first cases of the disease caused by pandemic (H1N1) 2009 influenza virus in the territory of the Russian Federation were registered at the end of May, 2009. 3 strains of pandemic (H1N1)2009 influenza virus were isolated from patients. Properties of the strains isolated in the territory of Russia were studied in comparison with those of two reference strains A/California/04/2009(H1N1) and A/California/07/2009(H1N1)v. Analysis of

primary gene sequence and examination of biological properties of the strains isolated in the territory of Russia suggested their close relationship with A/California/04/2009(H1N1)v and A/California/07/2009(H1N1)v strains.

Key words: pandemic (H1N1) 2009 influenza virus, agglutinating activity, antigenic properties, drug resistance.

Authors:

Onischenko G.G. Federal Service for Supervision in the Sphere of Consumer's Rights Protection and Human Welfare. Moscow.

Agaonov A.P., Demina O.K., Sergeev A.A., Ternovoy V.A., Shishkina L.N., Bormotov N.I., Kabanov A.S., Skarnovich M.O., Shikov A.N., Sementsova A.O., Shestopalov A.M., Shpynov S.N., Stavskiy E.A., Drozdov I.G. State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector". 630559, Novosibirsk Region, Koltsovo. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Поступила 22.07.09.

Г.Г.Онищенко¹, В.В.Кутырев², А.В.Топорков², И.Г.Карнаухов², Д.А.Щербаков²,
Е.С.Казакова², С.А.Щербакова²

ОБЕСПЕЧЕНИЕ МОДЕРНИЗАЦИИ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКИХ БРИГАД (СПЭБ) НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ

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

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

Впервые создан, не имеющий аналогов, многофункциональный комплекс мобильных лабораторий на базе автошасси для СПЭБ, предназначенный для работы в зонах ЧС в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Данный уникальный проект осуществлен в ходе поэтапной модернизации специализированных противочумных бригад (СПЭБ) противочумных институтов Роспотребнадзора в свете реализации концепции модернизации СПЭБ и основных принципов функционирования СПЭБ. Показаны структурно-функциональные характеристики комплекса мобильных лабораторий СПЭБ различного профиля на базе автошасси, использованные инженерно-технические средства. Обоснованы соответствующие уровни обеспечения биологической безопасности для каждой лаборатории. Отмечены качественные преимущества лабораторий на базе автошасси и изложен алгоритм обеспечения постоянной готовности мобильного комплекса СПЭБ.

Ключевые слова: СПЭБ, модернизация, лаборатории на базе автошасси, мобильный комплекс СПЭБ, ЧС, биологическая безопасность, санитарно-эпидемиологическое благополучие.

Отправным моментом, предшествующим практической реализации мероприятий по модернизации СПЭБ, явились решения Санкт-Петербургского саммита стран «Группы восьми» (2006 г.) [9]. Этим вопросам отведена значительная роль и в Международных медико-санитарных правилах (2005 г.), в которых в качестве базового принципа для повышения эффективности международных мер реагирования в чрезвычайных ситуациях (ЧС) в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения выступает подход, основанный на укреплении национальных сил и средств оперативного реагирования на такие ЧС [8]. Начиная с 2007 г. во исполнение распоряжения Правительства Российской Федерации от 21 мая 2007 г. № 642-р противочумными институтами Роспотребнадзора осуществляется модернизация 10 специализированных противочумных бригад (СПЭБ) [21].

Мероприятия по модернизации СПЭБ осуществляются в соответствии с приказами Роспотребнадзора: от 20.07.2007 г. № 225 «О совершенствовании организации работы специализированных противочумных бригад, сформированных на базе ФГУЗ «Научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора»; от 22.11.2007 г. № 330 «О Регламенте функционирования СПЭБ» и от 30.12.2008 г. № 1118 «О ходе реализации распоряжения Правительства РФ от 21 мая 2007 г. № 642-р» [17–19], вошедшими в «Сборник нормативно-методических документов по организации работы специализированных противочумных бригад Роспотребнадзора» [28].

В соответствии с планом и концепцией была заложена поэтапная модернизация СПЭБ противочумных институтов. В 2007 г. завершен первый этап. Лабораторная и хозяйственно-бытовая инфраструк-

тура одной бригады в каждом из пяти противочумных институтов сформирована на базе пневмокаркасных модулей, включая автономные системы жизнеобеспечения, современное высокотехнологичное лабораторное и информационно-коммуникационное оборудование, хозяйственное имущество и расходные материалы в соответствии с базовым табелем оснащения, что позволило за короткий срок и без снижения оперативной готовности к проведению противочумных мероприятий модернизировать пять СПЭБ. В 2008–2009 гг. реализуется второй этап – оснащение оставшихся пяти бригад противочумных институтов комплексами мобильных лабораторий СПЭБ различного профиля на базе автошасси (далее – МК СПЭБ).

Вопросу, касающемуся перспективы модернизации СПЭБ противочумных учреждений Роспотребнадзора на базе автошасси, был посвящен целый ряд публикаций, вышедших в 2006 г. [4–6]. В этих работах, в частности, указывалось, что специализированные автолаборатории применяются в ряде зарубежных государств. При этом используются как универсальные автолаборатории РХБ-разведки (радиационной, химической, биологической), так и специализированные машины биологической разведки. Зарубежные автолаборатории биологической разведки используют два основных метода индикации патогенных биологических агентов (ПБА) – ПЦР и ИФА. Применяются также устройства для измерения концентрации и размеров аэрозольных частиц в атмосфере, универсальные комплекты аппаратуры для обнаружения и идентификации ПБА [4–7]. Вместе с тем необходимо отметить, что вышеуказанные автолаборатории находятся на вооружении специальных подразделений силовых министерств и ведомств и их предназначение направлено на установление фактов

преднамеренного применения ПБА – актов биотерроризма. К моменту разработки мобильного комплекса СПЭБ сведения о многопрофильных лабораторных мобильных комплексах на базе автошасси повышенной проходимости, используемые формированиями гражданских служб, которые были бы предназначены для работы не только при биотеррористических актах, но и в условиях чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения, имеющих естественное происхождение (эпидемии и вспышки инфекционных болезней, природные и техногенные катастрофы, социальные конфликты с гуманитарными последствиями) отсутствовали.

Необходимость создания МК СПЭБ была обусловлена потребностью в повышении мобильности, сокращении сроков развертывания бригады, обеспечении в лабораторных подразделениях оптимальных температурных условий для работы персонала и соблюдения требований правил по биологической безопасности не только за счет использования при работе средств индивидуальной защиты, но и современных инженерно-технических решений (фильтровентиляционных установок с фильтрами полной защиты от ПБА, боксов биобезопасности, зонирования помещений с созданием перепада параметров отрицательно давления и др.).

По сути, подготовка к реализации второго этапа модернизации СПЭБ началась еще в 2007 году, когда впервые ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» были составлены технические задания на разработку проектно-сметной документации, которые прошли экспертизу в ФГУЗ «Ставропольский НИПЧИ», ФГУЗ «Противочумный центр», ФГУН ГНЦ ПМБ, ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор», ЦНИИ Эпидемиологии и получили положительное заключение. На основе технических заданий была разработана проектно-сметная документация на МК СПЭБ, являющаяся собственностью Роспотребнадзора в лице РосНИПЧИ «Микроб».

Научная новизна уникальных разработок по созданию МК СПЭБ защищена 6 патентами [10–15].

В 2008 г. ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» совместно с ООО «Автоспектр НН» (Нижний Новгород), на основе разработанной в 2007 г. проектно-сметной документации, создан МК СПЭБ на базе автомашин повышенной проходимости КАМАЗ 43118 и спецавтоприцепов к ним.

Каждая лаборатория на базе автошасси имеет необходимые разрешительные документы:

- санитарно-эпидемиологическое заключение на соответствие зон рабочих мест санитарно-гигиеническим требованиям;
- санитарно-эпидемиологическое заключение на возможность работы с возбудителями инфекционных болезней I–IV групп патогенности;
- сертификат соответствия транспортного средства установленным в Российской Федерации требованиям (одобрение типа транспортного средства).

Структура СПЭБ, укомплектованной мобильными лабораториями на базе автошасси в соответствии с модульным принципом, включает в себя: штабной модуль, лабораторный модуль, состоящий из пяти мобильных лабораторий – лаборатории индикации, лаборатории особо опасных инфекций, бактериологической лаборатории, санитарно-гигиенической лаборатории, блока поддержки бактериологических исследований, а также хозяйственно-бытовой модуль (на базе пневмокаркасов) и транспортный модуль (включающий грузовой и пассажирский автотранспорт в соответствии с базовым табелем оснащения СПЭБ). Автолаборатории, системы обеспечения автономного функционирования, современные модели высокотехнологичного лабораторного и информационно-коммуникационного оборудования представлены на рисунках.

Количество и функциональное предназначение лабораторий МК СПЭБ обусловлены принципом многопрофильности и задачами, выполнение которых в соответствии с Регламентом [28] должна обеспечивать СПЭБ, дислоцированная в зоне чрезвычайной ситуации:

- индикация возбудителей особо опасных и неизвестных инфекций и токсинов;
- бактериологическая диагностика возбудителей особо опасных инфекций;
- бактериологическая диагностика возбудителей инфекционных болезней III–IV групп патогенности;
- санитарно-микробиологические и токсикологические исследования пищевых продуктов, продовольственного сырья, объектов окружающей среды.

При работе в автономном режиме МК СПЭБ ежедневно способен обеспечить в течение двух недель:

- индикацию и идентификацию возбудителей особо опасных инфекционных болезней бактериальной и вирусной этиологии в зависимости от вида материала, вида возбудителя и методов исследования до 500 проб и 3000 анализов в сутки;
- санитарно-микробиологические исследования объектов внешней среды, пищевых продуктов до 100 проб и 500 анализов в сутки.

При этом штабной модуль позволяет эффективно организовать управление лабораторной базой и СПЭБ в целом, осуществлять передачу и обмен информацией в различных форматах как между отдельными модулями МК СПЭБ, так и между СПЭБ и учреждениями Роспотребнадзора, формированиями и учреждениями других ведомств. Доступ в сеть интернет на месте развертывания лагеря СПЭБ осуществляется с помощью наземной станции спутниковой связи, что позволяет организовать высокоскоростной обмен данными в сети интернет. Доступ в сеть интернет и организация локальной беспроводной компьютерной сети для всех модулей СПЭБ осуществляется при помощи интернет центра внутри штабного модуля.

В соответствии с модульным принципом уком-



Мобильный комплекс
СПЭБ



Полученные патенты
на полезную модель



Штабной модуль



Индикационная
лаборатория



Лаборатория особо-
опасных инфекций



Блок поддержки
бактериологических исследований



Бактериологическая
лаборатория



Санитарно-гигиеническая
лаборатория



Спутниковый телефон



Бокс биологической безопасности II класса



Бокс биологической безопасности III класса



Оборудование для РТ-ПЦР



Вентилируемая клетка для лабораторных животных



Микробиологический анализатор



Микробиологический анализатор



Люминисцентный микроскоп

плектования лаборатории МК СПЭБ могут задействоваться как в полном, так и неполном составе, в различном сочетании, в зависимости от стоящих задач и, таким образом, в полной мере вписываются в научно обоснованную тактику применения СПЭБ в не зависимости от способа комплектации бригады (пневмокаркасными модулями или модулями на базе автошасси) [4, 9].

Штатная структура СПЭБ на базе автошасси так же, как и на базе пневмокаркасов, включает 38 человек: из них 27 – это специалисты лабораторных модулей и штабного модуля, 7 – специалисты инженерно-хозяйственного отделения (водители и инженер) и 4 – специалисты эпидемиологического отделения (эпидемиологи, паразитолог, врач-инфекционист).

Все лаборатории МК СПЭБ в структурном отношении являются сложными инженерно-техническими сооружениями. Вопросы инженерно-технического оснащения лабораторий МК СПЭБ решались, прежде всего, исходя из необходимости реализации таких принципов функционирования СПЭБ, как мобильность, автономность, высокая технологичность и биологическая безопасность.

Все несъемное лабораторное оборудование (термостаты, холодильники, сухожаровые шкафы, боксы биологической безопасности, автоклавы, лабораторная мебель) имеют крепления для обеспечения надежной фиксации в ходе передвижения лабораторий. Предусмотрена также возможность фиксации в движении съемного аналитического лабораторного оборудования. Учитывая, что принцип мобильности подразумевает не только способность СПЭБ к передвижению, но и минимизацию временного интервала от начала приведения СПЭБ в готовность до начала работы в зоне ЧС, можно констатировать, что использование МК СПЭБ повышает показатели мобильности.

Для реализации принципа автономности все модули МК СПЭБ оснащены системами автономного жизнеобеспечения: энергоснабжения, водоснабжения, вентиляции, обогрева и кондиционирования.

Системы энергоснабжения лабораторий МК СПЭБ укомплектованы автономными бензиновыми электрогенераторами, мощность которых достаточна для обеспечения функционирования всего стационарного и съемного аналитического оборудования лабораторий. Были использованы бензиновые, а не дизельные электрогенераторы, так как первые имеют при аналогичной мощности меньшие габариты и вес. В целях обеспечения выполнения требований СН 2.2.4/2.1.8.562-96, регламентирующих уровень шума на рабочих местах [27], при работе автономные электрогенераторы вынимаются из генераторных отсеков и с помощью механических приспособлений спускаются на землю, что позволяет уменьшить вибрацию и шум. Предусмотрена возможность энергоснабжения лабораторий от стационарных электросетей. На случай аварийного отключения электропитания предусмотрены системы резервного и аварийного электро-

питания (включающие дополнительные и резервные аккумуляторные батареи, инверторы напряжения), позволяющие обеспечить работу фильтровентиляционных систем и освещения в лабораториях на период ликвидации аварии.

Все компоненты систем энергоснабжения лабораторий МК СПЭБ выполнены в соответствии с требованиями ГОСТ 12.2.025-76 [3].

Системы освещения лабораторий МК СПЭБ обеспечивают выполнение требований СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278-03, регламентирующих требования к естественному, искусственному и совмещенному освещению жилых и общественных зданий [26].

Системы автономного водоснабжения лабораторий МК СПЭБ имеют емкости для хранения и транспортировки воды объемом 200 л и бойлеры для нагрева воды, что позволяет обеспечить функционирование санпропускников с душем, которыми оборудованы все лаборатории в соответствии с требованиями санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.1285-03 и СП 1.3.2322-08 [22, 23].

В соответствии с требованиями российских нормативных документов и требованиями Всемирной организации здравоохранения [16, 22, 23], в целях предотвращения контаминации окружающей среды, все лаборатории МК СПЭБ оборудованы подогреваемыми емкостями для слива воды с возможностью проведения химической дезинфекции сточных вод.

Системы вентиляции, обогрева и охлаждения (кондиционирования) воздуха в лабораториях МК СПЭБ спроектированы исходя из требований СанПиН 2.2.4.548-96, определяющих требования к микроклимату помещений и СНИП 41-01-2003, определяющих требования к системам отопления, вентиляции и кондиционирования [24, 25], что позволяет обеспечить необходимую кратность воздухообмена и поддерживать температуру в рабочих помещениях в пределах +20–22 °С.

Системы вентиляции в лабораториях МК СПЭБ представлены приточными, переточными и вытяжными вентиляционными блоками.

Для обогрева воздуха в помещениях лабораторий индикации и особо опасных инфекций используются автономные дизельные отопители и жидкотопливные дизельные котлы. В остальных лабораториях мобильного комплекса система обогрева представлена системами кондиционирования (или сплит-системами) и автономными бензиновыми отопителями. Сплит-системы задействуются при температуре окружающего воздуха не ниже -5 °С. Автономные отопители, имеющиеся во всех лабораториях МК СПЭБ, позволяют поддерживать положительную температуру в рабочих помещениях в режиме «на марше», что существенно сокращает время подготовки комплекса к работе в зоне ЧС.

Система охлаждения (кондиционирования) воздуха в помещениях лабораторий МК СПЭБ представлена в лабораториях индикации и особо опасных инфекций холодильными установками (или чиллера-

ми), в остальных лабораториях – системами кондиционирования (или сплит-системами).

Необходимо отметить, что в лабораториях индикации и особо опасных инфекций система вентиляции, обогрева и охлаждения принципиально отличается от других лабораторий – нагрев (жидкотопливными дизельными котлами) или охлаждение (чиллерами) приточного воздуха осуществляется до его поступления в помещения лабораторий. Это связано с тем, что при высоких показателях воздухообмена в указанных лабораториях (порядка 1200–1500 м³ в час) автономные обогреватели и сплит-системы не в состоянии обеспечить необходимый температурный режим.

При работе МК СПЭБ обеспечивается необходимый уровень защиты персонала и окружающей среды, что реализуется за счет наличия ряда инженерно-технических средств:

- боксов биологической безопасности 3-го класса защиты (в лабораториях индикации и особо опасных инфекций);
- боксов биологической безопасности 2-го класса защиты в лаборатории индикации, бактериологической и санитарно-гигиенической лабораториях;
- шкафа с вентилируемыми клетками для содержания лабораторных животных, оборудованными фильтрами тонкой очистки (в лаборатории особо опасных инфекций);
- санпропускников с душем и взаимоблокировкой дверей во всех лабораториях;
- систем создания пониженного давления в рабочих помещениях лабораторий индикации и особо опасных инфекций с наличием визуальной и звуковой сигнализации на случай повышения давления выше критического;
- фильтровентиляционных систем, оборудованных фильтрами тонкой очистки (HEPA – фильтрами) 13–14-го классов защиты во всех лабораториях;
- бактерицидных облучателей рециркуляторного типа и передвижных бактерицидных облучателей открытого типа во всех лабораториях;
- автоклава для деконтаминации биологических отходов в блоке поддержки бактериологических исследований;
- систем, позволяющих осуществлять сбор и химическую дезинфекцию сточных вод во всех лабораториях;
- оборудования для проведения дезинфекционной обработки;
- средств индивидуальной защиты персонала.

Вышеуказанные инженерно-технические средства позволяют обеспечить в соответствии с критериями ВОЗ в лабораториях индикации и особо опасных инфекций уровень биологической безопасности BSL-3, а в бактериологической и санитарно-гигиенической лабораториях – BSL-2.

Лаборатории мобильного комплекса полностью отвечают требованиям санитарно-эпидемиологических правил 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» и должны в соответствии с приказом Роспотребнадзора от 30.12.2008 г. № 1118 в установленном порядке проходить аккредитацию на соответствие общим требованиям, установленным в международном стандарте ИСО/МЭК 17025 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий» [2, 19, 22, 23].

При создании МК СПЭБ был реализован такой важнейший принцип, как высокая технологичность. В его основе лежит, во-первых, использование наиболее современных материалов, оборудования и технологий в ходе создания самих мобильных лабораторий, их систем жизнеобеспечения. Во-вторых, это, конечно, применение самых современных диагностических технологий и методов лабораторного исследования.

Лаборатории МК СПЭБ укомплектованы съемным аналитическим лабораторным оборудованием:

- для ПЦР в классическом варианте (амплификатор, оборудование для электрофореза и система учета результатов);
- для проведения ПЦР в режиме реального времени (RT-ПЦР);
- для ИФА (термошейкеры, промыватели планшетов, ридеры);
- для МФА (люминисцентные микроскопы);
- для микробиологического анализа воды и пищевых продуктов, для идентификации микроорганизмов и определения чувствительности к антибактериальным препаратам (автоматические микробиологические анализаторы);
- для проведения анализа атмосферного воздуха.

Необходимо отметить, что в разделе 9.2. «Регламента функционирования СПЭБ» [28] даны наименования как съемного, так и несъемного оборудования лабораторий на базе автошасси без указания моделей, что позволило при укомплектовании лабораторий съемным аналитическим оборудованием приобретать наиболее современные и высокотехнологичные аналоги.

В соответствии с п. 8 «Положения о СПЭБ ФГУЗ «Научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора», утвержденного приказом Роспотребнадзора от 20.07.2007 г. № 225 [17], эксплуатация и техническое обслуживание аналитического лабораторного оборудования в период отсутствия чрезвычайных ситуаций осуществляется в функциональных подразделениях противочумных институтов. Это чрезвычайно важно как с экономической точки зрения, поскольку позволяет избежать простоя дорогостоящего оборудования, так и с точки зрения подготовки кадров, так как в режиме повседневной деятельности специалисты СПЭБ работают на том же лабораторном оборудовании, что и в режи-

ме чрезвычайной ситуации.

В 2008–2009 гг. в РосНИПЧИ «Микроб» проведены испытания МК СПЭБ в соответствии с межгосударственным стандартом ГОСТ 16504-81 «Система государственных испытаний и контроль качества продукции. Основные термины и определения», которые включали в себя приемосдаточные испытания, испытания на транспортабельность, функциональные и эксплуатационные испытания [1].

В ходе проведения функциональных испытаний осуществлялась проверка работы всех систем жизнеобеспечения мобильных лабораторий СПЭБ, проверка работоспособности несъемного оборудования и съемного аналитического оборудования при питании как от генераторов, так и от стационарной электросети, проводилась оценка функциональных возможностей модулей, обеспечения требований биологической безопасности, эргономических характеристик.

В ходе эксплуатационных испытаний МК СПЭБ проводилась оценка функциональных возможностей и производственной мощности лабораторий МК СПЭБ при работе комплекса в целом, в полевых условиях, в автономном режиме, а также оценка материальных затрат при работе МК СПЭБ в автономном режиме.

В результате проведения эксплуатационных испытаний МК СПЭБ установлено, что функциональные возможности лабораторий МК СПЭБ в целом соответствуют заявленным тактико-техническим характеристикам.

Все несъемное и съемное лабораторное оборудование лабораторий МК СПЭБ, системы жизнеобеспечения функционируют в штатном режиме как при питании от автономных генераторов, так и при питании от стационарной электросети.

Конструктивные особенности лабораторий МК СПЭБ, имеющееся оборудование и технические средства позволяют в полной мере обеспечить выполнение требований биологической безопасности.

Эргономические характеристики лабораторий МК СПЭБ (планировка помещений, температурный режим, уровень освещенности) позволяют создать оптимальные условия для работы персонала.

Проведение испытаний показало, что цель, ставившаяся при создании МК СПЭБ и связанная с некоторыми недостатками пневмокаркасных палаток, достигнута. Лаборатории на базе автошасси имеют ряд преимуществ по сравнению с пневмокаркасными палатками:

- низкая трудоемкость и меньшее время развертывания (в 2 раза) лабораторных подразделений;
- адекватное обеспечение требований правил по биологической безопасности в результате надежной изоляции помещений, наличия фильтровентиляционных систем и боксов биологической безопасности;
- обеспечение в помещениях лабораторий оптимальных, комфортных условий для работы персонала в любых климатических зонах.

После оснащения РосНИПЧИ «Микроб» мо-

бильным комплексом лабораторий на базе автошасси и проведения его испытаний одной из основных задач является обеспечение постоянной готовности МК СПЭБ.

Обеспечение постоянной готовности МК СПЭБ подразумевает:

- обеспечение и поддержание исправности технических средств (автотранспортные средства, инженерно-технические системы мобильных лабораторий);
- обеспечение подготовки специалистов СПЭБ на регулярной основе;
- финансовое обеспечение мероприятий по техническому обслуживанию МК СПЭБ и его эксплуатации;
- наличие ангаров для хранения автотранспорта МК СПЭБ.

Необходимость обеспечения и поддержания исправности технических средств МК СПЭБ требует введения приказом по учреждению графика проведения в течение года регламентных работ по готовности технических средств с персональным закреплением ответственности специалистов и включающих:

- обеспечение исправности автотранспортных средств МК СПЭБ;
 - проведение мероприятий по подготовке МК СПЭБ к хранению в зимний период;
 - периодическую проверку функционирования систем жизнеобеспечения лабораторий МК СПЭБ.
- Чрезвычайно важным является своевременное проведение мероприятий по подготовке лабораторий МК СПЭБ к хранению в зимний период, а именно:
- обеспечение слива воды из систем водоснабжения лабораторий, снятие фильтров очистки воды в душевых отсеках, продувка систем сжатым воздухом;
 - хранение всех аккумуляторных батарей в отапливаемом помещении, периодическая проверка их плотности и состояние зарядки;
 - обработка всех замков входных дверей, дверей аварийного выхода, дверей тамбуров, технических отсеков специальной смазкой, предохраняющей от замерзания.

Подготовка специалистов СПЭБ должна осуществляться прежде всего с учетом принципа универсальности, что предполагает совмещение двух или более профессий. Необходима подготовка водителей СПЭБ по совмещению профессий дезинфекторов, электриков, автомехаников. Специалисты лабораторий МК СПЭБ могут совмещать профессии бактериолога и вирусолога.

Неотъемлемым элементом для поддержания практических навыков работы в модулях СПЭБ является проведение плановых полевых учений и в мае 2009 г. ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» провел такие учения с полным развертыванием одной СПЭБ, оснащенной новыми модулями на базе автошасси. В ходе учений проводилась отработка навыков автономной работы в условиях конкретной чрезвычайной ситуа-

ции (в соответствии с легендой в зоне наводнения) с решением тактических задач лабораторных подразделений СПЭБ на базе автошасси, осуществлялось проведение диагностических лабораторных исследований шифрованных проб. В соответствии с планом учений, было направлено на исследование и проведен анализ 45 проб биологического материала и объектов окружающей среды. Установлено, что все оборудование лабораторий мобильного комплекса СПЭБ, системы жизнеобеспечения функционируют в штатном режиме, а функциональные возможности лабораторий на базе автошасси позволяют в полном объеме, в соответствии с Регламентом функционирования СПЭБ, выполнять тактические задачи по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения, стоящие перед СПЭБ в конкретной ситуации. Учения СПЭБ, модернизированной на базе автошасси, показали тактические преимущества по сравнению с пневмокаркасными системами (ПКС):

- время приведения СПЭБ в готовность к выдвигению в зону ЧС (в полном составе) на базе ПКС – 24 ч, на базе автошасси – 15 ч;

- время развертывания СПЭБ на месте дислокации (в полном составе) на базе ПКС – 24 ч, на базе автошасси – 12 ч.

Таким образом, от идеи до создания первого комплекта уникальных мобильных лабораторий прошло всего 2,5 года. Опыт, полученный РосНИПЧИ «Микроб» в ходе оснащения СПЭБ комплексом мобильных лабораторий различного профиля на базе автошасси, проведения его первичных испытаний, а также учений показал не только хорошие эксплуатационные качества, но и готовность к выполнению регламентированных задач и позволяет сделать вывод о том, что мобильный комплекс СПЭБ – это выход лабораторной базы СПЭБ на качественно новый технологический уровень, позволяющий наиболее полно реализовать все основные принципы функционирования СПЭБ; адекватно в полевых условиях обеспечить выполнение требований правил по биологической безопасности; улучшить тактические характеристики СПЭБ; обеспечить оптимальные, комфортные условия для работы персонала в любых климатических зонах.

Оснащение в 2009 г. СПЭБ противочумных институтов Роспотребнадзора аналогичными мобильными комплексами позволит более эффективно, оперативно и качественно выполнять задачи по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения на территории Российской Федерации и за рубежом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ГОСТ 16504-81. Система государственных испытаний и контроль качества продукции. Основные термины и определения.
2. ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025–2006. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий.
3. ГОСТ 12.2.025-76. Система стандартов безопасности труда. Изделия медицинской техники. Электробезопасность.

4. Кутырев В.В., Федоров Ю.М., Топорков А.В., Топорков В.П., Карнаухов И.Г., Старишинов В.А. Укрепление глобальной сети по предупреждению и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций: модернизация специализированных противозидемических бригад (СПЭБ) противочумных учреждений. Пробл. особо опасных инф. 2006; 2(92):10–5.

5. Кутырев В.В., Федоров Ю.М., Топорков А.В., Топорков В.П., Карнаухов И.Г. Модернизация специализированных противозидемических бригад (СПЭБ) противочумных учреждений на современном этапе. В кн.: Матер. VII межгос. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ; 3–5 октября 2006 г.; Оболенск. Протокол: А-ПРИНТ ЗАО; 2006. С. 41–3.

6. Кутырев В.В., Топорков А.В., Карнаухов И.Г., Топорков В.П. Некоторые аспекты совершенствования принципов организации и функционирования специализированных противозидемических бригад противочумных учреждений Роспотребнадзора. Медицина катастроф. 2006; 4(56):48–53.

7. Кутырев В.В., Топорков А.В., Карнаухов И.Г. Применение мобильных лабораторий для противозидемического обеспечения населения в условиях чрезвычайных ситуаций. Пробл. особо опасных инф. 2007; 1(93):27–9.

8. Международные медико-санитарные правила (2005 г.).

9. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Топорков А.В., Куличенко А.Н., Топорков В.П. Специализированные противозидемические бригады (СПЭБ): опыт работы и тактика применения в современных условиях. Пробл. особо опасных инф. 2008; 4(98):5–14.

10. Патент на полезную модель № 66723 «Мобильный противозидемический комплекс». Опубликовано: 27.09.2007 г. Бюл. № 27.

11. Патент на полезную модель № 65434 «Лаборатория санитарно-гигиенических исследований». Опубликовано: 10.08.2007 г. Бюл. № 22.

12. Патент на полезную модель № 65435 «Бактериологическая лаборатория». Опубликовано: 10.08.2007 г. Бюл. № 22.

13. Патент на полезную модель № 65833 «Блок поддержки бактериологических исследований». Опубликовано: 27.08.2007 г. Бюл. № 24.

14. Патент на полезную модель № 65436 «Лаборатория индикации». Опубликовано: 10.08.2007 г. Бюл. № 22.

15. Патент на полезную модель № 65437 «Лаборатория особо опасных инфекций». Опубликовано: 10.08.2007 г. Бюл. № 22.

16. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях. Третье издание. ВОЗ, Женева, 2004.

17. Приказ Роспотребнадзора от 20.07.2007 г. № 225 «О совершенствовании организации работы специализированных противозидемических бригад, сформированных на базе ФГУЗ «Научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора»

18. Приказ Роспотребнадзора от 22.11.2007 г. № 330 «О Регламенте функционирования СПЭБ»

19. Приказ Роспотребнадзора от 30.12.2008 г. № 1118 «О ходе реализации распоряжения Правительства РФ от 21 мая 2007 г. № 642-р»

20. Пухов Ю.М., Москвитина Э.А. Исследование функций и организационной структуры специализированной противозидемической бригады противочумных учреждений с использованием системного подхода. Здоровье населения и среда обитания. 2007; 6(171): 26–31.

21. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 21.05.2007 г. № 642-р о финансировании мероприятий по модернизации СПЭБ.

22. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» СП 1.3.1285-03.

23. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» СП 1.3.2322-08.

24. Санитарные правила и нормы «Гигиенические требования к микроклимату производственных помещений» СанПиН 2.2.4.548-96.

25. Санитарные нормы и правила «Отопление, вентиляция и кондиционирование» СНиП 41-01-2003.

26. Санитарные правила и нормы «Гигиенические требования к естественному, искусственному и совмещенному освещению жилых и общественных зданий» СанПиН 2.2.1/2.1.1.1278-03.

27. Санитарные нормы «Шум на рабочих местах, в помещениях жилых, общественных зданий и на территории жилой застройки» СН 2.2.4/2.1.8.562-96.

28. Сборник нормативно-методических документов по организации работы специализированных противозидемических бригад Роспотребнадзора. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Саратов: ОАО «Приволжское издательство»; 2008. 216 с.

Об авторах:

Онищенко Г.Г. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Москва.

Кутырев В.В., Топорков А.В., Карнаухов И.Г., Щербakov Д.А., Казакова Е.С., Щербakova С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

G.G.Onischenko, V.V.Kutyrev, A.V.Toporkov, I.G.Karnaukhov,
D.A.Scherbakov, E.S.Kazakova, S.A.Scherbakova

**Provision of Specialized Anti-Epidemic Teams (SAET)
Modernization at the Present Stage**

*Federal Service for Supervision in the Sphere of Consumer's Rights
Protection and Human Welfare, Moscow; Russian Research Anti-Plague
Institute "Microbe", Saratov*

A unique, many-functional complex of mobile laboratories for SAET on the basis of cross-country chassis was created for the first time. The complex is designed for work in the areas of ES in the sphere of sanitary and epidemiologic welfare of the population. This unparalleled project was carried out

in the course of step-by-step modernization of the specialized anti-epidemic teams (SAET) of the Rospotrebnadzor anti-plague institutes in the light of implementation of the conception of SAET modernization and main principles of SAET functioning. Presented are structural and functional characteristics of the complex of SAET mobile laboratories on the basis of cross-country chassis, and engineering and technical means used. Substantiated are relevant levels of biological safety provision for every laboratory. Qualitative advantages of the laboratories on the basis of cross-country chassis are marked, and algorithm of provision of constant readiness of SAET mobile complex is presented.

Key words: SAET, modernization, laboratories on the basis of cross-country chassis, SAET mobile complex, ES, biological safety, sanitary and epidemiologic welfare.

Authors:

Onischenko G.G. Federal Service for Supervision in the Sphere of Consumer's Rights Protection and Human Welfare, Moscow

Kutyrev V.V., Toporkov A.V., Karnaukhov I.G., Scherbakov D.A., Kazakova E.S., Scherbakova S.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 28.08.09.

Г.Р.Базарова, А.С.Неъматов, О.А.Хусанов, С.Ахмадбек кизи**ОПТИМИЗАЦИЯ ЭПИДРАЗВЕДКИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ЭПИЗООТИЙ
В КЫЗЫЛКУМСКОМ АВТОНОМНОМ ОЧАГЕ ЧУМЫ В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ
В ПРЕДЕЛАХ УЗБЕКИСТАНА***Центр профилактики карантинных и особо опасных инфекций
Министерства здравоохранения Республики Узбекистан, Ташкент*

Кызылкумский автономный очаг чумы, значительная часть которого расположена на территории Республики Узбекистан, всегда отличался периодическим развитием острых разлитых эпизоотий и возникновением эпидосложнений. Эпидразведка состоит из широкой рекогносцировки с визуальной оценкой эпизоотологических факторов и сбора материала из свежих погадок для серологического исследования. При обнаружении трупов носителей, подозрительных на наличие зараженности их чумой, производится сбор образцов в спирт для последующего исследования в реакции ПЦР.

Ключевые слова: Кызылкумский очаг чумы, эпидразведка, природная очаговость.

Несмотря на длительный период наблюдений и практической работы, активизация эпизоотий в природных очагах чумы остается достаточно острой проблемой для противочумных организаций. Появление основательных теоретических разработок оказывает малое влияние на практическую противоэпидемическую деятельность [4, 11]. В современных социально-экономических условиях необходима оптимизация эпидразведки и прогнозирования конкретных эпизоотологических проявлений – основы для сохранения эпидемиологического благополучия.

Кызылкумский автономный очаг чумы, значительная часть которого расположена на территории Республики Узбекистан, всегда отличался периодическим развитием острых разлитых эпизоотий с регулярным возникновением эпидемиологических осложнений.

Однако ситуация здесь как в эпизоотологическом, так и в эпидемическом отношениях в начале XXI века существенно изменилась. В связи с прогрессирующей аридизацией и вековым потеплением климата изменились не только ареалы некоторых носителей, но наблюдалось и особенное изменение структуры сообществ грызунов и хода их многолетней динамики численности [3, 6]. В целом наблюдается тенденция удлинения межэпизоотических периодов. Изменились и обострились социальные проблемы, в частности, произошло значительное территориальное перераспределение населения, связанное с его современной приуроченностью к относительно немногочисленным постоянным источникам пресной воды. Существенно уменьшилось движение населения собственно по пустыне, а ряд труднодоступных участков стал практически не посещаемым людьми.

Из особенностей эпизоотологической разведки в современных условиях отметим общее сокращение финансирования и, как следствие, сокращение общего объема наблюдений. Произошло и территориаль-

ное сокращение гидрометеорологической информации, что привело к нарушению точности климатических прогнозов и их качественному ухудшению. Вышеуказанное отразилось на оценке состояния и прогнозирования динамики эпизоотологических факторов в природном очаге.

Более чем полувековой опыт изучения эпизоотологических особенностей природной очаговости чумы на нашей территории позволяет достаточно обоснованно и корректно предложить методы оценки имеющейся ситуации в каждый конкретный период. Особо отметим, что мы не рассматриваем возможные механизмы длительного сохранения возбудителя в межэпизоотический период. Нами сделан упор на разведку и прогнозирование эпизоотий чумы, которые в Кызылкумском очаге развиваются периодически, охватывают огромные территории и, как правило, являются причиной эпидемиологических осложнений. Среди последних одним из ведущих эпидемиологических факторов играют верблюды, однако установлено, что верблюды в условиях Кызылкумов заражаются чумой только в период интенсивных эпизоотий. В связи с этим во время эпидразведки органы трупа найденного верблюда рекомендуем лабораторно исследовать методом ПЦР [1, 8, 10].

Оптимизация производственных процессов эпидразведки, прогнозирования и профилактики в природном очаге чумы Кызылкумов требует реальной переоценки многих применяемых ранее методов. Ушло в прошлое выставление крупных эпидбригад, основанных на широком использовании авиации, обследование, почти повсеместное, всей территории очага два раза в год. Стали невозможными, по ряду объективных причин, массовые бактериологические исследования за один обследовательский сезон десятков тысяч носителей и сотен тысяч переносчиков чумы.

Исходя из предпосылок на существование при-

родных очагов чумы в эпизоотийной фазе как на функцию отдельных видов грызунов, их многовидовых сообществ, всю систему эпидразведки и профилактики мы планируем и строим путем наблюдения за двумя значимыми, для существования чумы, сообществами грызунов. Из них «Туранское псаммофильное сообщество грызунов» занимает 54 % нашей очаговой территории, а «Поливидовое сообщество песчанок Турана» – 41 % территории [5, 7]. Некоторые другие сообщества грызунов Узбекистана или не имеют значения для циркуляции возбудителя чумы, или играют временную очень ограниченную роль. Так, в сообществе грызунов «Подгорных равнин Памиро-Алая» в локальных ареалах Центральных Кызылкумов, в частности на подгорных равнинах аридных низкогорий, возможна временная пролонгация сроков циркуляции возбудителя чумы в популяциях желтого суслика на год и больше, но существенного эпизоотологического значения это не имеет.

Визуальные эпизоотологические рекогносцировки, охватывающие достаточно обширные территории всего набора ландшафтно-эпизоотологических районов, хорошо обоснованных и полностью разработанных для Кызылкумского автономного очага чумы [7, 9], являются на современном этапе основой производственной эпидразведки. Этим методом можно в относительно короткие сроки и ограниченным составом участников получить корректную реальную оценку состояния эпизоотических факторов и динамику их развития. В рекогносцировках проводится не только оценка численности носителей и переносчиков чумы, но и сбор материала для их серологического анализа (пробы крови на мертиолятных бумажках). Проводится и сбор переносчиков – блох. Одновременно отметим, что сбор свободноживущих стадий иксодовых клещей на бактериологическое исследование в очагах чумы малоцелесообразно и нами не рекомендуется. Эти переносчики питаются однократно в каждую из активных стадий – личинки, нимфы и имаго. Напившись крови, клещи уходят в землю и проходят метаморфоз в следующую возрастную стадию. Таким образом, возбудитель чумы не имеющий способности к трансстадиальной и, тем более, трансовариальной передаче, не выявляется и исследование свободноживущих особей клещей любых возрастов на чуму совершенно не целесообразно.

В конце прошлого столетия в наших условиях нашло широкое применение для первичной консервации органов грызунов и эктопаразитов, их сохранения в замороженном виде с использованием сосудов Дюара. Это позволило существенно сократить расходы на частую и регулярную доставку полевого материала в бактериологические лаборатории. В полевой группе очесывались и вскрывались грызуны и по мере заполнения сосуда Дюара материалом его отправляли самолетом, доставлявшим новый запаянный сосуд азотом. Специально отметим, что мы имели многочисленные случаи выделения возбудителя чумы из собранных и замороженных органов гры-

зунов и эктопаразитов. В настоящее время, в связи с резким удорожанием услуг авиации и сложностями постоянной заправки сосудов Дюара, использование этой методики при плановых обследованиях природного очага признано нецелесообразным.

Сбор погадок и костных остатков носителей чумы, достаточно широко применявшийся ранее для ретроспективного анализа пространственного распределения возбудителя чумы, в новых условиях имеет ограниченное применение и только с целью анализа эпизоотийной ситуации для данного конкретного отрезка времени. Целесообразен сбор относительно свежих, не разрушенных погадок хищных птиц и сов, что гарантирует их сравнительно небольшой срок существования. В таких условиях удастся обнаруживать серологически диагностируемые остатки. Сбор костей на норах грызунов и разрозненных костных остатков в местах бывшего нахождения пернатых хищников не давал положительных на чуму находок. С другой стороны, в условиях хорошо изученной за полувековой период природно-очаговой территории не давал и полезной дополнительной информации, даже в случаях положительного результата, так как не был привязан к определенному отрезку времени.

По результатам эпизоотологических рекогносцировок обосновывается прогноз развития ситуации – кратковременный и долгосрочный, а также конкретная программа дальнейших исследований.

Один из важнейших методов эпизоотологической разведки – поиск и сбор трупов грызунов. Внедрение в противочумную практику новых технологий, в частности применение метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяет несколько уточнить и оптимизировать эпизоотологическую разведку [2]. В частности, в реакции возможна диагностика возбудителя чумы от проб органов животных, хранящихся в спирте, что дает возможность относительно длительно хранить полевой материал, собранный в эпизоотологических рекогносцировках, особенно пробы, взятые от трупов грызунов и эктопаразитов, собранных с них. В наших условиях наиболее целесообразно исследование с применением реакции ПЦР в стационарных лабораториях Центра профилактики карантинных и особо опасных инфекций и его отделений.

В связи с этим мы предлагаем перейти на принципиально новую систему эпидразведки и прогнозирования Кызылкумского автономного очага чумы. Основная деятельность должна быть направлена на мониторинг эпизоотических факторов, связанных с носителями и переносчиками. В основу должна быть положена оценка состояния сообществ грызунов, играющих ключевую роль в жизни природного очага. Нужно понимать, что в песчаных массивах, в «Туранском псаммофильном сообществе грызунов», имеет место относительная регулярная цикличность динамики численности доминирующих и субдоминирующих видов. Эпизоотии развиваются только в период высокой численности полуденной песчанки и

следующего за ней пика численности больших песчанок. Они достигают максимального развития на спаде численности больших песчанок и «исчезают» на 4–5 лет. В «Поливидовом сообществе песчанок Турана» эпизоотии протекают по другому принципу: чередование благоприятных для грызунов мягких зим и относительно прохладного и влажного летнего периода, особенно если это наблюдается последовательно в 2 и более сезонов. Обусловливается это почти синхронно, до 100-кратного возрастания численности сразу трех видов песчанок – большой, краснохвостой и полуденной, что всегда вызывает интенсивные, но относительно кратковременные эпизоотии. Пик этих эпизоотий, прогнозируемый по анализу климатических факторов, имеет наибольшее эпидемиологическое значение. Периодичность подобных взрывных численностей определялась с периодичностью в 12–15 лет. Отметим, что потепление климата удлинит и этот межэпизоотический период.

Специфические профилактические мероприятия силами противочумной службы могут планироваться только как экстренные мероприятия и имеют ограниченный локальный характер. Наш опыт показал, что никакие объемы заблаговременных мероприятий (полевая дератизация и дезинсекция) в естественных условиях природного очага не оказывают никакого сдерживающего влияния на развитие эпизоотий. В то же время поселковая дератизация и дезинсекция в населенных пунктах Кызылкумов должна осуществляться достаточно регулярно силами общей санитарно-эпидемиологической службы.

Таким образом, эпидразведка, направленная на выявление периодически возникающих эпизоотий в природном очаге Кызылкумов, складывается из следующих последовательных компонентов:

- широкие эпизоотологические рекогносцировки природного очага чумы с визуальной оценкой эпизоотологических факторов на хорошо изученных ключевых участках с задачей обоснованного прогнозирования и раннего выявления эпизоотий;

- при проведении рекогносцировок производится сбор материала от носителей, переносчиков, а также свежего погачного материала для последующего серологического изучения в стационарных лабораториях;

- при обнаружении трупов носителей и эктопаразитов, подозрительных на наличие зараженности их чумой, производится сбор образцов в спирт для последующего исследования в реакции ПЦР;

- только при обнаружении эпизоотии исследование территории проводится противэпидемическими отрядами по стандартным методикам противочумного эпизоотологического обследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Базарова Г.Р. Эпидемиологический надзор по чуме за поголовьем верблюдов в Кызылкумском природном очаге чумы. В кн.: Современные аспекты острых кишечных инфекций: Республиканская научно-практ. конф. Ташкент; 2006. С. 23.
2. Базарова Г.Р. Этапы выделения ДНК при изучении молекулярного генетического метода возбудителя чумы. Патология. Ташкент; 2008; 4:82–3.
3. Каримова Т.Ю., Неронов В.М. Природные очаги чумы Палеарктики. М.; 2007. 199 с.
4. Митропольский О.В. Пространственная и структурная организация сообществ животных [докл. на соискание уч. степени д-ра биол. наук по совокупности опубликованных работ. Ташкент; 1994. 48 с.
5. Митропольский О.В. Вековое потепление климата и изменения ареалов птиц и млекопитающих в Средней Азии. Selevinia 2008. Алматы; 2009. С. 113–22.
6. Митропольский О.В., Беляева С.И., Хайдаров И.Х., Пак М.И. Многолетняя динамика численности грызунов на юге Бухарской области (преимущественно по данным работы Денгизкульского стационара). В кн.: Биоразнообразие Узбекистана – мониторинг и использование. Ташкент; 2007. С. 156–62.
7. Нейматов А.С., Ривкус Ю.З., Базарова Г.Р., Машарипов С.М. Структурный анализ эпидемий чумы в природном Центральноазиатском пустынном регионе, социально-экологическая структура заболеваемости людей чумой. Инфекция, иммунитет и фармакология. Ташкент; 2001; 1:34–7.
8. Ривкус Ю.З., Митропольский О.В., Беляева С.И., Урманов Р.А. Особенности развития эпизоотий чумы среди грызунов Кызылкумов. Фауна и экология грызунов. М.; 1985; 16:5–106.
9. Ривкус Ю.З., Хотько Н.И., Наумов А.В., Гельдыев А. Эпидемиология и профилактика чумы. Ашхабад; 1992. 239 с.
10. Сулейменов Б.М. Механизм энзоотии чумы. Алматы; 2004. 234 с.
11. Талских В.Н., Митропольский О.В. Реакция биологического разнообразия на изменения климата и меры адаптации. Бюл. н.-и. Гидрометеорологического института: Последствия изменения климата в Узбекистане, вопросы адаптации. Ташкент; 2008; 7:62–7.

Об авторах:

Базарова Г.Р., Нейматов А.С., Хусанов О.А., Ахмадбек кизи С. Центр профилактики карантинных и особо опасных инфекций Министерства здравоохранения Республики Узбекистан. 100169, Ташкент, ул. Эшон Бобохон, 2. E-mail: gulnorab@mail.ru

G.R.Bazarova, A.S.Nematov, O.A.Husanov, S.Ahmadbek kizi

Optimization of Epidemic Survey and Epizootics Prognostication in Kyzylkum Autonomous Plague Focus in Modern Conditions within Uzbekistan

Center for Prophylaxis of Quarantine and Particularly Dangerous Infections, Healthcare Ministry of Uzbekistan, Tashkent

Kyzylkum autonomous plague focus, the large part of which is situated on the territory of the Republic of Uzbekistan, has always been distinguished as regards periodic development of acute extended epizootics and occurrence of epidemic complications. Epidemic survey includes the wide reconnaissance with visual evaluation of epizootiological factors and material collection out of fresh pellets for serological analysis. In case of discovery of carriers carcasses, suspected as plague infected, the collection of samples into spiritus in view of their further PCR analysis is carried out.

Key words: Kyzylkum plague focus, epidemic survey, natural focality.

Authors:

Bazarova G.R., Nematov A.S., Husanov O.A., Ahmadbek kizi S. Center for Prophylaxis of Quarantine and Particularly Dangerous Infections, Healthcare Ministry of Uzbekistan. 100169, Tashkent, Eshon Bobokhon, 2. E-mail: gulnorab@mail.ru

Поступила 19.05.09.

Е.П.Лукин, С.Л.Кириллова, В.Б.Кириллов

ОБОСНОВАНИЕ КУМУЛЯТИВНОГО КОЭФФИЦИЕНТА, ХАРАКТЕРИЗУЮЩЕГО ИНТЕНСИВНОСТЬ ПЕРЕДАЧИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО СЫПНОГО ТИФА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВРЕМЕНИ ГОДА

*Филиал ФГУ «48 Центральный научно-исследовательский институт МО РФ» –
«Вирусологический центр», Сергиев Посад*

Проанализировано помесечное распределение заболеваемости эпидемического сыпного тифа по эпидемиям, возникавшим с конца XIX по середину XX века. Обоснован кумулятивный коэффициент, учитывающий совокупность факторов, влияющих на заболеваемость эпидемическим сыпным тифом. Кумулятивный коэффициент может быть использован для прогнозирования масштабов вспышек данной инфекции в случае ее заноса из эндемичных районов или рецидива болезни Брилля.

Ключевые слова: эпидемический сыпной тиф, болезнь Брилля, траншейная лихорадка, динамика заболеваемости, интенсивность передачи инфекции, кумулятивный коэффициент.

Ожидаемая к 2008–2010 гг. ликвидация риккетсиоза Провачека на территории России и сопредельных государств (Украина, Молдавия, Белоруссия) завершается [7]. Действительно, на протяжении последних 10 лет на территории РФ не зарегистрированы групповые заболевания *эпидемическим сыпным тифом* (ЭСТ), а регистрируемые *одиночные случаи* не отвечают критериям этой инфекции [4, 11, 12]. Количество случаев болезни Брилля за последние 5 лет на превышает 10 случаев в год [11, 12], и эта нозоформа также близка к исчезновению вследствие естественной убыли населения старших возрастов, некогда переболевших первичной формой сыпного тифа.

В настоящее время доля населения на территории бывшего СССР, переболевшего сыпным тифом, не превышает 0,2–2,0 % [3, 8], поэтому величиной иммунной прослойки можно пренебречь, считая все население восприимчивым. В таких условиях даже один завшивленный человек с рецидивом болезни Брилля или прибывший из эндемичного региона больной ЭСТ может заразить значительную часть замкнутого коллектива, между членами которого осуществляются постоянные контакты [9, 14]. Следовательно, эпидемиологическая настороженность в отношении ЭСТ должна сохраняться, и исследования в области прогнозирования возможных вспышек заболеваний, передающихся вшами, актуальны.

Из эпидемиологических наблюдений за распространением ЭСТ в прошлом известно, что общее количество заболевших данной формой риккетсиоза существенно зависит от количества платяных вшей и их инфицированности, меняющихся в течение года [1, 9, 10, 13–15]. Поэтому необходимо учесть это влияние при прогнозировании масштабов возможной вспышки данного заболевания.

Цель наших исследований – обоснование кумулятивного коэффициента, характеризующего интенсивность передачи ЭСТ в зависимости от времени года.

Известный специалист в области эпидемиологии сыпного тифа Л.В.Громашевский на основании анализа реальных вспышек сыпного тифа в годы его

эпидемического распространения полагал, что число заболевших в августе–сентябре приблизительно в 4 раза меньше их числа в феврале–марте [1]. В остальные месяцы это соотношение меняется постепенно, принимая промежуточные значения. Таким образом, согласно Л.В.Громашевскому, в августе–сентябре ее необходимо уменьшить в 2,5 раза, а в феврале–марте – увеличить в 1,6 раза по сравнению со значением, рассчитанным по экспериментальным данным для ноября–декабря. Однако какого-либо алгоритма, обосновывающего величины указанных коэффициентов, автор не приводил [1].

Подход Л.В.Громашевского ранее был использован нами в работах по созданию математических моделей распространения вспышки ЭСТ [5, 6]. В дальнейшем для более достоверного обоснования распределения заболеваемости в течение года мы проанализировали помесечное распределение заболеваемости ЭСТ по эпидемиям в России и Румынии, возникавшим с конца XIX по середину XX века, то есть в тот период, когда искажающее влияние специфического лечения и специфической профилактики было исключено (Санкт-Петербург, 1887–1896 гг.; Москва, 1942–1944 гг.; заболеваемость ЭСТ в Советской армии, 1942 г.; заболеваемость ЭСТ по Омской области в 1941–1956 гг.; Румыния, 1937–1939 гг.) [2, 9, 10, 13, 15].

Из анализа реальных данных за длительный период времени и в разных странах в условиях отсутствия воздействия на переносчика превентивных мер защиты (специфическое лечение и специфическая профилактика) следует, что большая часть заболевших ЭСТ регистрируется в январе–мае (максимум – в марте), минимальная доля заболевших – в августе. При этом наименьшая кумулятивная заболеваемость (август), рассчитанная нами по пяти крупным эпидемиям, принята за единицу.

Результаты нашего анализа, приведенного в таблице, позволили уточнить предложенные Л.В.Громашевским показатели, учитывающие долю заболевших в зависимости от времени года.

Заболеемость эпидемическим сыпным тифом в зависимости от времени года по данным реальных эпидемий в отсутствии специфического лечения

Месяц	Процент заболевших по данным источников:					Среднее значение процента заболевших от общегодовой заболеваемости	Коэффициент β^*
	[2]	[9]	[10]	[13]	[15]		
Январь	5,9	11,9	9,8	15,6	18,1	12,3	6,5
Февраль	11,8	11,0	11,3	18,3	18,9	14,3	7,6
Март	22,8	10,5	14,9	20,5	20,7	17,9	9,5
Апрель	19,9	10,5	14,0	14,0	14,5	14,6	7,8
Май	25,0	9,5	15,9	13,4	10,5	14,9	7,9
Июнь	6,6	6,7	9,8	7,5	3,0	6,7	3,6
Июль	1,8	4,1	5,1	3,5	1,4	3,2	1,7
Август	0,7	3,4	2,7	1,7	0,9	1,9	1,0
Сентябрь	1,8	4,5	3,8	0,8	1,2	2,4	1,3
Октябрь	2,9	6,4	4,9	1,2	1,5	3,4	1,8
Ноябрь	3,7	9,6	3,8	1,3	3,4	4,4	2,3
Декабрь	8,1	12,0	3,9	1,8	5,8	6,3	3,3

Коэффициент β^* , представленный в последнем столбце таблицы, характеризует отношение количества заболевших в текущем месяце к минимальному значению заболевших в августе и используется в качестве обобщенного (кумулятивного) показателя для учета влияния времени года на количество заболевших ЭСТ.

Использование коэффициента β^* позволило нам уточнить разработанные математические модели вспышек сыпного тифа с трансмиссивным фактором передачи возбудителя и объединить данные наблюдений за вспышками ЭСТ, протекавшими в разное время года, и тем самым, проводить более объективную статистическую обработку имеющейся информации.

Рассчитанная зависимость доли заболевших от времени года может быть использована также и для прогнозирования заболеваемости траншейной лихорадкой, поскольку ее возбудитель (*Bartonella quintana*) имеет аналогичный механизм передачи.

Таким образом, уточненный нами коэффициент β^* учитывает совокупность факторов (время года и связанную с этим обстоятельством скученность людей, степень зашкваренности на определенный период года, уровень инфицированности переносчика) и позволяет обоснованно прогнозировать заболеваемость ЭСТ в случае рецидива болезни Брилла или заноса инфекции из эндемичных районов. Корректировка с использованием коэффициента β^* математических моделей вспышек сыпного тифа с трансмиссивным фактором передачи возбудителя способствует получению более достоверных результатов математического прогноза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Громашевский Л.В. Сыпной тиф. В кн.: Общая и частная эпидемиология. М.: Медицина; 1973. Т. 2. С. 124–42.
2. Зуева Л.П., Яфаев Р.Х. Сыпной тиф. Болезнь Брилла. В кн.: Эпидемиология. СПб.: Фолиант; 2006. С. 440–9.
3. Курганова Л.И. Вивчення можливості зникнення висипнотифозної інфекції в Україні. Інфекційні хвороби. 2006; 4:51–6.
4. Лукин Е.П., Евстигнеев О.В. Диагностика форм риккетсиоза Провачека на заключительном этапе его ликвидации. Воен.-мед. журн. 2004; 8:40–4.
5. Лукин Е.П., Михайлов В.В., Олейчик В.А., Солодянкин А.И. Математическое моделирование заболевания сыпным ти-

фом в современных условиях. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1996; 1:31–3.

6. Лукин Е.П., Кириллов В.Б., Кириллова С.Л. Прогнозирование развития вспышки трансмиссивных инфекций, передающихся вшами, в современных условиях. Воен.-мед.журн. 2008; 1:47–51.

7. Онищенко Г.Г., Лукин Е.П., Сыслова Т.Г. Прогностическая оценка сыпного тифа (риккетсиоз Провачека) в России. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1997; 6:30–6.

8. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2006 году: Государственный доклад. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2007. 360 с.

9. Полякова А.П. К эпидемиологии сыпного тифа в Омской области за 1941–1956 гг. и меры ликвидации заболеваний [дис. ... канд. мед. наук]. Омск; 1958.

10. Орлов П.П. Заболеваемость и смертность от сыпного тифа в Санкт-Петербурге с 1887 по 1896 годы [дис. ... д-ра мед. наук]. СПб.; 1897.

11. Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях в Российской Федерации за январь–декабрь 2005–2006 гг. Здоровье населения и среда обитания. 2007; 1:50–1.

12. Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях в Российской Федерации за январь–декабрь 2006–2007 гг. Здоровье населения и среда обитания. 2008; 1:44.

13. Шамров И.И. Сыпной тиф в период Великой Отечественной войны в г. Москве [дис. ... д-ра мед. наук]. М.; 1946.

14. Gelston A.L., Jones T.G. Typhus fever: Report of an epidemic in New York City in 1847. J. Infect. Dis. 1977; 136(6):813–21.

15. Nicolau Ș.T., Constantinescu N. Rickettsii si rickettsioze. București: Editura Academiei Republicii Socialiste România; 1965. 801 p.

Об авторах:

Лукин Е.П., Кириллова С.Л., Кириллов В.Б. Филиал ФГУ «48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации» – «Вирусологический центр». Сергиев Посад.

E.P.Lukin, S.L.Kirillova, V.B.Kirillov

Substantiation of Cumulative Coefficient Characterizing Epidemic Typhus Fever Transmission Activity Depending on Seasons

Branch of 48 Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation – Virology Center, Sergiev Possad

Monthly distribution of epidemic typhus fever morbidity during epidemics arisen since the end of XIX up to the middle of XX century has been analyzed. The cumulative coefficient considering a set of factors which effect the epidemic typhus fever morbidity is substantiated. This coefficient can be used to forecast the scale of this infection outbreaks in case of its introduction from endemic regions or recurrence of Brill's disease.

Key words: epidemic typhus fever, Brill's disease, trench fever, morbidity dynamics, intensity of disease transmission, cumulative coefficient.

Authors:

Lukin E.P., Kirillova S.L., Kirillov V.B. Branch of 48 Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation – Virology Center. Sergiev Possad.

Поступила 21.05.09.

Т.А.Малюкова, Е.В.Сазанова, Т.А.Костюкова,
Е.М.Головко, А.В.Бойко

ВЫБОР И ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ АДсорбЕНТОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ПРИ ТРАНСПОРТИРОВАНИИ ПАТОГЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ АГЕНТОВ

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

Проведена оценка доступных материалов, обладающих поглощающей способностью, с целью использования в качестве адсорбентов при транспортировании патогенных биологических агентов. Отработан способ их обеззараживания.

Ключевые слова: патогенные биологические агенты, транспортирование патогенных биологических агентов, обеззараживание адсорбентов.

Транспортирование является одним из видов работ с возбудителями инфекционных заболеваний – патогенных биологических агентов (ПБА). Обеспечение биобезопасности данного процесса регламентировано положениями российских нормативных документов [2, 3], ряда международных [5, 8, 11] и зарубежных [7, 10] руководств. Для предотвращения опасности выхода ПБА во внешнюю среду в случае нарушения целостности первичной упаковки (пробирка, флакон, бутылка и др.) и возможности возникновения чрезвычайной эпидемической ситуации в контейнер помещают материалы, обладающие адсорбционными свойствами. Они должны поглощать весь выделившийся жидкий инфицированный (потенциально инфицированный) материал. В иностранной литературе в качестве адсорбентов предлагается использовать бумажные салфетки или гигроскопическую вату [5, 11]. Согласно отечественным санитарным правилам [2, 3] при упаковке емкости с ПБА заворачивают в лигнин или гигроскопическую вату. Перечисленные адсорбенты могут быть обеззаражены регламентированными химическими или физическими способами [2].

В последнее время на рынке появилось большое количество доступных материалов, обладающих поглощающей способностью, которые, в частности, используют для изготовления предметов ухода за детьми, больными (пеленки, салфетки), а также для изготовления наполнителей кошачьего туалета. В ходе разработки полезной модели «Устройство для транспортирования патогенных биологических объектов» [9] в качестве адсорбирующего материала нами был предложен силикагель (высушенный гель поликремниевой кислоты) с индикатором влажности (производство ООО «СПЛ»), изменяющий цвет при поглощении жидкости, что позволяет визуально определить факт утечки. Кроме этого, гранулы силикагеля могут обеспечить фиксацию объектов, что особенно актуально при одновременном транспортировании разнокалиберных емкостей с ПБА. На наш взгляд, силикагель, а также адсорбенты на целлюлозо-минеральной основе (типа наполнителя «Catlitter») и природные адсорбенты, аналогичные голубой глине (типа наполнителя «Барсик»), наиболее удачно сочетают в себе способность адсорбировать жидкость, фиксировать объекты и доступность.

Однако процесс транспортирования ПБА включает не только упаковку и непосредственно транспортирование, но и обеззараживание всего содержимого упаковки: держателей, адсорбентов, контейнеров. В руководстве ВОЗ [5, 11] указаны способы и режимы обеззараживания в целом контейнера, содержащего материалы и адсорбенты. Известен режим высушивания силикагеля путем прогрева в муфельной печи при 180–200 °С в течение 10 ч с целью повторного использования [4]. Это приводит не только к обезвоживанию, но и к обеззараживанию гранул. Однако длительность процесса и материальные затраты на его проведение делают его не привлекательным для использования. Кроме того, муфельная печь не включена в список оборудования для дезинфекции и стерилизации отходов [1], в частности инфицированного материала. В действующих санитарных правилах [2] не регламентирован способ и режим обеззараживания гелей и пористых материалов, которые могут быть применены в качестве адсорбентов. Оптимальным явилось бы использование традиционных отработанных режимов автоклавирования: 126 °С 60 мин для объектов, содержащих неспорообразующие микроорганизмы, и 132 °С 90 мин для объектов, содержащих спорообразующие микроорганизмы. Настороженность при использовании автоклавирования для обеззараживания подобных объектов вызывает то, что нельзя исключить наличия воздуха в микрополостях пористых материалов. Это может привести к неравномерности прогрева гранул адсорбентов и не соблюдению термо-временного режима обеззараживания, т.е. к возможности сохранения жизнеспособных микроорганизмов.

Целью настоящего исследования явилась оценка эффективности использования доступных материалов, обладающих адсорбирующими свойствами, при транспортировании ПБА и отработка способа их обеззараживания.

Материалы и методы

Объекты исследования – силикагель (высушенный гель поликремниевой кислоты), адсорбенты «Catlitter» (на целлюлозо-минеральной основе) и «Барсик» (природный адсорбент, аналогичный голубой глине).

Оценку поглощающей способности проводили путем расчета коэффициента поглощения (рассчитанное в процентах количество жидкости, поглощаемое 100 г адсорбента). Предварительно адсорбент подсушивали в сушильном шкафу при 160 °С 30 мин.

Для оценки эффективности режимов обеззараживания материалов в работе использовали вакцинные спорообразующие (*Bacillus anthracis* СТИ-1) и неспорообразующие (*Yersinia pestis* EV, *Vibrio cholerae* non 01M-266, *Brucella abortus* 19BA, *Francisella tularensis* 15НИИЭГ) штаммы. *Y. pestis* EV культивировали на агаре Хоттингера (рН 7,2) при 28 °С в течение 2 сут, *V. cholerae* non 01M-266 – на агаре Хоттингера (рН 8,0) при 37 °С в течение 24 ч, *B. abortus* 19BA – на эритроагаре (рН 7,0) при 37 °С в течение 3 сут, *F. tularensis* 15НИИЭГ – на FT агаре (рН 7,0) при 37 °С в течение 3 сут. Взвеси культур (10⁹ КОЕ/мл) готовили на стерильном 0,9 % растворе NaCl. Взвесь спор *B. anthracis* СТИ-1 (10⁹ спор/мл) получали внесением в ампулу с живой сухой сибиреязвенной вакциной, содержащую 10¹⁰ спор/мл, физиологического раствора в количестве 10 мл. Полученные взвеси вносили в пробирки с адсорбентами в соответствии с коэффициентом поглощения, рассчитанным для каждого объекта.

Для обеззараживания адсорбентов, инфицированных взвесями культур неспорообразующих микроорганизмов, использовали режим автоклавирования 126 °С 60 мин, для адсорбентов, инфицированных взвесями культур спорообразующих микроорганизмов – 132 °С 90 мин. Образцы после автоклавирования заливали стерильными жидкими питательными средами, описанными выше, и инкубировали в термостате при 37 °С (образцы, содержавшие *Y. pestis* EV – при 28 °С) в течение 48 ч. Затем проводили высевы по 0,5 мл из каждого образца на плотные (3 чашки с агаром) и жидкие (3 пробирки с бульоном) питательные среды в соответствии с ростовыми потребностями микробов [6]. Посевы инкубировали при 37 °С (образцы, потенциально содержавшие *Y. pestis* EV, – при 28 °С) с ежедневным просмотром в течение 5 сут. Эксперименты повторяли трехкратно.

Результаты и обсуждение

В ходе исследований показано, что испытанные адсорбенты обладают высокой поглощающей способностью (таблица). По коэффициенту поглощения материалы распределились следующим образом: «Барсик» поглощал объем в 1,6 раза больше своего веса, «Catlitter» – стабильно равный своему весу, силикагель – 0,8 своего веса. Следует отметить, что

Поглощающая способность исследуемых материалов

Название адсорбента	Коэффициент поглощения (количество поглощенной жидкости на 100 г адсорбента), %			
	1-й опыт	2-й опыт	3-й опыт	сред. значение
Силикагель	80	60	60	78
Catlitter	100	100	100	100
Барсик	180	150	140	156

«Барсик» при поглощении жидкости изменял цвет на более темный, что удобно для визуальной оценки факта утечки заразного материала при транспортировании ПБА. Однако при избыточном количестве жидкости данный адсорбент превращался в вязкую массу. Силикагель с индикатором влажности (производство ООО «СПЛ») содержит гранулы синего цвета, которые при поглощении жидкости изменяют цвет на розовый, а затем обесцвечиваются.

При оценке эффективности обеззараживания исследуемых адсорбентов путем автоклавирования получено отсутствие роста тест-микроорганизмов в жидких и на плотных питательных средах после 5 сут инкубации. Таким образом, автоклавирование в режимах «126 °С 60 мин» (в случае инфицирования неспорообразующими микроорганизмами) и «132 °С 90 мин» (в случае инфицирования спорообразующими микроорганизмами) приводит к обеззараживанию адсорбентов, имеющих минеральную и целлюлозо-минеральную основу.

По стоимости взятые в эксперименты адсорбенты распределились следующим образом: «Барсик» – 20,5 руб./кг, «Catlitter» – 27 руб./кг, силикагель – 48 руб./кг.

Обобщение полученных результатов позволяет заключить, что более эффективным и экономичным является использование природных адсорбентов, аналогичных голубой глине, отличающихся высокой поглощающей способностью, доступностью, низкой стоимостью, а также позволяющих визуально определять факт утечки ПБА и фиксировать емкости с ПБА (первичные упаковки).

Силикагель и адсорбенты, приготовленные на целлюлозо-минеральной или глинистой основе, могут быть обеззаражены путем автоклавирования в регламентированных режимах [2].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акимкин В.Г. Санитарно-эпидемиологические требования к организации сбора, обезвреживания, временного хранения и удаления отходов в лечебно-профилактических учреждениях (методическое пособие). М.: Изд-во РАМН; 2003. 84с.
2. Безопасность работ с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). Санитарные правила. СП 1.3.1285-03. Бюл. норм. и метод. докум. Госсанэпиднадзора. 2003. С. 95–115.
3. Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности. Санитарные правила СП 1.2.036-95. Госкомсанэпиднадзор России. М.; 1996. 79 с.
4. Инструкция по лиофильному высушиванию возбудителей инфекционных заболеваний I–IV групп на коллекторном аппарате системы К.Е. Долинова. 1978. С. 12–3.
5. Меры безопасности при вспышках инфекционных болезней. Д.Д. Дасмор. ВОЗ. Женева. 1990. С. 40–53.
6. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям. М.; 1998. МУК 4.1/4.2.588-96. С. 28–30.

7. Основы биологической безопасности в лабораториях. Руководство. Третье изд. Канада; 2004. 180 с.
8. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях. Третье изд. Женева: ВОЗ; 2004. 190 с.
9. Патент № 64906 на полезную модель «Устройство для транспортирования патогенных биологических агентов» Бюл. № 21 27.07.2007, заявка 20071011983/22, 18.01.2007, дата начала отсчета срока действия патента: 18.01.2007.
10. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 5th Edition. Washington: U.S. Government Printing Office; 2007. 418 p.
11. Guidance on regulations for the Transport of infectious substances 2007–2008. WHO; 2007. 29 p.

Об авторах:

Малюкова Т.А., Сазанова Е.В., Костюкова Т.А., Головки Е.М., Бойко А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

T.A.Malyukova, E.V.Sazanova, T.A.Kostyukova, E.M.Golovko, A.V.Boyko

**Selection and Disinfection of Adsorbents
Used for Transportation of Pathogenic Biological Agents**

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Evaluated are available materials, having absorbability, in view of using them as adsorbents for transportation of pathogenic biological agents. Worked out is the way of their disinfection.

Key words: pathogenic biological agents, transportation of pathogenic biological agents, adsorbents disinfection.

Authors:

Malyukova T.A., Sazanova E.V., Kostyukova T.A., Golovko E.M., Boyko A.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 04.02.09.

Д.В.Русанова, Г.И.Лямкин

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ БРУЦЕЛЛЕЗА В СТАВРОПОЛЬСКОМ КРАЕ*ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»*

Проведенный анализ многолетней заболеваемости бруцеллезом в Ставропольском крае за период с 2001 по 2007 гг. показал, что эпидемиологическая обстановка по бруцеллезу характеризуется как напряженная и остается на высоком уровне, что позволяет прогнозировать ухудшение эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по бруцеллезу. В результате эпидемиологического районирования территории Ставропольского края по степени риска инфицирования населения бруцеллезом выделены районы с различной степенью эпидемической опасности, что позволяет в течение 2–3 последующих лет использовать эти данные для оценки эпидемиологической обстановки по бруцеллезу при проведении эпидемиологического анализа.

Ключевые слова: бруцеллез, эпидемиологическая обстановка, эпидемиологическое районирование.

Эпидемиологическая обстановка по бруцеллезу в Российской Федерации остается напряженной и определяется эпизоотологическим неблагополучием среди сельскохозяйственных животных (крупного и мелкого рогатого скота, в меньшей степени – свиней). Ежегодно регистрируется до 500 случаев первично выявленного бруцеллеза [1, 2, 6, 7].

Наибольшее число больных бруцеллезом людей с впервые установленным диагнозом зарегистрировано в Южном федеральном округе (ЮФО) (77,6 %), где одними из самых неблагополучных регионов являются Ставропольский край и Республика Дагестан. На долю этих административных субъектов начиная с 2005 г. приходится более 80 % случаев впервые выявленного бруцеллеза в ЮФО [2].

Целью настоящей работы было установление эпидемиологических особенностей бруцеллеза в Ставропольском крае за 2001–2007 гг. с учетом уровня заболеваемости, распределения заболеваемости среди социально-профессиональных групп, сведений об источниках инфекции, данных эпидемиологического районирования территории Ставропольского края по бруцеллезу.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили данные официальной регистрации заболеваний людей бруцеллезом в Ставропольском крае за 2001–2007 гг., которые подвергались статистическому анализу с использованием метода сигмальных отклонений (метод Мартина) от средней величины вариационного ряда [8]. Эпидемиологическое районирование территории по риску инфицирования населения бруцеллезом (РИБ) проводили с использованием картографического метода. При определении РИБ уровни заболеваемости по районам ранжировали с помощью метода О.В. Кедровой, А.И. Кологорова и соавт. [4]. Полученные данные подвергали обработке с использованием методов ретроспективного эпидемиологического анализа [10].

Результаты и обсуждение

Заболеваемость бруцеллезом в Ставропольском

крае стабильно превышает среднероссийские показатели (рис. 1). Пик заболеваемости приходился на 2001 г., составляя 2,77 на 100 тыс. населения. В дальнейшем отмечена незначительная тенденция к снижению показателей, которые составили в 2006 г. 2,27 на 100 тыс. населения, в 2007 г. – 1,3 на 100 тыс. населения (меньше в 1,7 раз по сравнению с 2006 г.), по-прежнему превышая показатель заболеваемости по Российской Федерации. В то время как за весь 2005 г. был зарегистрирован 51 случай «свежего» бруцеллеза, в 2006 г. – 61 случай заболевания, в том числе 3 – у детей в возрасте до 14 лет, то в 2007 г. уровень заболеваемости снизился до 35 случаев заболевания «свежим» бруцеллезом, в том числе 2 случая у детей до 14 лет. Из числа зарегистрированных случаев заболевания людей бруцеллезом доля свежего заражения в 2007 г. составила 85,7 % (в 2006 г. – 83,6 %, в 2005 г. – 82 %).

Заболеваемость людей бруцеллезом на территории Северного Кавказа регистрируется в основном в регионах с интенсивным животноводством. При анализе распределения заболеваемости по профессиональным группам установлено, что удельный вес заболеваемости среди лиц, занимающихся профессиональной деятельностью в области сельского хо-

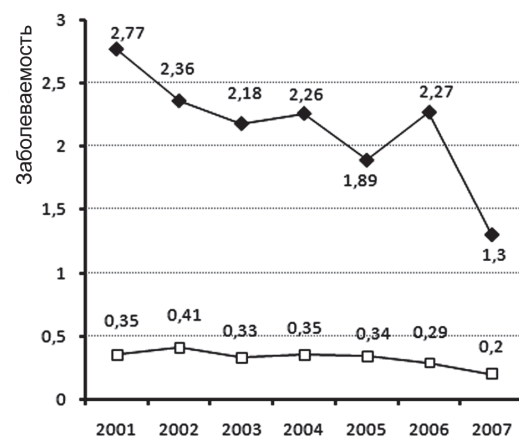


Рис. 1. Заболеваемость бруцеллезом в Ставропольском крае и Российской Федерации (на 100 тыс. населения):

—◆— - Ставропольский край; —□— - Российская Федерация

зяйства, в Ставропольском крае в 2005 г. составлял 12 % (суммарно за последние 5 лет – 30,8 %). Среди этой группы населения наиболее инфицированными оказались ветеринарные работники – 57,0 % от числа обследованных. В 2006 г. процент заболеваний, связанных с профессией, составил 25 %. В структуре профессиональной заболеваемости за 2006 г. 53 % приходится на чабанов, 40 % на ветеринарных работников и 7 % на скотников. В 2007 г. на долю профессионального заражения пришлось 17 % заболеваемости. Среди заболевших ветеринарные работники составили 50 %.

Высокий процент заболевших регистрируется в индивидуальных хозяйствах. Отсутствие достоверных сведений о количестве и виде сельскохозяйственных животных в индивидуальном секторе, местах их выпаса, путях перемещения осложняют работу по выявлению таких очагов.

Снижение поголовья сельскохозяйственных животных в общественном секторе животноводства и увеличение доли поголовья индивидуального сектора сказались на структуре заболеваемости бруцеллезом людей в Ставропольском крае (рис. 2). Доля заражения людей в индивидуальном секторе, от больных животных, составила 48 % (в 2005 г. – 28 %, в 2006 г. – 23 %), из которых у половины заболевших заражение связано с уходом за крупным и мелким рогатым скотом. Такие изменения в профессиональной структуре заболеваемости бруцеллезом являются следствием ликвидации большей части общественных сельскохозяйственных предприятий и перераспределения скота в частный сектор.

В период с 2001 по 2006 год ведущая роль в качестве источника инфекции принадлежала крупному рогатому скоту (КРС), на долю которого приходилось от 45 до 68 % случаев. Далее следуют смешанный источник – крупный и мелкий рогатый скот – от 9 до 32 %, затем мелкий рогатый скот (МРС) – 23 %. С 2001 по 2006 год в 12 % случаев источник заражения бруцеллезом людей в Ставропольском крае не установлен. В 2007 г. основным источником бруцеллезной инфекции является мелкий рогатый скот – 29 %, на долю смешанного источника приходится 11 %, крупного рогатого скота – 6 %. Значительно возросла доля неустановленного источника инфекции (до 54 %).



Рис. 2. Структура заболеваемости (в %) бруцеллезом в Ставропольском крае за 2001–2007 гг.

Контактный путь заражения имел место у 70 % больных, алиментарный – у 30 % (в 2006 г. 51 и 49 % соответственно). Увеличилась доля больных бруцеллезом при алиментарном пути заражения, связанном с употреблением молочных продуктов (сыра, брынзы, молока), приобретенных у частных лиц на стихийных рынках, с 30 % в 2006 г. до 50 % в 2007 г.

Большинство больных свежим бруцеллезом (84 %) выявляется при обращении за медицинской помощью. Охват профилактическими осмотрами угрожающих по инфицированию контингентов уменьшился с 81 % в 2005 г. до 78,4 % в 2007 г. При снижении числа заболевших среди профессиональных групп с 2001 г. возросло число лиц, обратившихся в Ставропольский краевой центр по диагностике и лечению бруцеллеза по поводу оформления профессионального характера заболевания, что связано с изменением порядка выплат пособий по социальному страхованию случаев профзаболеваний. Число лиц, которым впервые в 2006 г. установлен профессиональный характер заболевания бруцеллезом, составило 40 человек, из них 30 % приходится на ветеринарных работников. В 2007 г. профессиональный характер заболевания установлен 39 обратившимся за медицинской помощью, из них 50 % ветеринарные работники. За последние 30 лет в Ставропольском крае в результате заражения бруцеллезом более 3 тыс. человек оформили инвалидность.

Анализ заболеваемости бруцеллезом по возрастному составу показал, что дети до 14 лет, как правило, не инфицируются, в основном поражаются лица наиболее трудоспособного возраста (30–49 лет). При распределении заболевших по полу установлено, что среди жителей сельской местности инфицируются чаще женщины (доярки, телятницы), в городах преобладают мужчины – рабочие мясокомбинатов, кожевенной и молочной промышленности.

Заражение регистрируется круглогодично, с сезонными подъемами в весенний и летне-осенний период, связанными с отелом и ягнением, стрижкой овец и периодом лактации.

Эпизоотологическая обстановка по бруцеллезу в Ставропольском крае характеризуется как напряженная. В 2006 г. зарегистрирован 41 неблагополучный пункт по бруцеллезу КРС и 2 по бруцеллезу МРС. В них заболело 339 голов КРС и 4 МРС (в 2005 г. в крае зарегистрирован 61 неблагополучный пункт по бруцеллезу КРС и 3 по бруцеллезу МРС, в которых заболело 523 головы КРС и 3 МРС). По состоянию на начало 2007 г. осталось 9 неблагополучных пунктов по бруцеллезу КРС.

В очагах бруцеллеза КРС 90,0 % больных людей зарегистрировано в хозяйствах, считавшихся благополучными по бруцеллезу. Несовпадение эпизоотологических данных эпидемическим проявлениям бруцеллеза свидетельствует о наличии своевременно не выявляемых скрытых очагов инфекции [5, 7].

С целью прогнозирования возможного развития эпидемических осложнений по бруцеллезу в адми-

нистративных районах Ставропольского края нами на основе статистических данных проведено ранжирование административных территорий 26 районов и 6 городов краевого подчинения.

В результате проведенных исследований было установлено, что за анализируемый период в 18 административных районах края, в том числе и в городах Кисловодске и Пятигорске, бруцеллез среди людей регистрировался в течение 5–7 лет. Регистрация заболеваний бруцеллезом в течение 2–4 лет наблюдалась среди населения в 6 административных районах и в городах Ессентуки, Невинномысск и Ставрополь. В указанный период только единичные случаи бруцеллеза среди людей зарегистрированы в 2 административных районах (Апанасенковском и Ипатовском) и один случай в Железноводске.

Проведенное ранжирование территорий края позволило выделить три группы административных районов с различными показателями риска инфицирования бруцеллезом (рис. 3):

1. Районы с высокими показателями РИБ (I степень опасности): Андроповский, Арзгирский, Благодарненский, Курский, Левокумский, Нефтекумский, Степновский, Туркменский. Интегрированные показатели РИБ для этих районов составляют от 4,516 до 11,399.

2. Районы со средними показателями РИБ (II степень опасности): Александровский, Георгиевский, Кировский, Кочубеевский, Минераловодский, Новоселицкий, Петровский, Труновский, Шпаковский, а также город Кисловодск. Интегрированные показатели РИБ для этих территорий составляют от 1,177 до 3,543.

3. Районы с низкими показателями РИБ (III степень опасности): Апанасенковский, Буденовский, Грачевский, Изобильненский, Ипатовский, Красногвардейский, Новоалександровский, Предгорный, Советский; города: Ессентуки, Железноводск, Невинномысск, Пятигорск, Ставрополь с интегрированными показателями РИБ от 0 до 1,094.

Результаты проведенного ранжирования территории Ставропольского края показали, что наибольший РИБ отмечается в районах, граничащих на востоке с республиками Калмыкия и Дагестан, на юге – с республиками Карачаево-Черкессия, Северная Осетия-Алания и Чеченской. Максимальный РИБ отмечается в Нефтекумском (11,399) и Курском (11,389) районах Ставропольского края, прилегающим к Республике Дагестан, где установлен наибольший уровень заболеваемости бруцеллезом в ЮФО [3].

Административные территории, имеющие II–III степень опасности, находятся в центральной и северной частях края, которые граничат с Краснодарским краем и Ростовской областью, и южной части, граничащей с Кабардино-Балкарской Республикой, где отмечаются низкие уровни заболеваемости по сравнению с другими административными субъектами округа. Причиной такого распределения степени опасности и риска инфицирования населения бруцеллезом, на наш взгляд, является длительное неблагополучие по бруцеллезу территории Республики Дагестан. Значительную роль в распространении бруцеллеза по территории Ставропольского края сыграло и отгонное животноводство, практиковавшееся до середины 70-х годов XX века, где в условиях совместного содержания и обмена скота происходило контактирование

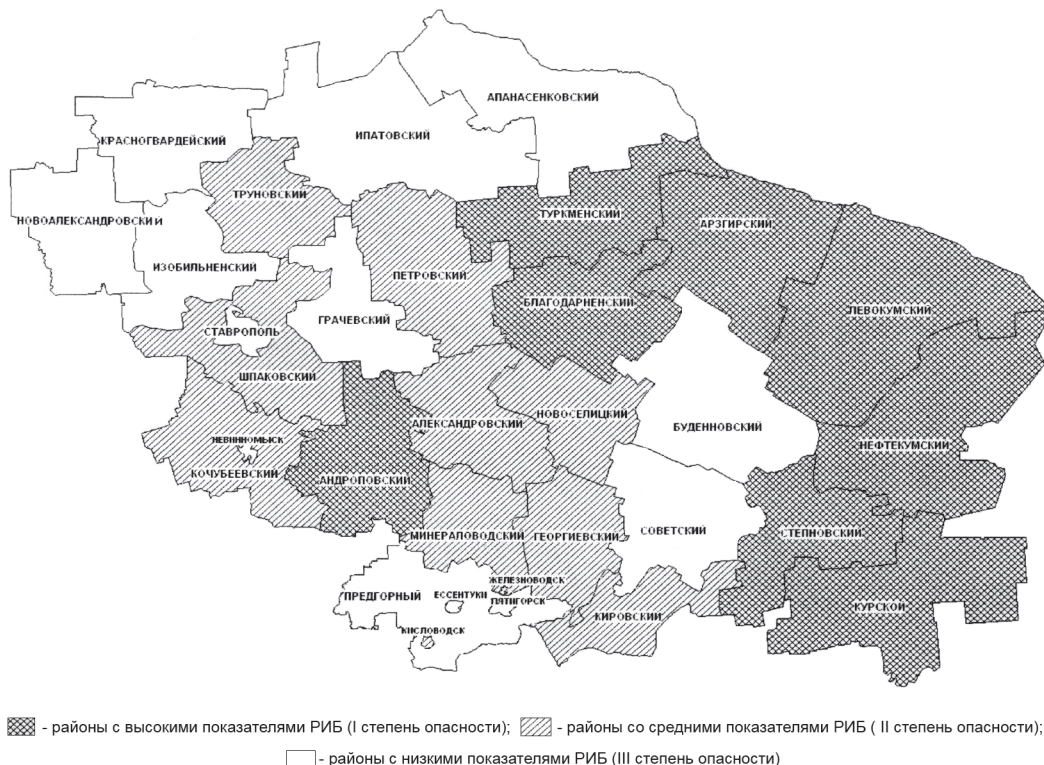


Рис. 3. Эпидемиологическое районирование территории Ставропольского края по бруцеллезу за 2001–2007 гг.

больных животных со здоровыми [9]. Создавшаяся напряженная эпизоотическая и эпидемическая обстановка по бруцеллезу в Ставропольском крае явилась следствием происходящих с конца 80-х – начала 90-х годов XX столетия социально-экономических преобразований как в целом по региону, так и, в частности, животноводческой отрасли сельского хозяйства. Одним из факторов, способствующим распространению бруцеллеза, является неконтролируемое перемещение больных бруцеллезом животных в регионе Северного Кавказа вследствие широко распространенной купли-продажи скота без должного санитарно-ветеринарного контроля.

При сложившейся к настоящему времени эпизоотолого-эпидемиологической обстановке в Ставропольском крае прогнозируется неблагоприятная эпидемическая ситуация в крае в последующие годы, что требует усиления совместной работы ветеринарной, санитарно-эпидемиологической служб и местных администраций по профилактике этой инфекции.

Проведенный анализ заболеваемости бруцеллезом в Ставропольском крае за период с 2001 по 2007 год показал, что эпидемиологическая обстановка по бруцеллезу характеризуется как напряженная. Заболеваемость бруцеллезом остается на высоком уровне, превышающем аналогичные показатели по Российской Федерации более чем в 5 раз.

Основным источником инфекции в Ставропольском крае является крупный рогатый скот. Намечается тенденция к снижению роли мелкого рогатого скота как источника инфекции.

К наиболее инфицированным категориям лиц, профессионально связанным с животноводством, относятся ветеринарные работники (50 %), чабаны (43 %) и скотники (7 %). Отмечается рост заболеваемости бруцеллезом среди населения края, имеющего личные подсобные хозяйства.

В результате эпидемиологического районирования территории Ставропольского края по степени риска инфицирования населения бруцеллезом выделены районы с высокой степенью эпидемической опасности (РИБ от 4,516 до 11,399): Андроповский, Арзгирский, Благодарненский, Курской, Левокумский, Нефтекумский, Степновский, Туркменский. Эти районы граничат с Республикой Дагестан, являющейся наиболее неблагополучной по бруцеллезу в ЮФО. Районы края со средней (РИБ от 1,177 до 3,543) и низкой (РИБ от 0 до 1,094) степенями эпидемической опасности находятся в центре и на севере Ставропольского края и граничат с Краснодарским краем и Ростовской областью и южной части, граничащей с Кабардино-Балкарской Республикой, где отмечаются низкие уровни заболеваемости по сравнению с другими административными субъектами ЮФО.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ефременко В.И. и др. Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями в Южном федеральном округе. В кн.: Опыт работы органов и учреждений Роспотребнадзора в Ставропольском крае по обеспечению санэпидблагополучия и защите прав потребителей (10 Ежегодная неделя медицины Ставрополя): Матер. науч.-практ. конф. Ставрополь; 2006. С. 58–63.
2. Желудков М.М., Цирельсон Л.Е. и др. Состояние заболеваемости бруцеллезом на территории РФ. В кн.: Современные аспекты эпидемиологического надзора за особо опасными инфекциями на юге России: Матер. науч.-практ. конф.; 21–22 марта 2007 г.; Ставрополь. Ставрополь; 2007. Ч. 1. С. 142–5.
3. Исаев А.Н. Эпидемиологические особенности бруцеллеза в Республике Дагестан [дис. ... канд. мед. наук]. Ставрополь; 2005. 133 с.
4. Кедрова О.В., Колодиров А.И., Васенин А.С. и др. Эпидемиологическое районирование административных территорий Астраханской области по риску инфицирования холерой. В кн.: Эпидемиологические и клинико-иммунологические аспекты профилактики важнейших инфекционных заболеваний: Матер. конф. Астрахань; 1996. С. 20–1.
5. Лямкин Г.И., Таран И.Ф., Бутаев Т.М. и др. Эпидемиологические особенности бруцеллеза Северокавказском регионе Российской Федерации. В кн.: Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. Алматы; 2001. Вып. 3. С. 313–5.
6. Онищенко Г.Г. Об эпизоотологической обстановке по особо опасным, природно-очаговым инфекциям на территории Южного Федерального округа. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2004; 3:23–30.
7. Панченко В.П., Таран И.Ф., Лямкин Г.И. и др. Эпизоотолого-эпидемический анализ обстановки по бруцеллезу в Ставропольском крае за период 1996...1998 гг. В кн.: Диагностика, лечение и профилактика инфекционных заболеваний. Биотехнология. Ветеринария: Матер. юбил. науч. конф., посв. 70-летию МО РФ; 30 нояб. – 1 дек. 1998; Киров. Киров; 1998. С. 390.
8. Сепетлиев Д.А. Статистические методы в научных медицинских исследованиях. М.: Медицина; 1968. 419 с.
9. Соколова И.А. Свойства бруцелл, выделенных в очагах бруцеллеза на территории Ставропольского края [дис. ... канд. мед. наук]. Ставрополь; 2000. 123 с.
10. Шаханина И.А., Кучеровская Т.В., Черкова Т.П. Применение различных статистических методов эпидемиологического анализа при оценке сезонности и территориального распространения инфекционных болезней. Журн. микробиол., эпидемиол. и микробиол. 1990; 5:43–7.

Об авторах:

Русанова Д.В., Лямкин Г.И. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru

D.V.Rusanova, G.I.Lyamkin

Epidemiologic Features of Brucellosis in Stavropol Region

Stavropol Anti-Plague Research Institute

Analysis of many-years brucellosis morbidity in Stavropol region in 2001–2007 showed epidemiological situation to be tense, thus the deterioration of epizootological and epidemiological conditions as regards brucellosis could be expected. Epidemiological zoning of Stavropol region according to the rate of risk of population infection with brucellosis allowed to discriminate territories with different degree of epidemiological danger. These data could be used during next 2–3 years for evaluation of brucellosis epidemiological situation while carrying out epidemiological analysis.

Key words: brucellosis, epidemiological situation, epidemiologic zoning.

Authors:

Rusanova D.V., Lyamkin G.I. Stavropol Anti-Plague Research Institute. 355035, Stavropol, Sovetskaya St., 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru

Поступила 07.05.09.

В.П.Топорков¹, А.И.Кологоров¹, Н.А.Осина¹, Т.В.Бугоркова¹, С.А.Щербакова¹, С.А.Портенко¹,
Н.А.Кучимова², О.М.Мавлютов², Л.А.Фарвазова², Р.Г.Галлямов², И.А.Иванова², Л.И.Коробов³,
А.М.Сыса³, Ю.А.Короткова³

РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ ЗАНОСНЫХ СЛУЧАЕВ ХОЛЕРЫ В Г. БЕЛОРЕЦК РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН В 2008 ГОДУ

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

²Управление Роспотребнадзора по Республике Башкортостан, ³ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии
в Республике Башкортостан», Уфа

Приводится подробное описание завозных случаев холеры из Индии в Белорецк Республики Башкортостан в 2008 г., связанных с полонничеством. Аналогичный случай завоза холеры в Белорецк из Индии наблюдался в 2004 г. Следует обращать особое внимание на лиц, возвращающихся из религиозных поездок в Индию, т.к. их длительное пребывание в эпидемичной по холере стране повышает риск инфицирования. В случае возникновения острых желудочно-кишечных заболеваний у лиц, возвратившихся из неблагополучных по холере стран, целесообразно обследование на холеру бактериологическим и серологическим методами.

Ключевые слова: заносы холеры, религиозный туризм, ретроспективная диагностика холеры.

Современный период седьмой пандемии холеры (1996–2006 гг.) характеризуется снижением уровня заболеваемости холерой в мире, уменьшением числа пораженных инфекцией стран и случаев заноса болезни в экономически развитые страны [1, 3–11]. Аналогичные эпидемиологические закономерности в распространении холеры в этот период наблюдаются и в нашей стране. Так, в период с 1996 по 2001 год в России зарегистрировано 4 вспышки холеры (Республика Дагестан, 1998; Приморский край и Сахалинская область, 1999; Республика Татарстан, 2001), во время которых было выявлено 150 инфицированных и 11 заносных случаев заболевания. Заболевания и случаи вибриононосительства выявлялись ежегодно. В период с 2002 по 2007 год наблюдались 4 заносных случая болезни. В 2004 г. отмечался занос холеры из Индии в Белорецк Республики Башкортостан; в 2005 г. – завоз инфекции из Республики Таджикистан в Тверскую область и Москву; в 2006 г. – из Индии в Мурманск. В 2002, 2003, 2007 гг. холера в России не регистрировалась.

В апреле 2008 г. ретроспективно установлен случай заноса инфекции из Индии в Белорецк Республики Башкортостан. Город Белорецк Республики Башкортостан расположен в горно-лесной зоне Южного Урала. Население более 69 тыс. человек, в том числе детей более 10,5 тыс. Градообразующими являются предприятия переработки полезных ископаемых. Водозаборные сооружения расположены на реке Белая. Сточные воды обеззараживаются на биологических очистных сооружениях.

11 апреля 2008 г. в 18.40 в Белорецкий территориальный отдел Управления Роспотребнадзора по Республике Башкортостан из инфекционного отделения МУЗ «Белорецкая ЦРКБ» поступило сообщение о больной с подозрением на заболевание холерой. Больная Х., возраст – 41 год, жительница Белорецка, индивидуальный предприниматель, торгует про-

мышленной группой товаров. Госпитализирована 11 апреля в 17.30 в инфекционное отделение МУЗ «Белорецкая ЦРКБ» с диагнозом «острый энтероколит, подозрение на холеру».

Из эпидемиологического анамнеза установлено. Больная Х. с 9 марта по 2 апреля 2008 г. вместе с сыном находилась в Индии по религиозным мотивам. Проживала в отеле, имеющем коммунальное благоустройство, питалась в ресторанах и кафе. Пила бутилированную воду, употребляла различные фрукты, приобретаемые на улице, которые мыла проточной водой, купалась в реке Ганг. Со слов больной, заболела в Индии 30 марта (со слов сына, клиника у больной проявилась раньше, через несколько дней после приезда в Индию). Клинические проявления – жидкий стул до 6 раз в сутки. За медицинской помощью не обращалась и лечилась самостоятельно левомицетином.

2 апреля в 23.00 вылетела самолетом Дели – Алма-Ата, прибыла в Алма-Ату 3 апреля в 4.00. Поездом Алма-Ата – Караганда (отправление 3 апреля в 14.00, вагон 3, место 28) прибыла в Караганду 4 апреля в 5.00, откуда поездом Караганда – Москва (отправление 4 апреля в 7.00 вагон 9, место 47) прибыла в Челябинск 5 апреля в 5.00. 5 апреля автобусом Челябинск – Магнитогорск прибыла в Магнитогорск (время в пути 5 часов с 7.50 до 13.00). Из Магнитогорска 5 апреля приехала домой в Белорецк на частном такси. В период с 5 по 11 апреля в г. Белорецке на работу не выходила, но имела общение с родственниками и друзьями. 5 апреля вызвала бригаду скорой медицинской помощи по поводу аллергической реакции. Являясь по образованию медицинским работником, наличие жидкого стула скрывала. Повторно обратилась за медицинской помощью 11 апреля с жалобами на расстройство стула.

В инфекционном отделении МУЗ «Белорецкая ЦРКБ» госпитализирована в бокс, при этом у боль-

ной отмечалось обезвоживание 1 степени. Тургор сохранен, температуры нет, стул водянистый, безболезненный, без примесей, с момента отъезда в Индию потеря веса 3–4 кг.

До начала лечения проведен забор испражнений с целью обследования на холеру. Пробы исследованы на базе бактериологической лаборатории МУЗ «Белорецкая ЦРКБ», бактериологической лаборатории ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Башкортостан» в городе Белорецк и лаборатории индикации особо опасных инфекций ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Башкортостан».

Проведен консилиум специалистов лечебной службы и территориальных учреждений Роспотребнадзора. Назначено лечение доксициклином и инфузионная терапия. 12 апреля больная проконсультирована профессором кафедры инфекционных болезней медицинского университета и начальником отдела надзора на транспорте и санитарной охраны территории Управления Роспотребнадзора по Республике Башкортостан.

11–12 апреля о случившемся проинформированы Руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Председатель СПЭК Правительства республики Башкортостан, заместитель начальника Самарского территориального отдела Управления Роспотребнадзора на железнодорожном транспорте, главный врач Уфимского филиала ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии по железнодорожному транспорту», начальник отдела надзора на транспорте и санитарной охраны территории Управления Роспотребнадзора по Челябинской области. Информация направлена также главному государственному санитарному врачу Республики Казахстан.

На базе инфекционного отделения МУЗ «Белорецкая ЦРКБ» развернуты изолятор и провизорный госпиталь. Соприкасавшиеся с больной холерой госпитализированы в боксы изолятора – всего 10 человек, в том числе сын больной, находившийся в Индии вместе с матерью.

Сын, 14 лет, проживает с матерью, ученик 8 класса школы Белорецка, отрицает клинические проявления заболевания в Индии, по дороге при возвращении из путешествия и дома. По приезде из Индии посещал школу с 8 по 11 апреля.

Все контактные были трехкратно обследованы (забор материала 12 апреля) и пролечены доксициклином. Одновременно установлено медицинское наблюдение за учащимися и персоналом школы по месту учебы сына. Проведена дезинфекция в домашних очагах больной и контактных, в школе, обработан транспорт. Проведена дезинфекция колодца системы канализации по месту проживания больной. Усилен бактериологический контроль за хозяйственно-бытовыми сточными водами – организован ежедневный отбор проб сточных вод из городских биологи-

ческих очистных сооружений канализации.

13 апреля с 10.00 до 14.30, сначала из Белорецка, потом Уфы, получены окончательные результаты исследования нативного материала от больной. Согласно протоколам лабораторного исследования (забор 11 апреля в 20.30, доставка в этот же день в 21.30 с началом исследования в этот же день в Белорецк, доставка материала 12 апреля в 9.10 в Уфу) на основании морфологических, культуральных, биохимических свойств, серологии, чувствительности к фагам возбудитель холеры не выделен. Исследования проведены ускоренными методами (иммунолюминесцентный с использованием иммуноглобулинов флуоресцирующих холерных O1 и O139, реакция иммобилизации вибрионов под влиянием диагностических холерных сывороток O1, Инаба, Огава, RO и O139 серогрупп) и классическими методами.

15 апреля из лаборатории индикации особо опасных инфекций ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Башкортостан» получены результаты исследования проб испражнений методом ПЦР – гены холерного токсина и токсинрегулирующих пилей не определены.

После консультации со специалистами Регионального центра по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней I–II групп патогенности (РосНИПЧИ «Микроб») были проведены дополнительные исследования с целью уточнения диагноза. 15 апреля от больной X. 41 год были направлены в институт испражнения и дуоденальное содержимое, взятое на 16-й день заболевания, парные сыворотки крови от 15, 21 и 28 апреля. От ее сына X. 14 лет – испражнения и дуоденальное содержимое от 4 мая 2008 г. и сыворотки крови от 21, 28 апреля и 4 мая.

При проведении бактериологического исследования испражнений и дуоденального содержимого от больной X. 41 год и ее сына культуры холерного вибриона не обнаружено. При проведении исследования этого же материала методом ПЦР у больной X. ДНК холерного вибриона не обнаружена. У ее сына в пробах дуоденального содержимого (1–2 порции) после концентрирования выявлена ДНК *Vibrio cholerae* (ctxA⁺), что свидетельствует в пользу имевшего место контакта с возбудителем *Vibrio cholerae*.

При исследовании сыворотки крови больной X., полученной на 16-й день от начала заболевания, в реакции агглютинации зарегистрирован положи-

Таблица 1

Титры антител в сыворотках больной X.

Антитела	Титры антител в сыворотке на 16-й день от начала заболевания	Титры антител в сыворотке на 22-й день от начала заболевания	Титры антител в сыворотке на 29-й день от начала заболевания
Агглютинины	1:40	1:80	1:80
Вибриоцидные антитела	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶
Токсиннейтрализующие антитела	1:8	1:8	1:8

Таблица 2

Титры антител в сыворотках контактного Р.

Антитела	Титры антител в сыворотке на 22-й день	Титры антител в сыворотке на 29-й день	Титры антител в сыворотке на 34-й день
Агглютинины	1:40	1:80	1:80
Вибриоцидные антитела	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻³
Токсин-нейтрализующие антитела	1:8	1:12	-

тельный результат со штаммом *V. cholerae* O139 в разведении 1:40, а в сыворотках, полученных на 22 и 29-й день от начала заболевания в разведении 1:80. Определение наличия титров вибриоцидных антител в этих же сыворотках показало, что к 22 и 29-му дню от начала заболевания четко прослеживается нарастание титров вибриоцидных антител. Во всех сыворотках выявлены токсиннейтрализующие антитела (табл. 1).

При изучении сывороток крови контактного с больной Х. – сына Р., полученных в сроки соответствующие 22, 29 и 34-му дню от начала заболевания больной Х, были выявлены агглютинины в реакции агглютинации со штаммом *V. cholerae* O139 соответственно. В первой сыворотке в разведении 1:40, во второй и третьей сыворотках – в разведении 1:80. Титр вибриоцидных антител со штаммом *V. cholerae* O139 в первой сыворотке составил 10⁻³, во второй – 10⁻⁴, и в третьей сыворотке – 10⁻³, а токсиннейтрализующие антитела выявлены в первой сыворотке в титре 1:8, а во второй – 1:12 (табл. 2).

Таким образом, зарегистрированное наличие и нарастание титров специфических антител при анализе парных сывороток больной Х. может свидетельствовать о перенесенном заболевании холерой, вызванной *V. cholerae* O139. А выявленные ДНК *V. cholera* (ctxA⁺) и специфические антитела в сыворотках контактного Р., по-видимому, указывают на перенесенное вибрионоительство.

В течение последних четырех лет в Белорецке наблюдалось 2 заноса холеры из Индии, связанных с религиозными мотивами. Первый случай заноса холеры в этот город в 2004 г. подробно рассмотрен ранее [2]. Заносы холеры с эпидемичной территории Индии в Российскую Федерацию осуществлены лицами, принимавшими антибактериальные препараты, что позволило им пересечь беспрепятственно две государственные границы (Республики Казахстан и Российской Федерации) и доехать до места жительства, используя воздушный, железнодорожный и автомобильный виды транспорта. Это обстоятельство необходимо учитывать при подготовке работников турфирм и турагентств в отношении возможных рисков для здоровья путешественников по маршрутам следования и их профилактике.

Важная роль в решении таких сложных эпиде-

миологических случаев холеры отводится ретроспективной диагностике. В связи с этим необходимо дальнейшее совершенствование методов и препаратов для выполнения иммуноанализа, включая ИФА и биочипы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кологоров А.И., Кедрова О.В., Васенин А.С. Основные закономерности характера распространения холеры в мире в 1996–2006 г. В кн.: Международные медико-санитарные правила и реализация Глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями в государствах-участниках СНГ: Матер. VIII Межгос. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ; 25–26 сентября 2007 г.; Саратов. Саратов, 2007. С. 63–4.
2. Минин Г.Д., Коробов Л.И., Кологоров А.И. и др. О за-возном случае холеры в Белорецке Республики Башкортостан. Пробл. особо опасных инф. 2005; 1(89):23–5.
3. Cholera in 1998. Weekly Epidemiological Record. 1999; 74:257–9.
4. Cholera in 1999. Ibid. 2000; 75:249–56.
5. Cholera in 2000. Ibid. 2001; 76:233–40.
6. Cholera in 2001. Ibid. 2002; 77:257–64.
7. Cholera in 2002. Ibid. 2003; 78:269–76.
8. Cholera in 2003. Ibid. 2004; 79:281–8.
9. Cholera in 2004. Ibid. 2005; 80:261–8.
10. Cholera in 2005. Ibid. 2006; 81:297–307.
11. Cholera in 2006. Ibid. 2007; 82:273–84.

Об авторах:

Топорков В.П., Кологоров А.И., Осина Н.А., Бугоркова Т.В., Щербакова С.А., Портенко С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Кучимова Н.А., Мавлютов О.М., Фарвазова Л.А., Галлямов Р.Г., Иванова И.А. Управление Роспотребнадзора по Республике Башкортостан. 450054, Республика Башкортостан, Уфа, ул. Р. Зорге, 58. E-mail: rpnrb@ufanet.ru

Коробов Л.И., Сыса А.М., Короткова Ю.А. Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Башкортостан. Уфа.

V.P.Toporkov, A.I.Kologorov, N.A.Ossina, T.V.Bugorkova, S.A.Scherbakova, S.A.Portenko, N.A.Kuchimova, O.M.Mavlyutov, L.A.Pharvazova, R.G.Gallyamov, I.A.Ivanova, L.I.Korobov, A.M.Sysa, Yu.A.Korotkova

Post-Event Analysis of Imported Cholera Cases in Beloretsk, the Republic of Bashkortostan, in 2008

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov;
Rospotrebnadzor Administration in Bashkortostan Republic,
Center of Hygiene and Epidemiology in Bashkortostan
Republic, Ufa

The detailed description of imported cholera cases in Beloretsk, the Republic of Bashkortostan, in 2008 is presented. The cases were associated with pilgrimage in India. The similar case of cholera importation was registered in Beloretsk in 2004. Special attention should be paid to the persons returned from religious trips to India as their long stay in cholera endemic country increases the risk of infection. Should there appear gastrointestinal diseases in persons returned from cholera-endemic countries it is advisable to carry out their examination on cholera using bacteriological and serological methods.

Key words: cholera importation, religious tourism, retrospective cholera diagnostic.

Authors:

Toporkov V.P., Kologorov A.I., Ossina N.A., Bugorkova T.V., Scherbakova S.A., Portenko S.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Kuchimova N.A., Mavlyutov O.M., Pharvazova L.A., Gallyamov R.G., Ivanova I.A. Rospotrebnadzor Administration in Bashkortostan Republic. 450054, Bashkortostan Republic, Ufa, R.Zorge St., 58. E-mail: rpnrb@ufanet.ru

Korobov L.I., Sysa A.M., Korotkova Yu.A. Center of Hygiene and Epidemiology in Bashkortostan Republic. Ufa.

Поступила 09.04.09.

И.Н.Шарова¹, И.В.Кутырев², Т.Ю.Красовская¹, В.Н.Чекашов¹, А.Н.Матросов¹, М.М.Шилов¹,
А.И.Удовиков¹, В.В.Дмитриенко³, А.П.Жуковская³, Б.М.Бачаев³, В.Д.Тюнникова³, В.Б.-Х.Санджиев³,
А.А.Кулик³, И.Н.Гайворонский³, А.В.Подсвилов³, В.И.Журавлев⁴, Т.А.Богданова⁴, В.А.Лещук⁴,
В.В.Кабин⁴, А.В.Топорков¹, С.А.Щербакова¹, В.В.Кутырев¹

ПОЛЕВЫЕ ИСПЫТАНИЯ МОБИЛЬНОЙ ЛАБОРАТОРИИ ЭПИДРАЗВЕДКИ И ИНДИКАЦИИ. Сообщение 2. Полевые испытания мобильной лаборатории эпидразведки и индикации на территории Астраханской и Саратовской областей, Республики Калмыкия

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

² ГОУ ВПО Саратовский государственный медицинский университет,

³ ФГУЗ Элистинская противочумная станция, ⁴ ФГУЗ Астраханская противочумная станция

Представлены результаты полевых испытаний мобильной лаборатории в условиях лесостепной, степной и полупустынной зон в осенне-зимний периоды.

Ключевые слова: мобильная лаборатория, индикация, экспресс-диагностика, эпизоотологический мониторинг.

В предыдущем сообщении были представлены результаты испытаний мобильной лаборатории на территории Саратовской области, Ставропольского края и Кабардино-Балкарской Республики. Для следующего этапа испытаний определена территория, курируемая Астраханской и Элистинской ПЧС, которая находится в зоне сухих степей и полупустынь и характеризуется резко континентальным климатом. В степной зоне расположены Прикаспийский Северо-Западный и Волго-Уральский степной природные очаги чумы, в зоне полупустыни – Волго-Уральский песчаный и Прикаспийский песчаный [8].

На различных участках, в том числе и на энзоотической по чуме территории, установлена природная и антропогенная очаговость других бактериальных и вирусных инфекций, таких как туляремия, бешенство, Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ), лихорадка Западного Нила (ЛЗН), лихорадка Тягина, Инко, Батаи, Бханджа, Дхори и др. [2, 6]. Эпизоотический процесс здесь проявляется как в виде спорадических случаев, так и в виде разлитых эпизоотий, что обуславливает необходимость постоянного мониторинга за природно-очаговыми инфекциями.

В целях совершенствования работы лабораторной службы для организации и проведения эпизоотологического мониторинга в природных очагах особо опасных инфекций на территории Астраханской области и Республики Калмыкия мобильная лаборатория эпидемиологической разведки и индикации была задействована в осенний период – сезон ожидаемых обострений эпизоотической обстановки.

Полевые испытания мобильной лаборатории эпидразведки и индикации проходили с 12 по 26 октября 2007 г.: 12.10.2007 – 15.10.2007 гг. – на базе Досангского эпидотряда Астраханской ПЧС, 16.10.2007 – 21.10.2007 гг. – на базе Яндыковского ПЧО Астраханской ПЧС, 21.10.2007 – 25.10.2007 гг. – на базе Яшкульского эпидотряда Элистинской ПЧС.

В соответствии с разработанными совместно со

специалистами Астраханской и Элистинской ПЧС программами испытаний на базе мобильной лаборатории проведено исследование 831 пробы биологического материала (кровь, суспензии блох, органов мелких млекопитающих) на наличие возбудителей бактериальной (чума, туляремия) и вирусной природы (КГЛ, ЛЗН).

На территории Астраханской области мобильная лаборатория была использована при проведении эпизоотологического обследования Волго-Уральского песчаного, Волго-Уральского степного, Прикаспийского Северо-Западного степного, Прикаспийского песчаного природных очагов чумы и других эпидемиологически значимых участков Астраханской области. Специалистами противочумной станции на территории Красноярского, Хараболинского, Ахтубинского, Енотаевского районов Астраханской области, Лаганского, Черноземельского и Юстинского районов Республики Калмыкия добыто 606 экземпляров грызунов (домовая и полевая мышь, обыкновенная полевка, полуденная и гребенщикова песчанка, малая белозубка) и 424 экземпляра эктопаразитов (блохи), объединенных в 463 пробы.

В период работы в п. Досанг (территория Волго-Уральского песчаного природного очага чумы и Волго-Ахтубинской поймы) на наличие маркеров (антигенов, ДНК/РНК) возбудителей опасных бактериальных (чума, туляремия) и вирусных инфекций (КГЛ, ЛЗН) методами ПЦР и ИФА исследовано 219 проб биологического материала: суспензии печени, селезенки, головного мозга мелких млекопитающих, суспензии эктопаразитов. Ни в одном случае положительный результат реакции не получен. Результаты отрицательного бактериологического исследования подтвердили экспресс-диагностику.

Волго-Уральский песчаный природный очаг чумы характеризуется периодической эпизоотической активностью, последняя эпизоотия здесь зарегистрирована в 2005 г. в Красноярском районе [7]. Значительно снизилась активность исторически

сложившегося на территории Астраханской области природного очага туляремии пойменно-болотного типа в Волго-Ахтубинской пойме, однако в результате постоянного антропогенного воздействия вероятно формирование в ряде мест самостоятельных туляремийных очагов и возникновение здесь стойких локальных эпизоотий [1].

В с. Яндыки в мобильной лаборатории с использованием ПЦР и ИФА проведено исследование 179 суспензий органов грызунов и их эктопаразитов, добытых на территории Прикаспийского песчаного природного очага чумы. Культуры чумного микроба (3 штамма) на территории этого очага (Лиманский район) выделены в период эпизоотии чумы в 2006 г. [7]. Ранее (1981, 1992 и 1995 гг.) инфицированных домовых мышей и крыс (Лиманский и Наримановский районы Астраханской области) вылавливали в жилье человека и надворных постройках [3]. В ходе экспедиции маркеры *Y. pestis* в биологическом материале не обнаружены. Результаты индикации в 100 % случаев совпали с результатами бактериологического исследования. Кроме того, полученный биологический материал дополнительно тестировали на наличие возбудителей туляремии, КГЛ и ЛЗН. Ни в одном случае положительных результатов реакций не зарегистрировано.

Сотрудниками Енотаевского противочумного отделения в мобильную лабораторию доставлены 65 проб печени и селезенки грызунов, добытых на бывших эпизоотийных чумных и туляремийных точках. В результате исследований с помощью ИФА и ПЦР маркеры возбудителей чумы и туляремии не обнаружены.

В Республике Калмыкия (пос. Яшкуль) мобильная лаборатория эпидразведки и индикации была задействована при эпизоотологическом обследовании территории Прикаспийского Северо-Западного степного природного очага чумы, курируемой Элистинской ПЧС, а также природных очагов туляремии, КГЛ и ЛЗН. В мобильном модуле методами ИФА и ПЦР исследовали материал от 1175 экземпляров мелких млекопитающих (домовая мышь, обыкновенная и обыкновенная полевка, полуденная и гребенщикова песчанка, землеройка, серый хомячок), объединенных в 368 проб. ДНК возбудителя чумы методом ПЦР выявлена в трех пробах суспензий органов полуденных песчанок, отловленных на одной точке (08014, Аз. 50°, 6,5 км от Адыка). При этом результаты бактериологического исследования были отрицательными. Одна проба (суспензия органов домовой мыши) была положительной в ИФА на наличие антигена вируса ККГЛ.

Объем выполненных исследований за период экспедиции показал, что в мобильной лаборатории два специалиста (согласно штатному расписанию) могут обеспечить проведение методом ПЦР до 120 исследований в сутки, методом ИФА – до 200.

За время проведения испытаний среднесуточная температура воздуха составила плюс 14–17 °С, мини-

мальная температура воздуха на начало рабочего дня (8.00 ч) зафиксирована плюс 2 °С. Использование автономного автомобильного отопителя позволяло поддерживать температуру в рабочей зоне лаборатории в течение всей смены в интервале 19–25 °С.

Из-за постоянного кратковременного отключения электричества в пос. Яшкуль энергоснабжение мобильной лаборатории обеспечивали только с помощью бензинового генератора. Этапы проведения исследований строили с учетом времени его бесперебойной работы.

Общий пробег автомашины за период экспедиции составил 2502 км.

Замечаний к работе оборудования и приборного обеспечения не было.

С 28 января по 2 февраля 2008 г. мобильная лаборатория была использована при проведении эколого-эпизоотологического обследования лесных массивов, прилегающих к г. Аткарск. Аткарский район – один из шести районов Саратовской области, являющихся наиболее неблагоприятными по ГЛПС, где регистрируются природные очаги этой инфекции. По уровню среднегодовой заболеваемости ГЛПС и степени активности очагов его территория отнесена к группе высокоактивных [4]. Кроме того, очаги ГЛПС на территории Аткарского района сопряжены с природными очагами туляремии [5, 9]. Существование здесь сочетанных очагов обусловлено ландшафтными условиями лесостепной зоны, многообразием населяющих ее мелких млекопитающих и беспозвоночных животных, носителей вируса ГЛПС и возбудителя туляремии, а также наличием переносчиков *F. tularensis*, хранителей этой инфекции. Преобладающими видами грызунов, в пробах органов которых преимущественно обнаруживается хантавирусный антиген и возбудитель туляремии, являются обыкновенная и рыжая полевки, домовые, лесные и полевые мыши, бурозубка обыкновенная.

Сбор материала выполняла зоологическая группа РосНИПЧИ «Микроб» в соответствии с действующими инструктивно-методическими документами. В 6 пунктах учета выставлено шесть линий давилок по 100 штук каждая, накоплено 600 ловушко-ночей. Всего добыто 74 экземпляра мелких млекопитающих 6 видов и одна большая синица. По видовому составу во всех обследованных местах доминировала рыжая полевка – 8,6 % (индекс доминирования 70,2 %), за ней следуют бурозубка обыкновенная – 1,3 % (10,8 %) и лесная мышь – 1,2 % (9,4 %).

Все работы, в том числе по предварительной подготовке проб (определение вида грызунов и их генеративного состояния, счес эктопаразитов, вскрытие животных, приготовление суспензий органов), проводили в мобильной лаборатории.

Комплексное лабораторное исследование материала, собранного в ходе эпизоотологического обследования, осуществляли с использованием иммуносуспензионного (ИФА) и молекулярно-генетического (ПЦР) методов два специалиста согласно штатному

расписанию. Образцы 10 %-ных суспензий органов мелких млекопитающих и птиц (легкие, селезенка и печень) тестировали на наличие маркеров возбудителей ГЛПС и туляремии.

Всего исследовано 75 проб внутренних органов от 75 экземпляров животных. По результатам ИФА и ПЦР маркеры вируса ГЛПС (антиген и/или РНК) выявлены в 7 пробах суспензий органов мелких млекопитающих, из них от рыжей полевки – в 5, от лесной мыши – в 1, от буроzubки обыкновенной – в 1. Инфицированность носителей хантавирусом составила 9,3 %. Животные, позитивные на ГЛПС, добыты на трех точках: г. Аткарск, Аз. 59°, 7,5 км, лиственный лес (1 проба); г. Аткарск, Аз. 53°, 5 км, лиственный лес (1 проба); г. Аткарск, Аз. 184°, 11,5 км, пойменный лес (5 проб). В одном случае (суспензия органов от рыжей полевки, г. Аткарск, Аз. 184°, 11,5 км, пойменный лес) положительный результат получен при использовании обоих методов.

Общая инфицированность туляремией составила 8,0 %. Методом ИФА выявлено 6 положительных проб, из них от рыжих полевок – 4, лесной мыши – 1, полевой мыши – 1. Результаты ПЦР во всех случаях были отрицательными.

Данные эколого-эпизоотологического обследования и выявление в 9,3 % случаев маркеров хантавирусной инфекции у носителей свидетельствуют о возможности возникновения единичных случаев заболевания людей ГЛПС на территории Аткарского района.

В период полевых испытаний отмечалась относительно прохладная погода со среднесуточной температурой воздуха около минус 5 °С. Ночью температура падала до минус 7 – минус 14 °С, повышаясь в отдельные дни в дневной период до минус 1 °С. Максимально низкая температура днем в период экспедиции составила минус 14 °С. Снежный покров устойчивый.

В целом, отрицательные значения температуры воздуха не сказались на эффективности работы автономного автомобильного электронагревателя, который обеспечивал и поддерживал температуру в рабочей зоне лаборатории на уровне 19–24 °С. Однако период, в течение которого температура достигала указанных значений, увеличился по сравнению с осенним и весенним (до 30 мин) сезонами в 2 раза. Это необходимо учитывать при планировании времени начала работы, если лаборатория не отапливается ночью. Расход топлива на работу электронагревателя в зимний период повысился на 10 %.

Несмотря на значительные перепады температур от плюсовых при принудительном обогреве, до минусовых после отключения автомобильного отопителя, сбоев в работе оборудования и приборного обеспечения не было.

Не выявлено влияния низких температур на работу электрогенератора. Следует отметить, что для устранения основного недостатка, установленного при эксплуатации генератора в ходе предыдущих

экспедиций (продолжительность его непрерывной работы 3 ч при максимальной нагрузке и необходимость отключения для дозаправки), произведена замена топливного бака. Емкость бака была увеличена с 9 до 22 л. Это позволило обеспечить бесперебойную работу оборудования мобильной лаборатории в течение 9 ч (время эксплуатации электрогенератора в период проведения исследований).

По окончании экспедиций был произведен расчет стоимости одного исследования, проводимого в полевых условиях на базе мобильной лаборатории. При расчете фактической стоимости одного анализа учитывали прямые затраты (стоимость диагностических тест-систем и расходных материалов) на проведение каждого метода по конкретной нозологической единице и косвенные (затраты на горюче-смазочные материалы (ГСМ), командировочные расходы, заработную плату, амортизацию оборудования, мобильную связь и др.). Все косвенные затраты разделили в процентном соотношении по видам проводимых лабораторных исследований в зависимости от степени их сложности. На ПЦР метод выпало 50 % от всей суммы косвенных затрат, на ИФА – 35 %, на МФА – 15 %. Сумму косвенных затрат по каждому методу исследований разделили на количество анализов и умножили на коэффициент сложности для каждой нозологической формы. ПЦР метод: чума, туляремия, холера – 0,9; сибирская язва, бруцеллез – 1,0; КГЛ, ЛЗН, грипп птиц – 1,1. ИФА метод: чума, туляремия, бруцеллез – 0,9; КГЛ, ЛЗН – 1,15. МФА метод: чума, туляремия, холера, сибирская язва – 1,0. Сложили косвенные затраты с прямыми и получили стоимость одного анализа по каждому методу с учетом конкретной нозологической формы. При расчете плановой стоимости одного исследования на базе мобильной лаборатории в косвенные затраты не была включена сумма, израсходованная на приобретение ГСМ, необходимых для переезда в пункты назначения. Материальные затраты (без учета средств на приобретение горючесмазочных материалов, необходимых для переезда в пункты назначения) на проведение в полевых условиях в мобильном модуле одного исследования с целью детекции опасных бактерий и вирусов с использованием ПЦР составили в среднем 56 руб, методом ИФА – 37 руб, МФА – 36 руб.

Таким образом, в 2007–2008 гг. проведены испытания мобильной лаборатории в полевых условиях различных ландшафтно-климатических зон: лесостепной, степной, полупустынной, в условиях высокогорных районов, на территории Саратовской, Астраханской областей, Ставропольского края, Кабардино-Балкарской Республики и Республики Калмыкия в различные сезонные периоды года (весна, лето, осень, зима). На базе мобильного модуля в автономном режиме выполняли исследования биологического материала от больных людей и животных (кровь, сыворотка крови, суспензии эктопаразитов и органов животных), проб объектов окружающей среды (почва, вода открытых водоемов) с использова-

нием комплекса методов специфической индикации патогенных биологических агентов: метода флуоресцирующих антител (МФА), иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) на наличие возбудителей таких опасных инфекций как чума, туляремия, сибирская язва, холера, бруцеллез, лептоспироз, Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ), лихорадка Западного Нила (ЛЗН), геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), грипп птиц.

Суммируя данные сообщения I и II можно заключить, что мобильная лаборатория соответствует заявленным тактико-техническим характеристикам.

Технические характеристики лаборатории

1. Лаборатория, оборудованная на базе автомобиля повышенной проходимости ГАЗ 27057, может эксплуатироваться как на асфальтовых, так и грунтовых дорогах. Автомашина устойчиво ведет себя при мокром и скользком покрытии трассы, на заснеженной дороге. Средний расход топлива автомобилем на 100 км составляет 18 л. Общий пробег автомашины – 6532 км.

2. Бензиновый электрогенератор обеспечивает работу приборов и оборудования в автономных условиях при отсутствии внешнего источника питания. Расход топлива на работу электрогенератора в период максимальной нагрузки составляет 3 л/ч. Время непрерывной работы генератора – 9 ч.

3. Во всех климатических зонах, при любых погодных условиях, в различные сезонные периоды года оборудование, а также все системы функционировали бесперебойно и создавали комфортные условия продолжительной работы для персонала. В жаркий период работа кондиционера обеспечивает температуру воздуха в рабочей зоне лаборатории 20–25 °С, расход топлива при этом составляет 2 л/ч. В холодный период автономный автомобильный отопитель поддерживает температуру в модуле на уровне 19–24 °С. На один час работы отопителя при температуре окружающей среды близкой к 0 °С требуется до 0,3 л бензина. При понижении внешней температуры до минус 5 °С расход бензина увеличивается на 10 %.

4. GPS-навигатор позволяет рассчитывать и контролировать маршрут движения и его протяженность. Сотовый телефон с системами подключения нового поколения обеспечивает оперативную передачу и получение необходимой информации.

Обеспечение режима биологической безопасности при работе с исследуемым материалом

При проведении лабораторной диагностики особо опасных инфекций использование современных средств индивидуальной защиты, бактерицидных облучателей, бокса биологической безопасности III класса, ПЦР-бокса, а также вентиляционной установки, снабженной фильтрами тонкой очистки, позволяет обеспечить необходимый уровень биологической безопасности работ и антиконтаминационный режим при выполнении ПЦР-анализа, что соответствует

требованиям СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» и МУ 1.3.1798-03 «Организация работы при исследовании методом ПЦР материала, инфицированного микроорганизмами I-II групп патогенности».

Производительная мощность мобильной лаборатории

1. Оборудование для постановки ПЦР, ИФА и МФА отвечает современным требованиям и позволяет в автономном режиме, в полевых условиях осуществлять индикацию возбудителей особо опасных инфекций бактериальной и вирусной природы при исследовании биологического материала и объектов окружающей среды, проводить экспресс-диагностику опасных инфекционных заболеваний.

2. Всего в ходе испытаний проведено 8844 исследования, включая тестирование шифрованных проб. В полевом материале обнаружены антигены, ДНК/кДНК возбудителей чумы в 5 случаях, туляремии – в 6, КГЛ – в 7, ГЛПС – в 8, в шифрованных образцах выявлены маркеры *Y. pestis* – 12, *F. tularensis* – 36, *V. cholerae* – 12, *B. anthracis* – 20, лептоспироза – 9, гриппа птиц – 9. Совпадение полученных результатов с данными шифрования проб – 100 %.

3. Максимальная производительность лаборатории с использованием МФА, ИФА и ПЦР составила 540 исследований/сут, средняя – 250 исследований/сут.

Оценка затратных механизмов

Затраты (без учета средств на приобретение горючесмазочных материалов, необходимых для переезда в пункты назначения) на проведение в полевых условиях в мобильном модуле одного исследования с целью индикации микроорганизмов бактериальной и вирусной природы с использованием ПЦР составили 56 руб, методом ИФА – 37 руб, МФА – 36 руб.

Мобильная лаборатория эпидемиологической разведки и индикации может быть использована в учреждениях Роспотребнадзора для экстренных выездов в отдаленные районы с целью проведения в полевых условиях индикации ПБА и экспресс-диагностики опасных инфекционных болезней, при мониторинге природно-очаговых инфекций, а также для усиления специализированных формирований постоянной готовности Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека при работе в условиях чрезвычайных ситуаций.

Для рационального функционирования мобильной лаборатории и повышения эффективности диагностических исследований необходимы:

- разработка средств индикации и лабораторной диагностики ООИ на основе технологий ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени и биочипов, позволяющих быстро и качественно осуществлять одновременную детекцию ряда возбудителей, или тестирование одного патогена по нескольким признакам (эпидемиологической значимости, анти-

биотикоустойчивости и др.);

- разработка нормативно-методических документов, регламентирующих все этапы работы и операционные процедуры, осуществляемые в мобильных лабораториях;

- стандартизация и унификация алгоритмов и схем индикации ПБА и лабораторной диагностики бактериальных и/или вирусных инфекций в условиях мобильной лаборатории.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондарев В.А. Характеристика современного состояния природных очагов туляремии в правобережье Астраханской области. В кн.: Природно-очаговые особо опасные инфекции на юге России, их профилактика и лабораторная диагностика. Астрахань; 2001. С. 94–96.
2. Ковтунов А.И., Седова А.Г., Джаркенов А.Ф. и др. О некоторых результатах эпидемиологического надзора за природно-очаговыми инфекциями в Астраханской области. В кн.: Природно-очаговые особо опасные инфекции на юге России, их профилактика и лабораторная диагностика. Астрахань; 2001. С. 128–35.
3. Козлова Т.А., Рогаткин А.К., Кабин В.В., Агапов Б.Л. Эпизоотическая ситуация по чуме в последние 15 лет XX века. В кн.: Природно-очаговые особо опасные инфекции на юге России, их профилактика и лабораторная диагностика. Астрахань; 2001. С. 47–53.
4. Коротков В.Б., Наумов А.В., Самойлова Л.В. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом в Саратовской области (эпидемиологические аспекты). Саратов; 1996. 124 с.
5. Коротков В.Б., Самойлова Л.В., Кресова У.А., Щербакова С.А. Эпидемиологический надзор за сопряженными природными очагами геморрагической лихорадки с почечным синдромом и туляремии на территории Саратовской области. В кн.: Международные медико-санитарные правила и реализация глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями в государствах-участниках СНГ: Матер. VIII Межгос. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ; 25–26 сент. 2007 г.; Саратов. Саратов; 2007. С. 67–8.
6. Подсвилов А.В., Санджиев В.Б.-Х., Дмитриенко В.В. и др. Эпидемиологические особенности Крымской-Конголезной геморрагической лихорадки в Республике Калмыкия в 2000 году. В кн.: Природно-очаговые особо опасные инфекции на юге России, их профилактика и лабораторная диагностика: Сб. науч. тр. Астрахань; 2001. С. 150–1.
7. Попов Н.В., Бессмертный В.Е., Новиков Н.Л. и др. Современное состояние и прогноз эпизоотической активности природных очагов чумы Российской Федерации на 2007 г. Пробл. особо опасных инф. 2007; 1(93):11–6.
8. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. М.; 2004. 192 с.

9. Федорова З.П. Туляремия в Саратовской области [дис. ... канд. мед. наук]. Саратов, 1995. 177 с.

Об авторах:

Шарова И.Н., Красовская Т.Ю., Чекашов В.Н., Матросов А.Н., Шилов М.М., Удовиков А.И., Топорков А.В., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. Тел. (845-2) 26-21-31. E-mail: microbe@san.ru
Кутырев И.В. Саратовский государственный медицинский университет. 410012, Саратов, ул. Б. Казачья, 112.
Дмитриенко В.В., Жуковская А.П., Бачаев Б.М., Тюнникова В.Д., Санджиев В.Б.-Х., Кулик А.А., Гайворонский И.Н., Подсвилов А.В. Элистинская противочумная станция. Элиста. E-mail: pestis@elista.ru
Журавлев В.И., Богданова Т.А., Лещук В.А., Кабин В.В. Астраханская противочумная станция. Астрахань. E-mail: antichum@astranet.ru

I.N.Sharova, I.V.Kutyrev, T.Yu.Krasovskaya, V.N.Chekashov, A.N.Matrosov, M.M.Shilov, A.I.Udovikov, V.V.Dmitrienko, A.P.Zhukovskaya, B.M.Bachaev, V.D.Tyunnikova, V.B-Kh.Sandzhiev, A.A.Kulik, I.N.Gayvoronskiy, A.V.Podsvirov, V.I.Zhuravlev, T.A.Bogdanova, V.A.Leschuk, V.V.Kabin, A.V.Toporkov, S.A.Scherbakova, V.V.Kutyrev

Field Trial of Mobile Laboratory of Epidemiologic Survey and Indication. Communication 2. Field Trial of Mobile Laboratory of Epidemiologic Survey and Indication on the Territory of Astrakhan and Saratov Regions, Republic of Kalmykia

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov; Saratov State Medical University; Elista Anti-Plague Station; Astrakhan Anti-Plague Station

Presented are the field trial results of mobile laboratory in the forest-steppe, steppe and semi-desert regions in autumn and winter periods.

Key words: mobile laboratory, indication, express diagnosis, epizootiological monitoring.

Authors:

Sharova I.N., Krasovskaya T.Yu., Chekashov V.N., Matrosov A.N., Shilov M.M., Udovikov A.I., Toporkov A.V., Scherbakova S.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru
Kutyrev I.V. Saratov State Medical University. 410012, Saratov, B. Kazach'a St., 112
Dmitrienko V.V., Zhukovskaya A.P., Bachaev B.M., Tyunnikova V.D., Sandzhiev V.B-Kh., Kulik A.A., Gayvoronskiy I.N., Podsvirov A.V. Elista Anti-Plague Station. Elista. E-mail: pestis@elista.ru
Zhuravlev V.I., Bogdanova T.A., Leschuk V.A., Kabin V.V. Astrakhan Anti-Plague Station. Astrakhan. E-mail: antichum@astranet.ru

Поступила 20.03.09.

С.П.Заднова, Л.Ф.Ливанова, Ю.В.Лозовский, Н.И.Смирнова

ВЫЯВЛЕНИЕ В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА КЛОНОВ С РАЗЛИЧНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ФАКТОРОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ И ПЕРСИСТЕНЦИИ И ИХ ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

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

При изучении популяционного состава 41 природного штамма *Vibrio cholerae* эльтор биовара получены новые данные о популяционной гетерогенности природных штаммов. Обнаружено 12 штаммов, формирующих типичные прозрачные и атипичные мутные колонии. Среди последних выявлено 3 штамма, вариабельность морфологии которых коррелировала с изменением продукции экзополисахарида, холерного токсина, гемолизина, растворимой гемагглютинин/протеазы и подвижности. Одним из внешних сигналов, вызывающих координированное переключение продукции указанных факторов патогенности и персистенции является щелочная (pH 9,0) реакция среды. Возможно, переключение «прозрачные-мутные» варианты относится к одной из форм фазовых вариаций и необходимо *V. cholerae* для выживания в изменяющихся условиях внешней среды.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, гетерогенная популяция, координированное переключение экспрессии генов вирулентности и персистенции.

Vibrio cholerae – возбудитель холеры, тяжелого диарейного заболевания, относится к группе патогенных бактерий, которые в определенных условиях способны существовать не только в организме хозяина (человек), но и вне его – в воде открытых водоемов. Пребывание в таких разных экологических нишах приводит к появлению фенотипически и генотипически измененных форм. В настоящее время накоплен значительный фактический материал, свидетельствующий о том, что изменчивости подвергаются все основные фенотипические признаки холерного вибриона (морфология колоний, серологические, биохимические, антигенные и другие свойства) [1, 3, 6]. Появление измененных вариантов *V. cholerae* затрудняет идентификацию возбудителя. Фенотипическая изменчивость может быть следствием различной экспрессии генов патогенности и персистенции. В связи с этим большой интерес вызывает анализ вариантов, отличающихся от типичных форм одновременно по нескольким фенотипическим свойствам. Появление таких клонов может быть связано с согласованным изменением экспрессии ряда генов, что является одним из важных механизмов адаптации этого патогена к меняющимся условиям среды обитания.

В связи с вышеизложенным целью нашей работы состояла в выявлении штаммов *V. cholerae*, имеющих в популяции клоны с измененными морфологическими свойствами, и их фенотипический анализ.

Материалы и методы

В работе был использован 41 штамм *V. cholerae* биовара эльтор и 4 штамма *V. cholerae* классического биовара, полученные из Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» (Саратов).

При определении подвижности клеток (Mot)

учитывали зону распространения колонии в мм у подвижных штаммов или отсутствие таковой у неподвижных при культивировании на полужидком 0,6 % LB-агаре. Продукцию растворимой гемагглютинин/протеазы (Har) определяли путем посева культур на агар, содержащий 10 % обезжиренного молока, гемолитическую активность (Hly) – с использованием сред, содержащих эритроциты барана. Продукцию холерного токсина (CT) определяли иммуноферментным методом GM₁ ELISA [15] после выращивания холерных вибрионов классического биовара в LB бульоне (pH 7,2) при 30 °C на круговой качалке, а штаммов *V. cholerae* эльтор биовара в АК1 бульоне при 37 °C по схеме [12].

Для определения синтеза белков проводили электрофорез по методу U.K.Laemmli [13]. Для выявления экзополисахаридов гелевую пластину после проведения электрофореза окрашивали раствором, содержащим 20 % азотнокислого серебра, и проявляли в растворе с добавлением 0,05 % формалина [11, 13]. Токсигенность культур определяли по методу, описанному S.N.De и D.N.Chatterjee [4]. Формирование биопленки определяли, выращивая культуру в LB бульоне в полистироловых плашках (объем 200 мкл) [14].

Результаты и обсуждение

В ранее проведенной работе при изучении популяционного состава 76 природных штаммов *V. cholerae* классического биовара (возбудителя 5-й и 6-й пандемий азиатской холеры) было выявлено 20 штаммов, формирующих типичные прозрачные или Т (от англ. translucent) и атипичные мутные или О (от англ. opaque) колонии. Поскольку морфологические изменения могут сопровождаться изменением

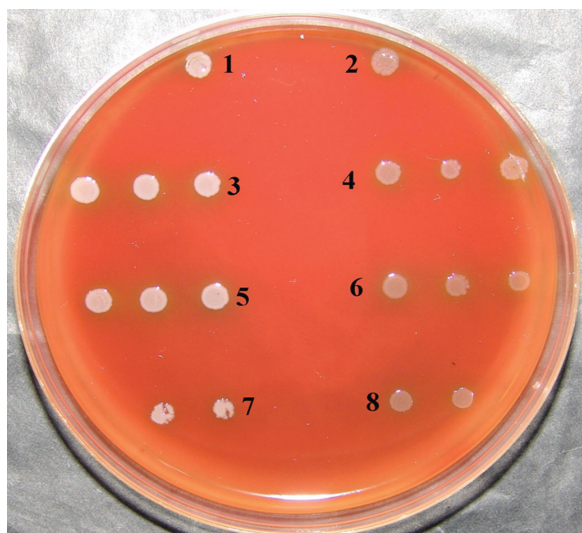


Рис. 1. Морфология колоний штаммов *V. cholerae* эльтор биовара:

1–2 – М-1085 эльтор биовара; 3–4 – М-1326 эльтор биовара;
5–6 – С-418 эльтор биовара; 7–8 – 9361 классического биовара
(контроль). Четные номера – варианты, формирующие прозрачные колонии; нечетные – мутные колонии

других признаков, включая и свойства, определяющие вирулентность популяции, у изогенных вариантов данных штаммов была изучена продукция ряда факторов патогенности и персистенции. При этом впервые было выявлено 5 штаммов, вариабельность морфологии которых коррелировала с изменением продукции экзополисахарида, холерного токсина, растворимой гемагглютинин/протеазы и подвижности [2]. Для выявления штаммов *V. cholerae* эльтор

биовара (возбудителя 7-й пандемии холеры), также содержащих клоны с одновременным изменением продукции нескольких факторов патогенности и персистенции, была изучена коллекция из 41 штамма, выделенных в разное время и на различных территориях России и стран зарубежья. В результате морфологического анализа выявлено 12 штаммов (или 30 % от числа изученных), в популяции которых, наряду с Т клонами, были обнаружены О варианты (рис. 1). При этом у 7 штаммов вариабельность морфологии колоний сопровождалась изменением продукции 2–4 факторов патогенности. Особое внимание привлекли штаммы *V. cholerae* М-1326, М-1085 и С-418, содержащие варианты, которые отличались друг от друга одновременно по четырем признакам. Т варианты синтезировали меньшее количество СТ, но больше Hly, Нар и были более подвижны, чем О варианты (таблица). Фенотип Т клонов был обозначен как Т Tox⁺Hly⁺Nar⁺Mot⁺, а О вариантов – как О Tox⁺Hly⁺Nar⁺Mot⁺. Полученные нами результаты относительно синтеза СТ и гемолизина у О вариантов эльтор вибрионов соответствовали данным литературы [7]. В то же время сведения о продукции Нар и подвижности у О вариантов эльтор вибрионов представлены нами впервые.

При сравнительном анализе Т и О вариантов холерных вибрионов разных биоваров было выявлено, что Т варианты классических вибрионов в отличие от Т вариантов холерных эльтор вибрионов были более токсигенны, продуцировали незначительное количество Нар и были менее подвижны (Т Tox⁺Nar⁺Mot⁺), чем О варианты, фенотип кото-

Фенотипические свойства двух морфологически различных вариантов *V. cholerae* эльтор и классического биоваров

Штаммы <i>V. cholerae</i>	Фенотип				
	Продукция СТ, мкг/мл	Продукция гемолизина, мм*	Подвижность, мм**	Продукция Нар, мм***	Морфология колоний
Холерные вибрионы биовара эльтор					
М-1085	0,01±0,006	3,0±0,4	5,0±0,5	5,0±0,5	Т
	0,17±0,005	1,0±0,4	2,0±0,3	3,0±0,5	О
С-418	0,02±0,005	3,0±0,2	10,0±0,4	3,0±0,3	Т
	0,06±0,02	1,0±0,5	1,0±0,3	2,0±0,4	О
М-1326	0,02±0,005	4,0±0,5	10,0±0,5	3,0±0,2	Т
	1,1±0,05	2,0±0,5	1,0±0,3	2,0±0,6	О
Холерные вибрионы классического биовара					
Дакка 35	13,0±1,0	0,0	2,0±0,2	2,0±0,5	Т
	0,03±0,02	0,0	8,0±0,5	6,0±0,5	О
9361	2,8±0,5	0,0	5,0±0,3	1,0±0,6	Т
	0,01±0,01	0,0	15,0±0,5	5,0±0,7	О
В-1307	3,0±0,5	0,0	3,0±0,5	3,0±0,2	Т
	0,02±0,01	0,0	10,0±0,5	6,0±0,4	О
49520	8,0±0,5	0,0	0,0	2,0±0,5	Т
	0,02±0,004	0,0	1,0±0,2	3,0±0,5	О

Примечания: * – в мм дана ширина зоны гемолиза; ** – в мм представлен радиус распространения макроколонии в полужидком агаре; *** – в мм дана зона просветления на агаре с 10 % молоком. Т – прозрачные, О – мутные колонии.

рых был $O\ Tox^+Har^{++}Mot^{++}$ (таблица). Гемолизин, как известно, вибрионы классического биовара не продуцируют.

Обнаруженный обратный характер связи между морфологией колоний и продукцией СТ, Har, а также подвижностью у холерных вибрионов двух биоваров, возможно, является следствием различной регуляции экспрессии данных факторов патогенности у *V. cholerae cholerae* и *V. cholerae eltor* [5, 9].

При определении токсигенности двух изогенных вариантов штаммов эльтор биовара (*V. cholerae* M-1085 и 1326) на модели лабораторных животных обнаружено, что Т и О клоны были токсигенны и обладали выраженным холерогенным эффектом, вызывая сильное растяжение и истончение стенок кишечника и накопление значительного количества жидкости внутри кишечника. Полученные нами данные не согласуются с данными литературы. Так, О варианты штамма *V. cholerae* 3083 Огава не отличались по токсигенности от Т клонов, *V. cholerae* C6709 обладали сниженной токсигенностью, в тоже время О варианты штамма *V. cholerae* C6707 так же, как и в нашем случае, были более токсигенными, чем Т колонии [7]. При сравнительном изучении токсигенности Т и О вариантов классического и эльтор вибрионов обнаружено, что изученные О варианты классического биовара были атоксигенными в отличие от Т клонов.

Присутствие в природных популяциях штаммов *V. cholerae* как классического, так и эльтор биовара О клонов ставит вопрос о том, какие клеточные структуры определяют непрозрачную морфологию колоний? Одной из возможных причин появления атипичных по морфологии колоний холерного вибриона может быть продукция белков внешней мембраны и/или экзополисахаридного слоя, кодируемого генами *vps* (от англ. *Vibrio polysaccharide synthesis*) [7, 17]. При изучении Т и О клонов штаммов классического биовара нами не выявлено различий по составу белков внешней мембраны, но впервые обнаружен экзополисахаридный слой (EPS) на поверхности клеток О вариантов [2]. При сравнительном анализе белкового спектра изогенных вариантов штаммов *V. cholerae* эльтор биовара нами также не обнаружено различий по составу белков внешней мембраны. В то же время при проведении гель-электрофореза и последующем окрашивании гелевых пластин ионами серебра у О вариантов эльтор вибрионов так же, как и у классических вибрионов, обнаружено большее количество экзополисахарида, который выявлялся в нижней части электрофореграммы (рис. 2). Полученные экспериментальные данные дают основание предположить, что различия в морфологии колоний у изогенных вариантов обусловлены слабой экспрессией *vps* генов у Т-клонов.

Механизм появления мутных О колоний, связанный с продукцией капсульного полисахарида, выполняющего защитную функцию, подробно изучен у родственных видов *V. parahaemolyticus* и *V. vulnificus*. Переключение «мутные-прозрачные» варианты у

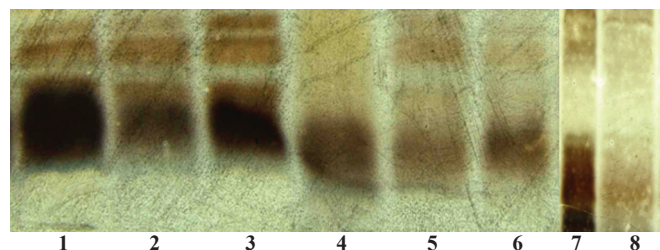


Рис. 2. Выявление экзополисахарида в штаммах *V. cholerae* эльтор биовара (окраска азотнокислым серебром):

1 – $O\ Tox^{++}Hly^+Har^+Mot^+$ вариант M-1326; 2 – $T\ Tox^{++}Hly^+Har^+Mot^+$ вариант M-1326; 3 – $O\ Tox^{++}Hly^+Har^+Mot^+$ вариант C-418; 4 – $T\ Tox^{++}Hly^+Har^+Mot^+$ вариант C-418; 5 – $T\ Tox^{++}Hly^+Har^+Mot^+$ вариант M-1085; 6 – $O\ Tox^{++}Hly^+Har^+Mot^+$ вариант M-1085; 7–8 (контроль) соответственно $O\ Tox^+Har^{++}Mot^{++}$ и $T\ Tox^{++}Har^+Mot^+$ клоны *V. cholerae* Дакка 35 классического биовара

данных микроорганизмов классифицируется как фазовые вариации. При изучении механизма фазовых вариаций было установлено влияние условий внешней среды (температуры, аэрации, времени инкубации), глобального регулятора сигма-фактора RpoS, фосфатазы. Обнаружены позитивный и негативный регуляторы продукции капсульного полисахарида [8, 10]. У *V. cholerae* также обнаружены фазовые вариации – «гладкие-ругозные». Появление ругозных колоний связано с продукцией на поверхности клеток значительного количества экзополисахарида. Наличие дополнительного экзополисахаридного слоя обеспечивает адаптивные преимущества клеткам и защищает их от повреждающих факторов внешней среды (хлор, кислый pH, ультрафиолетовое излучение, осмотический и оксидативный стресс, действие сывороток и комплемента), уничтожения простейшими, инфицирования фагами, а также повышает способность к формированию биопленки. Как известно, в составе биопленки вирулентные клоны *V. cholerae* способны к длительной персистенции во внешней среде [16].

Для выяснения функциональной роли EPS, обнаруженного на поверхности О клонов классических и эльтор вибрионов, была изучена способность изогенных вариантов к формированию биопленки, а также проведен сравнительный анализ резистентности двух клонов штамма *V. cholerae* Дакка 35 классического биовара и *V. cholerae* M-1326 эльтор биовара к действию осмотического (2,5 М раствор NaCl) и оксидативного (20 мМ раствор перекиси водорода) стрессов. В результате проведенных исследований установлено, что Т и О варианты как классических, так и эльтор вибрионов не отличаются по способности формировать биопленку. В то же время при изучении устойчивости О вариантов к стрессовым факторам было обнаружено, что $O\ Tox^+Har^{++}Mot^{++}$ клоны *V. cholerae* Дакка 35 действительно более устойчивы к действию высоких концентраций соли и перекиси водорода, чем $T\ Tox^{++}Har^+Mot^+$ варианты. При одинаковой начальной концентрации бактерий в растворе клетки $T\ Tox^{++}Har^+Mot^+$ варианта в присутствии высокой концентрации соли и перекиси водорода к концу

опыта снизили свою численность почти в 100 раз, тогда как снижение КОЕ у O Tox⁺Нар⁺⁺Mot⁺⁺ вариантов было незначительным. В то же время у эльтор вибрионов не обнаружено отличий по выживаемости между Т и О вариантами при действии данных стрессовых факторов.

Таким образом, обнаруженный на поверхности О вариантов холерного вибриона экзополисахаридный слой определяет морфологию колоний, но не оказывает значительного влияния на их способность формировать биопленку. EPS О вариантов *V. cholerae* классического биовара повышает устойчивость клеток к действию осмотического и оксидативного стрессов и образуется, видимо, в результате адаптации холерных вибрионов к неблагоприятным воздействиям окружающей среды. Функциональная роль экзополисахарида О вариантов эльтор вибрионов пока не установлена.

Одновременное изменение экспрессии нескольких генов вирулентности и персистенции у изученных штаммов *V. cholerae* указывает на присутствие у холерного вибриона общего белка-регулятора и/или регуляторной системы. Среди изученных и описанных в литературе регуляторных систем, контролирующих продукцию факторов патогенности и персистенции, мы не нашли сведений об участии какой-либо из них в одновременном изменении продукции СТ, Нар, экзополисахарида и подвижности. Возможно, у *V. cholerae* существует еще неизвестная двухкомпонентная регуляторная система, которая в ответ на определенные сигналы внешней среды изменяет экспрессию генов *ctxAB*, *hapA*, *vps*, *hly*, кодирующих соответственно синтез СТ, Нар, экзополисахарида, гемолизина, а также подвижность. В пользу данного предположения указывают результаты, полученные при изучении сигналов внешней среды, вызывающих координированное переключение экспрессии факторов патогенности и персистенции в изученных штаммах *V. cholerae*.

В качестве сигналов внешней среды было исследовано влияние различных факторов (температура, pH, осмолярность, присутствие аминокислот), изменяющих экспрессию известных регуляторных белков (ToxRS, ToxT, TcrPH, AphAB) [6]. В результате проведенных исследований выявлено, что одним из внешних сигналов, вызывающих одновременное альтернативное переключение активности генов, кодирующих продукцию экзополисахарида, холерного токсина, растворимой гемагглютинин/протеазы, гемолизина и подвижности, является щелочная (pH 9,0) реакция среды. При культивировании штаммов на средах с pH 9,0 в популяции Т колоний появлялись О варианты с координированным изменением экспрессии указанных генов.

Таким образом, важным итогом проведенных исследований является получение новых данных о

популяционной гетерогенности природных штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы эльтор биовара. В популяции ряда штаммов впервые обнаружено два типа клонов, различающихся по уровню продукции экзополисахарида, СТ, Нар, гемолизина, а также подвижности. Экспрессия генов, связанных с указанными фенотипическими свойствами, имеет координированный характер. Одним из внешних сигналов, вызывающих переключение активности генов, кодирующих холерный токсин, растворимую гемагглютинин/протеазу, экзополисахарид, подвижность, а также гемолизин в штаммах холерного вибриона является щелочная (pH 9,0) реакция среды. Возможно, переключение «прозрачные-мутные» варианты является одной из форм фазовых вариаций и необходимо *V. cholerae* для выживания в изменяющихся условиях внешней среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамов А.К., Наумишина М.С. Холерные вибрионы. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та; 1984. 328 с.
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. Милютин В.Н., Дрозжевкина М.С., Ломов Ю.М., Уралева В.С., Либинзон А. Е., Подосинникова Л.С. Механизмы и диапазон изменчивости холерных вибрионов. Ростов н/Д: Ростовское книжное изд-во; 1981. 176 с.
4. De S.N., Chatterje D.N. An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. J. Path. Bacteriol. 1953; 66(2):559–62.
5. DiRita V.J., Neely M., Taylor R.K., Bruss P.M. Differential expression of the ToxR regulon in classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae* is due to biotype-specific control over *toxT* expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996; 93(15):7991–95.
6. Faruque S.M., Nair G.B. *Vibrio cholerae* Genomics and Molecular Biology. Caister Academic Press, Norfolk, UK; 2008. 218 p.
7. Finkelstein R.A., Boesman-Finkelstein M., Chang Y., Häse C.C. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease, colonial variation, virulence and detachment. Infect. Immun. 1992; 60:472–8.
8. Guvener Z.T., McCarter L.L. Multiple regulators control capsular polysaccharide production in *Vibrio parahaemolyticus*. J. Bacteriol. 2003; 185(18):5431–41.
9. Hammer B.K., Bassler B.L. Distinct sensory pathways in *Vibrio cholerae* El Tor and classical biotypes modulate cyclic dimeric GMP levels to control biofilm formation. J. Bacteriol. 2009; 191(1):169–77.
10. Hilton T., Rosche T., Froelich B., Smith B., Oliver J. Capsular polysaccharide phase variation in *Vibrio vulnificus*. Appl. Environ. Microbiol. 2006; 72(11):6986–93.
11. Hitchcock P.J., Brown T.M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. J. Bacteriol. 1983; 154:269–77.
12. 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; 30:1075–83.
13. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. Nature. 1970; 227:680–5.
14. Nesper J., Lauriano C.M., Klose K.E., Kapfhammer D., Kraiß A., Reidl J. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor *galU* and *galE* mutants: influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. Infect. Immun. 2001; 69(1):435–45.
15. Svennerholm A.M., Wiklund G. Rapid GM₁-enzyme-linked immunosorbent assay with visual reading for identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. J. Clin. Microbiol. 1983; 17:596–600.
16. Yildiz F.H., Lie X.S., Heydorn A., Schoolnik G.K. Molecular analysis of rugosity in a *Vibrio cholerae* O1 El Tor phase variant. Mol. Microbiol. 2004; 53(2):497–515.

Об авторах:

Заднова С.П., Ливанова Л.Ф., Лозовский Ю.В., Смирнова Н.И.
Российской научно-исследовательский противочумный институт
«Микроб». 410005, Саратов, Университетская, 46. Тел. (845-2) 26-21-31.
Факс (845-2) 51-52-12. E-mail: microbe@san.ru

S.P.Zadnova, L.F.Livanova, Yu.V.Lofovskiy, N.I.Smirnova

**Detection of Clones with Different Expression of Virulence
and Persistence Factors in Natural Populations
of Cholera *Vibrio* and Their Phenotypic Analysis**

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Analysis of the population structure of 41 *Vibrio cholerae* biovar eltor
natural strains permitted to detect 12 strains forming typical transparent and

atypical opaque colonies. Among the later were identified 3 strains which morphology variability correlated with altered production of exopolysaccharide, cholera toxin, hemolysine, soluble hemagglutinin/protease and altered mobility. One of the external signals causing coordinating switching of production of the indicated pathogenicity and persistence factors is alkaline (pH 9,0) reaction of the medium.

Key words: *Vibrio cholerae*, heterogeneous population, coordinated change of virulence and persistence gene expression.

Authors:

Zadnova S.P., Livanova L.F., Lofovskiy Yu.V., Smirnova N.I. Russian
Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya
St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 25.03.09.

С.Ф.Бикетов, В.В.Фирстова, И.И.Любимов

ОСОБЕННОСТИ ЭТИОЛОГИИ И ИММУНОПАТОГЕНЕЗА
ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕВЫХ БОРРЕЛИОЗОВ

ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск

В статье приводится характеристика возбудителей клещевых боррелиозов, описаны резервуарные хозяева и переносчики боррелий. Рассмотрено участие компонентов слюны клещей и поверхностных антигенов спирохет в механизмах инфицирования млекопитающих боррелиями. Изложен иммунопатогенез клещевого боррелиоза. Дана оценка существующим методам диагностики и вакцинопрофилактики клещевого боррелиоза.

Ключевые слова: боррелиоз, антигены, иммунопатогенез, иксодовые клещи, биоактивные молекулы слюны клещей.

Иксодовые клещевые боррелиозы (болезнь Лайма, клещевой боррелиоз, Лаймборрелиоз) – группа этиологически самостоятельных хронических или рецидивирующих спирохетозных природно-очаговых инфекций, возбудители которых передаются иксодовыми клещами и способны поражать различные системы органов (центральную нервную систему, сердечно-сосудистую, кожу, опорно-двигательный аппарат) [3]. Вследствие запуска мощного комплекса воспалительных иммунологических реакций клещевой боррелиоз имеет склонность к хроническому и рецидивирующему течению.

Возбудитель клещевого боррелиоза (КБ). Для человека доказана патогенность трех генов *Borrelia burgdorferi*, которые распространены в эндемичных регионах мира неравномерно. Среди евроазиатских изолятов боррелий преобладают два геновида: *B. afzelii* и *B. garinii*. Все выделенные в Северной Америке изоляты боррелий относятся к группе *B. burgdorferi sensu stricto* [20].

По форме спирохеты напоминают штопорообразную извитую спираль. По методу Грама спирохета не окрашивается. Имеет жгутики, число которых у некоторых штаммов может варьировать. Боррелии культивируют на жидкой питательной среде, содержащей множество компонентов. Малый диаметр спирохет позволяет им проникать через большинство бактериальных фильтров. Микробная клетка *B. burgdorferi* состоит из плазматического цилиндра, окруженного клеточной мембраной, содержащей термостабильный липополисахарид. Оптимальная температура роста спирохет 33–37 °С. Гетерогенность штаммов по морфологии, плазмидному составу и другим характеристикам, вероятно, обуславливает различия в клинических проявлениях боррелиоза [2].

Резервуарные хозяева клещевого боррелиоза. Основные резервуарные хозяева возбудителя – мышевидные грызуны, а также дикие и домашние животные – прокормители клещей (кошки, собаки, овцы, крупный рогатый скот). Определенное значение имеют птицы, распространяющие клещей при

перелетах. Клещи инфицируются спирохетами на стадии личинки (лавры) во время питания кровью резервуарных хозяев.

Переносчики клещевого боррелиоза. Основные переносчики боррелий – иксодовые клещи: *Ixodes ricinus*, *I. persulcatus*, *I. damini*. Возбудители инфекций способны пожизненно персистировать в организме клещей и могут передаваться потомству транс-овариально. Естественная зараженность клещей боррелиями в эндемичных очагах достигает 60 %, а в высоко эндемичных Северо-Западных районах России – до 100 % [1]. Нередко в одном клеще содержится одновременно два и более геновида боррелий [3]. Наибольшая опасность заразиться болезнью Лайма существует в весенне-летний период – сезон наибольшей активности клещей.

На каждой стадии развития (личинка, нимфа и имаго) клещи должны хотя бы раз напитаться кровью хозяина-позвоночного животного, прежде чем они смогут перейти в следующую стадию. В напитавшейся на инфицированных резервуарных хозяевах личинке (ларве) в начале спирохеты быстро размножаются, однако к концу линьки и выходу нимфы их количество резко падает. Следовательно, к моменту контакта с потенциальной жертвой количество спирохет в нимфе минимально. Такой результат частично объясняет низкий процент заражаемости (1–2 %) новых хозяев при укусах [40]. Для человека наиболее значимой в эпидемиологическом плане фазой развития клещей является нимфа – переходная стадия развития от ларвы к взрослому клещу.

Заражение млекопитающих. В месте присасывания клеща к коже млекопитающего формируется полость, которая в процессе питания постоянно пополняется новыми порциями слюны. В слюне кровососущих клещей содержатся многочисленные биоактивные компоненты с широким набором фармакологических свойств, в число которых входят антикоагулянты, ферменты и ингибиторы, местные анестетики, противовоспалительные соединения, токсины и другие секреты [4, 15, 25, 30, 35]. Слюна клещей *Ixodes*

spp. оказывает ингибирующее действие на комплементзависимый и комплементнезависимый пути элиминирующей активности чужеродных агентов/инфекций и продукцию супероксида полиморфно-ядерными нейтрофилами [38, 39, 42]. Компоненты слюны иксодовых клещей ингибируют пролиферацию Т-клеток [21, 27, 43], что, вероятно, может быть обусловлено наличием в слюне белка, связывающего интерлейкин-2 [18]; ингибируют комплементзависимый лизис эритроцитов [44], снижают продукцию провоспалительных цитокинов, оксида азота, ингибируют хемотаксис и адгезию полиморфно-ядерных нейтрофилов к *Borrelia burgdorferi* [32], а также киллинг спирохет макрофагами [28]. Боррелии, попадая в организм млекопитающего вместе со слюной клеща, оказывающей иммуномодулирующее действие, некоторое время остаются недоступными для распознавания их иммунной системой млекопитающего. В результате спирохеты получают достаточное время на адаптацию *in situ* с целью последующей диссеминации боррелий в организме хозяина.

Таким образом, слюна клещей необходима для эффективного инфицирования организма человека и животных возбудителями боррелиоза. Экспериментальное подтверждение этому было получено при заражении животных *B. burgdorferi* с помощью инфицированных клещей и путем подкожной инъекции [45]. При «шприцевом» заражении мышей боррелиями признаки инфекции появлялись в течение 3–4 недель. Если же боррелии передавались через укус клеща, то развитие КБ протекало медленнее (6–12 недель), течение болезни по клинике и гистологии в большей степени напоминало данное заболевание у людей [50].

По экспериментальным данным, для заражения млекопитающего *B. burgdorferi* клещ должен питаться не менее 48 ч [41]. Во время питания кровью начинается активное размножение спирохет в кишечнике клеща – количество боррелий увеличивается до нескольких сотен и даже нескольких сотен тысяч [26]. Наряду с быстрым увеличением численности в популяции спирохет происходят качественные изменения антигенного состава. Геном *B. burgdorferi* кодирует большое количество липопротеинов, многие из которых экспрессируются только на определенной стадии развития спирохет. Так, у некормленного клеща в кишечнике фактически все спирохеты экспрессируют преимущественно один главный поверхностный протеин – Osp A. За счет OspA спирохеты избирательно прикрепляются к клеткам эпителия кишечника клеща [34]. Он же доминирует при экспериментальном размножении боррелий *in vitro*. Однако, начиная с первого дня питания кровью, резко увеличивается экспрессия другого липопротеина – OspC, которая достигает максимума через 48 ч. Следовательно, процессы репрессии OspA и стимуляции синтеза OspC коррелируют с выходом спирохет из кишечника, диссеминацией в гемолимфе и проникновением в слюнные железы клеща.

Накопление боррелий в слюнных железах подтверждено с помощью микроскопии. После двухдневного кормления в слюнных железах и прилежащем участке кожи хозяина выявляются боррелии только двух фенотипов: экспрессирующие OspC и не экспрессирующие ни OspC, ни OspA. OspC, вероятно, играет важную роль на ранней стадии инфицирования млекопитающих о чем свидетельствует положительная сероконверсия к OspC у зараженных боррелиозом животных [5].

Переключение экспрессии генов поверхностных протеинов с OspA на OspC происходит под влиянием множества факторов, например: температуры – в процессе кормления клещ из окружающей среды, с температурой 20–25 °C, попадает в температурный режим хозяина 37–39 °C [36]; плотности клеток: снижение объема популяции боррелий в клеще при действии OspA-вакцины или сыворотки приводит к снижению суммарного количества OspC вследствие снижения общего количества боррелий в слюнных железах [6]; фазы роста боррелий [5]; pH окружающей среды – в процессе питания кровью в кишечнике клеща наблюдается снижение pH с 7,4 до 6,8, при этом значительно изменяется уровень экспрессии OspA, OspC, VlsE и других поверхностных антигенов [36]; молекулярных факторов взаимодействия патогена и организма хозяина [7].

Иммунопатогенез клещевого боррелиоза.

Согласно общепринятому взгляду на течение боррелиозной инфекции выделяют три стадии развития болезни: стадия локальной инфекции с развитием патологического процесса в месте внедрения возбудителей; стадия диссеминации боррелий по организму от места его первичного внедрения; стадия органных поражений, как результат длительного патогенного воздействия возбудителей на органы и системы.

Разделение на стадии довольно условно и, во многом, основывается на клинических проявлениях, а также временных характеристиках от момента инфицирования. Заболевание может переходить последовательно из одной стадии в другую, или миновать какую-либо из них, а также впервые проявляться в любой стадии без наличия предшествующей.

Первая стадия – стадия локальной инфекции с развитием патологического процесса в месте внедрения возбудителей. Локальная инфекция развивается обычно на участке кожи в месте присасывания иксодового клеща. В этой стадии клинические симптомы часто касаются только кожных реакций и могут исчезать самостоятельно, даже без специфического антимикробного лечения.

Благодаря иммуносупрессивным свойствам слюны клеща боррелии преодолевают без больших потерь первую атаку врожденного иммунитета, представленного клетками Лангерганса и макрофагами кожи, фагоцитарная и киллерная активность которых значительно снижается. В слюне *I. scapularis* обнаружен белок Salp15, способный модулировать иммунный ответ. Salp15 влияет на адаптивный им-

мунитет благодаря способности взаимодействовать с С-лектиновым рецептором DC-SIGN дендритных клеток, что приводит к ингибированию продукции воспалительных цитокинов дендритными клетками [25]. Кроме того, Salp15 специфически связывается с CD4-рецептором на поверхности Т-хелперов, исключая рецептор-опосредованные клеточные взаимодействия и снижая синтез ИЛ-2, ослабляя тем самым пролиферацию Т-лимфоцитов [16].

Первые несколько дней в образованной в месте укуса полости боррелии активно размножаются. Первые проявления болезни неспецифичны: озноб, повышение температуры тела, головная боль, ломота в мышцах, выраженная слабость и утомляемость. По мере размножения боррелий в месте укуса клеща часто образуется эритема. Благодаря способности спирохет к самостоятельным поступательным движениям в тканях эритема начинает распространяться кольцеобразно (в среднем через 7 дней после возникновения), значительно увеличиваясь в диаметре. В отличие от многих других патогенных бактерий боррелии не синтезируют коллагеназу, эластазу, гиалуронидазу или какие-либо другие ферменты, способствующие распространению в тканях. Для этих целей боррелии связываются с плазмином, плазминогеном и активируют металлопротеазы хозяина [17]. Благодаря этим связям формируются биоактивные протеазы, растворяющие экстрацеллюлярный матрикс. В результате появляется мощный фактор воспаления – С5а с хемотаксическим действием. Под воздействием факторов воспаления спирохеты теряют свою подвижность, активно фагоцитируются по комплемент-зависимому пути за счет активации каскада компонентов комплемента. Активированные макрофаги резко повышают фагоцитирующую способность и синтез протеаз, разрушающих поглощенные частицы. Одновременно макрофаги начинают синтезировать новые медиаторы и активные формы кислорода (кислородный взрыв), включающие синглетный кислород, ион гидроксила, перекись водорода и окись азота [2, 25]. Количество боррелий уменьшается, местные воспалительные реакции затухают. В результате в центре эритемы формируется зона просветления.

В случае завершеного фагоцитоза антигены боррелий процессируются на поверхность фагоцитов и в ассоциации с антигенами второго комплекса гистосовместимости презентуются лимфоцитам. Запускается специфическая активация иммунной системы. Формирование протективного иммунного ответа напрямую зависит от способности лимфоцитов к пролиферации и дифференцировке В-клеток в антителообразующие клетки. В слюне клещей *I. ricinus* содержится белок, ингибирующий клеточную пролиферацию. Супрессия пролиферации В-лимфоцитов на первых стадиях инфекционного процесса при боррелиозе приводит к ингибированию продукции специфических антител к *B. burgdorferi* [21, 49]. Таким образом, синтез специфических антител при

боррелиозе начинается в более отдаленные сроки, когда количество и распространенность по организму спирохет значительно возрастает.

Синтезированные антитела и их F(ab)₂-фрагменты способны генерировать активные формы кислорода и запускать кислородзависимый путь фагоцитоза. Включению этого механизма способствуют супероксид анионы, образующиеся при кислородном взрыве в процессе фагоцитоза [11].

Иногда видимые проявления локальной стадии инфекции отсутствуют, т.е. нет характерной мигрирующей эритемы. Одной из самых вероятных причин этого является то, что боррелии относительно быстро покидают место своего первичного внедрения, в связи с чем в коже не возникает местное воспаление. Клиническое проявление КБ начинается сразу со 2-й или 3-й стадии заболевания.

При своевременно начатом лечении и достаточном иммунном ответе организма боррелии полностью элиминируются. В отсутствии антибиотикотерапии, клеточные и гуморальные факторы защиты чаще не способны полностью справиться с возбудителем. Заболевание переходит во *вторую стадию – стадию диссеминации боррелий по организму от места его первичного внедрения*; а иногда сразу в *третью – стадию органических поражений*. Сроки их развития варьируют.

В ответ на появление специфических антител боррелии активно модулируют экспрессию своих поверхностных антигенов, что позволяет им временно скрыться от защитных сил организма [29]. Кроме того, на поверхности боррелий имеются белки, которые оказывают активное блокирующее действие на систему комплемента, инактивируя C3b компонент. Уровень экспрессии белков варьирует у разных видов спирохет. Наличие этих белков позволяет спирохетам противостоять комплементзависимому лизису [10]. Таким образом, часть спирохет выживает и с током крови и лимфы мигрирует в другие участки организма. Клинически это может проявляться возникновением новых эритем на различных участках тела инфицированного организма.

Результаты исследований и клинических наблюдений последних лет позволяют предполагать, что от вида боррелий может зависеть характер органических поражений у пациента. Обнаружены ассоциации между *B. garinii* и неврологическими проявлениями, *B. burgdorferi sensu stricto* и Лайм-артритом, *B. afzelii* и хроническим атрофическим дерматитом [18]. Следовательно, наблюдаемые различия в клинической картине течения КБ у больных в различных точках нозоареала этой инфекции могут иметь в своей основе генетическую гетерогенность возбудителей боррелиоза.

Попадая в различные органы и ткани спирохеты повторно активизируют иммунную систему, что приводит к генерализованному и местному гуморальному и клеточному гипериммунному ответу. Происходит выработка специфических антител IgM

(с максимумом на 3–6-й неделе болезни) и затем IgG (с пиком на 1,5–3-м месяце болезни) в ответ на появление флагеллярного жгутикового антигена боррелий массой 41 кДа [22]. Концентрация IgG в сыворотке крови повышается постепенно в течение месяцев, с увеличением числа боррелий. Все больные во вторичный или третичный периоды болезни имеют повышенный титр иммуноглобулинов класса G.

В результате обследования группы больных с манифестными формами иксодового клещевого боррелиоза было выявлено, что специфические антитела у них преимущественно принадлежат к подклассам Ig G1 и в меньшей степени Ig G3 [22]. Антитела к *B. burgdorferi* подкласса Ig G2 обнаруживаются в низкой концентрации только на поздних стадиях заболевания, а специфические антитела подкласса Ig G4, как правило, отсутствуют. По всей видимости, иммунный ответ у человека на боррелиозную инфекцию идет по Т-хелперному типу. Изучение изменения уровней антител при проведении антибиотикотерапии больным с поздними стадиями боррелиоза показало, что эффективность применяемого лечебного курса коррелирует со снижением в крови пациентов концентрации антител подкласса IgG1 к флагеллину *B. burgdorferi* [22].

Важным иммуногеном в патогенезе КБ являются липопroteины. Это мощные индукторы воспалительных реакций, которые, находясь длительное время на поверхности боррелий, могут активировать факторы неспецифической резистентности [29]. Испытывая прессинг со стороны различных факторов резистентности организма, боррелии образуют мембранные выпячивания, формирующие антигенный слой липопroteинов (DbpA, OspB, OspC, OspE и т.д.). Изменение экспрессии поверхностных липопroteинов позволяет боррелиям противостоять гуморальному звену специфического иммунитета. Одновременно появление спирохет с новым поверхностным антигенным составом индуцирует синтез новых специфических IgM и IgG. Развивается поликлональная активация В-лимфоцитов [14]. Образовавшиеся в большом количестве иммунные комплексы (антиген-антитело) не успевают полностью элиминироваться из организма. Часть иммунных комплексов, скапливаясь в пораженных тканях, активирует основные факторы воспаления – генерацию лейкоцитарных стимулов и фагоцитоз. Характерной особенностью боррелиоза является наличие лимфоплазматических инфильтратов, обнаруживаемых в коже, подкожной клетчатке, лимфатических узлах, селезенке, мозге, периферических ганглиях.

Клеточный иммунный ответ формируется по мере прогрессирования заболевания, при этом наибольшая реактивность мононуклеарных клеток проявляется в тканях-«мишенях». На поздних стадиях заболевания, наряду с пролиферацией лимфоцитов, повышается функциональная активность Т-хелперов и Т-супрессоров, индекс стимуляции лимфоцитов

крови. Преобладание Th-1 иммунного ответа обуславливает постоянную активацию макрофагов [47] и как результат хронизацию воспалительного процесса. Продуцируемые в широком спектре антитела обладают перекрестной иммунологической активностью как в отношении антигенов боррелий, так и тканевых белков (аксональные белки нервной ткани, белки синовиальной оболочки и др.). По мере прогрессирования заболевания аутоиммунные механизмы приобретают значимость в патогенезе.

Кроме опосредованного повреждающего действия, существуют веские основания предполагать наличие у боррелий своеобразных токсинов, причем как с эндо- так и экзопродукцией. У *B. burgdorferi* идентифицирован ген, ответственный за синтез белка экзотоксина, который получил название *Bbtox1*. Его действие аналогично ботулотоксину C2, и именно с его продукцией связываются некоторые патологические изменения со стороны нервной системы [9].

Таким образом, замедленный иммунный ответ, связанный с относительно поздней и слабовыраженной боррелиемией, развитием аутоиммунных реакций и возможностью внутриклеточной персистенции возбудителя являются одними из основных причин хронизации инфекции.

Диагностика клещевого боррелиоза.

Обнаружить спирохету в тканях млекопитающих очень сложно. Наиболее надежный метод выявления боррелий – обработка образца специфическими антителами к боррелиям, меченными флюоресцеином.

Вакцинопрофилактика клещевого боррелиоза. После инфекции обычно развивается непродолжительный иммунитет. Как и при других спирохетозах, иммунитет при клещевом боррелиозе носит нестерильный характер. У переболевших могут быть повторные случаи заражения.

Специфическая профилактика КБ в России до настоящего времени не разработана. В Америке была разработана вакцина против Лайм боррелиоза на основе рекомбинантного OspA (rOspA), однако в 2002 г. данный препарат снят с производства в связи с высокой вероятностью развития аутоиммунных процессов после вакцинации у отдельных индивидуумов. rOspA способен перекрестно реагировать с белком hLFA-1 [19], который присутствует у позитивных по HLA-DR4 гену людей.

Другое направление по разработке вакцины направлено на создание антиклещевого иммунитета на основе иммунодоминантных протеинов слюны [49]. В естественных условиях антиклещевой иммунитет способны формировать многие млекопитающие (морские свинки, кролики, собаки, рогатый скот). В эндемичных по боррелиозу регионах случаи заболевания боррелиозом у местных жителей отмечаются крайне редко в связи с наличием у людей естественного антиклещевого иммунитета [8]. Приведенный факт свидетельствует о перспективности работы в данном направлении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арумова Е.А., Воронцова Т.В. Клешевой боррелиоз (болезнь Лайма) в России. Дезинфекционное дело. 2000; 2:45–7.
2. Манзенюк И.Н., Манзенюк О.Ю. Клешевые боррелиозы (болезнь Лайма). Кольцово, 2005. 85с.
3. Покровский В.И., Онищенко Г.Г., Черкасский Б.Л. Эволюция инфекционных болезней России в XX веке. М.: Медицина; 2003. 664 с.
4. Alekseev A.N., Arumova E.A., Vasilieva I.S. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in female cement plug of *Ixodes persulcatus* ticks (Acari, Ixodidae). Exp. Appl. Acarol. 1995; 19:519–22.
5. Anguita J.A., Hedrick M.N., Fikrig E. Adaptation of *Borrelia burgdorferi* in the tick and the mammalian host. FEMS Microbiology Reviews. 2003; 27:493–504.
6. Babb K., El-Hage N., Miller J. C., Carroll J. A., Stevenson B. Distinct regulatory pathways control expression of *Borrelia burgdorferi* infection-associated OspC and Erp surface proteins. Infect. Immun. 2001; 69:4146–53.
7. Brooks C.S., Hefty P.S., Jolliffe S.E., Akins D.R. Global analysis of *Borrelia burgdorferi* genes regulated by mammalian host-specific signals. Infect. Immun. 2003; 71:3371–83.
8. Burke G., Wikel S.K., Spielman A., Telford S.R., McKay K., Krause P.J. Hypersensitivity to Ticks and Lyme Disease. Risk. Emerg. Infect. Dis. 2005; 11(1):36–41.
9. Cartwright M.J., Martin S.E., Donta S.T. A Novel Toxin (Bb Tox 1) of *Borrelia burgdorferi*. 12th Annual International Conference on Lyme Borreliosis and Other Tick-borne Disorders. Chronic Lyme Disease: Basic Science and Clinical Approaches. 1999 LDF Conference Abstract, New York City, NY.
10. Connolly S.E., Benach J.L. The versatile roles of antibodies in borrelia infections. Nat. Rev. Microbiol. 2005; 3:411–20.
11. Connolly S.E., Thanassi D.G., Benach J.L. Generation of a Complement-Independent Bactericidal IgM against a Relapsing Fever *Borrelia*. J. Immunol. 2004; 172:1191–1197.
12. de la Fuente J., Kocan K.M. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. Parasite Immunol. 2006; 28:275–83.
13. Fang Ting Liang, Jun Yan, Mbow L.M., Sviat S.L., Gilmore R.D., Mamula M., Fikrig E. *Borrelia burgdorferi* Changes Its Surface Antigenic Expression in Response to Host Immune Responses. Infect. Immun. 2004; 72(10):5759–67.
14. Franz J.K., Krause A. Lyme disease (Lyme borreliosis). Best Pract. Res. Clin. Rheumatol. 2003; 17(2):241–64.
15. Fukumoto S., Sakaguchi T., You M., Xuan X., Fujisaki K. Tick troponin I-like molecule is a potent inhibitor for angiogenesis. Microvasc. Res. 2006; 71:218–21.
16. Garg R., Juncadella I.J., Ramamoorthi N., Ashish, Ananthanarayanan S.K., et al. Cutting edge: CD4 is the receptor for the tick saliva immunosuppressor, Salp15. J. Immunol. 2006; 177:6579–83.
17. Gebbia J.A., Coleman J.L., Benach J.L. *Borrelia* Spirochetes Upregulate Release and Activation of Matrix Metalloproteinase Gelatinase B (MMP-9) and Collagenase 1 (MMP-1) in Human Cells. Infect Immun. 2001; 69(1):456–62.
18. Gillespie R.D., Dolan M.C., Piesman J., Titus R.G. Identification of an IL-2 binding protein in the saliva of the Lyme disease vector tick *Ixodes scapularis*. J. Immunol. 2001; 166:4319–26.
19. Gross D.M., Forsthuber T., Tary-Lehmann M., Etling C., Ito K., Nagy Z.A., Field J.A., Steere A.C., Huber B.T. Identification of LFA-1 as a candidate autoantigen in treatment-resistant Lyme arthritis. Science. 1998; 281:703–6.
20. Grubhoffer L., Golovchenko M., Vancová M., Zacharovová-Slavičková K., Rudenko N., Oliver J.H. Lyme borreliosis: insights into tick-host-borrelia relations. Folia parasitologica. 2005; 52:279–94.
21. Hannier S., Liversidge J., Sternberg J.M., Bowman A.S. Characterization of the B-cell inhibitory protein factor in *Ixodes ricinus* tick saliva: a potential role in enhanced *Borrelia burgdorferi* transmission. Immunology. 2004; 113:40–8.
22. Hengge U.R., Tannapfel A., Tying S.K., Erbel R., Arendt G., Ruzicka T. Lyme borreliosis. Lancet Infect. Dis. 2003; 3:489–500.
23. Hepburn N.J., Williams A.S., Nunn M.A., Chamberlain-Banoub J.C., Hamer J., et al. In vivo characterization and therapeutic efficacy of a C5-specific inhibitor from the soft tick *Ornithodoros moubata*. J. Biol. Chem. 2007; 282:8292–99.
24. Hovius J.W.R., de Jong M.A.W.P., den Dunnen J., Litjens M., Fikrig E., et al. Salp15 binding to DC-SIGN inhibits dendritic cell function by impairing nucleosome remodeling and decreasing mRNA stability of pro-inflammatory cytokines. PLoS Pathog. 2008; 4:e31.
25. Hovius J.W.R., Levi M., Fikrig E. Salivating for Knowledge: Potential Pharmacological Agents in Tick Saliva. PLoS Med. 2008; 5(2):e43.
26. Keane-Myers A., Nickell S.P. Role of IL-4 and IFN γ in modulation of immunity to *Borrelia burgdorferi* in mice. J. Immunol. 1995; 155:2020–8.
27. Kotsyfakis M., Sa-Nunes A., Francischetti I.M., Mather T.N., Andersen J.F., et al. Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. J. Biol. Chem. 2006; 281:26298–307.
28. Kuthejlova M., Kopecky J., Stepanova G., Macela A. Tick salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelii* spirochetes by mouse macrophages. Infect. Immun. 2001; 69:575–8.
29. Liang F.T., Yan J., Mbow M.L., Sviat S.L., Gilmore R.D., Mamula M., Fikrig E. *Borrelia burgdorferi* changes its surface antigenic expression in response to host human immune responses. Infect. Immun. 2004; 72(10):5759–67.
30. Maritz-Olivier C., Stutzer C., Jongejan F., Neitz A.W., Gaspar A.R. Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. Trends Parasitol. 2007; 23:397–407.
31. Matyniak J. E., Reiner S.L. T helper phenotype and genetic susceptibility in experimental Lyme disease. J. Exp. Med. 1995; 181:1251–4.
32. Montgomery R.R., Lusitani D., de Boisfleury Chevance A., Malawista S.E. Tick Saliva Reduces Adherence and Area of Human Neutrophils. Infect. Immun. 2004; 72(5):2989–94.
33. Pal U., de Silva A.M., Montgomery R.R., Fish D., Anguita J., Anderson J.F., Lobet Y., Fikrig E. Attachment of *Borrelia burgdorferi* within *Ixodes scapularis* mediated by outer surface protein A. J. Clin. Invest. 2000; 106:561–9.
34. Piesman J., Schneider B.C., Zeidner N.S. Use of quantitative PCR to measure density of *Borrelia burgdorferi* in the midgut and salivary glands of feeding tick vectors. J. Clin. Microbiol. 2001; 39:4145–48.
35. Ramamoorthi N., Narasimhan S., Pal U., Bao F., Yang X.F., et al. The Lyme disease agent exploits a tick protein to infect the mammalian host. Nature. 2005; 436:573–7.
36. Ramamoorthy R., Scholl-Meeker D. *Borrelia burgdorferi* proteins whose expression is similarly affected by culture temperature and pH. Infect. Immun. 2001; 69:2739–42.
37. Rathinavelu S., Broadwater A., de Silva A.M. Does Host Complement Kill *Borrelia burgdorferi* within Ticks? Infect. Immun. 2003; 71(2):822–9.
38. Ribeiro J.M.C., Weis J.J., Telford III S.R. Saliva of the tick *Ixodes dammini* inhibits neutrophil function. Exp. Parasitol. 1990; 70:382–8.
39. Schroeder H., Daix V., Gillet L., Renaud J.C., Vanderplasschen A. The paralogous salivary anti-complement proteins IRAC I and IRAC II encoded by *Ixodes ricinus* ticks have broad and complementary inhibitory activities against the complement of different host species. Microbes Infect. 2007; 9:247–50.
40. Schwan T.G., Piesman J. Vector interaction and molecular adaptation of Lyme disease and relapsing fever spirochetes associated with transmission by ticks. Emerg. Infect. Dis. 2002; 2:15–21.
41. Shih C.M., Pollack R.J., Telford III S.R., Spielman A. Delayed dissemination of Lyme disease spirochetes from the site of deposition in the skin of mice. J. Infect. Dis. 1992; 166:827–31.
42. Tyson K., Elkins C., Patterson H., Fikrig E., de Silva A. Biochemical and functional characterization of Salp20, an *Ixodes scapularis* salivary protein that inhibits the complement pathway. Insect. Mol. Biol. 2007; 16:469–79.
43. Urioste S., Hall L.R., Telford III S.R., Titus R.G. Saliva of the Lyme disease vector, *Ixodes dammini*, blocks cell activation by a nonprostaglandin E₂-dependent mechanism. J. Exp. Med. 1994; 180:1077–85.
44. Valenzuela J.G., Charlab R., Mather T.N., Ribeiro J.M. Purification, cloning, and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. J. Biol. Chem. 2000; 275:18717–23.
45. Wang G. Direct detection methods for Lyme *Borrelia*, including the use of quantitative assay. Vector born zoonotic dis. 2002; 2(4):223–31.
46. Wikel S.K. Host immunity to ticks. Annu. Rev. Entomol. 1996; 41:1–22.
47. Yssel H., Shanafelt M. D., Sodenberg C., Schneider R., Peltz G. *Borrelia burgdorferi* activates a T helper type 1-like T cell subset in Lyme arthritis. J. Exp. Med. 1991; 174:593–601.
48. Yu D., Liang J., Yu H., Wu H., Xu C., et al. A tick B-cell inhibitory protein from salivary glands of the hard tick, *Hyalomma asiaticum asiaticum*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006; 343:585–90.
49. Yun Xu, Bruno J.F., Luft B.J. Identification of novel tick salivary gland proteins for vaccine development. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005; 326:901–4.
50. Zeidner N.S., Nuncio M.S., Schneider B.S., Gern L., Piesman J., Brandao O., Filipe A.R. A Portuguese isolate of *Borrelia lusitaniae* induces disease in C3H/HeN mice. J. Med. Microbiol. 2001; 50:1055–60.

Об авторах:

Бикетов С.Ф., Фирстова В.В., Любимов И.И. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Московская обл., Серпуховский р-он, п. Оболенск. E-mail: biketov@obolensk.org

S.F.Bicketov, V.V.Firstova, I.I.Lyubimov

**Ethiology and Immunopathogenesis Peculiarities
of Ixodic Tick-Borne Borreliosis**

*State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology,
Obolensk*

The characteristics of tick-borne borreliosis agents and borrelia reservoir hosts and vectors are presented in the article. Considered is participation of ticks' saliva components and superficial spirochete antigens in the mechanisms of mammals infectioning with borrelia. Immunopathogenesis of tick-borne borreliosis is described. The available methods of diagnostics and

vaccine prophylaxis of tick-borne borreliosis are evaluated.

Key words: borreliosis, antigens, immunopathogenesis, ixodic ticks, bioactive molecules of ticks' saliva.

Authors:

Bicketov S.F., Firstova V.V., Lyubimov I.I. State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk. E-mail: bicketov@obolensk.org

Поступила 09.06.09.

С.А.Бугоркова¹, И.С.Барулина², Т.Н.Щуковская¹, Л.В.Саяпина²**НЕЙРОЭНДОКРИННЫЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ РЕАКЦИИ ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНОВ БИОМОДЕЛИ НА ВВЕДЕНИЕ ЖИВОЙ ПРОТИВОТУЛЯРЕМИЙНОЙ ВАКЦИНЫ**¹ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов;²ФГУН «Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича», Москва

Проведена оценка изменений в тимусе, регионарных и отдаленных лимфатических узлах, селезенке биомоделей и реакции нейроэндокринных клеток в этих органах при моделировании противотуляремийного вакцинального процесса. Получены количественные характеристики состояния нейроэндокринного окружения лимфоидных органов биомоделей на 5-е сутки после введения противотуляремийной вакцины в различных дозах. Выявлены определенные закономерности в реакции клеток APUD-системы лимфоидных органов и легких биомоделей, тесно связанные с характером изменений в них. Определены перспективы применения количественной характеристики клеток APUD-системы в целях совершенствования и оптимизации методов оценки безопасности и эффективности живых вакцин.

Ключевые слова: туляремийная вакцина, нейроэндокринные клетки.

В Российской Федерации природные очаги туляремии обнаружены на территории практически всех краев, областей и автономных республик [8]. Массовая иммунизация населения живой туляремийной вакциной (ЖТВ) из штамма *Francisella tularensis* 15 линии НИИЭГ обеспечила снижение заболеваемости туляремией и способствовала успеху борьбы с этой инфекцией [4, 7]. ЖТВ является эффективным профилактическим препаратом, создающим стойкий специфический иммунитет в течение пяти лет, но может вызывать ряд нежелательных последствий – аллергизацию и интоксикацию организма вакцинированного [5]. Этим обусловлен интерес исследователей к поиску новых объективных критериев, характеризующих эффективность и максимальную безопасность живых вакцин.

Верификация клеток нейроэндокринной (APUD) системы в составе иммунокомпетентных органов (тимус, селезенка, лимфатические узлы, костный мозг) позволяет по-новому оценить механизмы развития иммунологических реакций. Несмотря на данные, свидетельствующие об участии биогенных аминов и пептидных гормонов, продуцируемых апудоцитами, в регуляции иммунных реакций, протекающих в эффекторном звене иммунной системы [11], многие стороны структурно-функциональных взаимосвязей APUD-системы и иммунокомпетентных органов, в том числе и при противотуляремийной вакцинации, остаются невыясненными.

Целью исследования было выявление закономерностей в характере изменений лимфоидных органов биомоделей и реакции апудоцитов в них при моделировании противотуляремийного вакцинального процесса.

Материалы и методы

Морских свинок подкожно в область правого бедра иммунизировали культурой вакцинного штамма

F. tularensis 15 НИИЭГ в дозах $5 \cdot 10^7$ м.к. (1-я группа) и $5 \cdot 10^9$ м.к. (2-я группа). Животных умерщвляли хлороформом на 5-е сутки после иммунизации. Контролем служили интактные морские свинки (интактный контроль), для сравнения брали животных, зараженных вирулентной культурой штамма *F. tularensis* 503/840 в дозе 5 м.к. (контроль заражения).

Кусочки внутренних органов – легкие, печень, почки, надпочечники, селезенка, лимфатические узлы (регионарные и отдаленные) – фиксировали в 10 % нейтральном водном растворе формалина с последующим использованием стандартной схемы обработки материала для гистологического исследования [6]. Полутонкие парафиновые срезы для характеристики состояния органов и тканей биомоделей окрашивали гематоксилином и эозином, часть материала, применяемого для оценки реакции клеток APUD-системы, импрегнировали серебром по Массону в модификации Гамперля [9] и по Гримелиусу [12]. Подсчет апудоцитов проводили в 10 полях зрения 10 правильно ориентированных срезов лимфоидных органов и легких при $\times 400$. Морфометрическую характеристику состояния лимфоидных органов осуществляли с помощью денситоморфометрической программы МЕКОС-Ц – ДММ-2.1.0.0 при $\times 40$ и $\times 100$. Проводили статистическую обработку полученных данных [2].

Результаты и обсуждение

Моделирование ранней фазы процесса иммуногенеза в организме морских свинок с использованием различных иммунизирующих доз ЖТВ позволило выявить в реакции клеток APUD-системы лимфоидных органов и легких биомоделей определенные закономерности, тесно связанные с характером изменений в них.

В месте введения культур вакцинного штамма на 5-е сутки отмечали умеренное полнокровие сосудов, наличие участков уплотнения, небольшой отек

области правого паха. При гистологическом исследовании этой зоны регистрировали очаговое серозное с примесью полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПМЯЛ) воспаление дермы и подкожной клетчатки.

Регионарные лимфатические узлы (РЛУ) были незначительно увеличены в размере (0,5–0,6 см), полнокровны, окружающая их клетчатка умеренно отека. При микроскопии под капсулой РЛУ встречались единичные микроскопические преимущественно эпителиоидноклеточные гранулемы, чаще при использовании ЖТВ в дозе $5 \cdot 10^9$ м.к. На фоне явлений серозного лимфаденита (рис. 1) отмечали начальные признаки гиперпластических процессов в паракортикальной зоне (ПКЗ) и фолликулах. В подтверждение этого регистрировали умеренное увеличение площади фолликулов в РЛУ биомodelей 1-й ($44426,07 \pm 18350,37$ мкм²) и 2-й ($46247,52 \pm 19942,65$ мкм²) групп по отношению к группе интактных животных ($43217,15 \pm 1224,56$ мкм²). Наблюдали относительную активацию пролиферативных процессов в светлых центрах фолликулов РЛУ биомodelей: до 24 % фолликулов со светлыми центрами у животных в 1-й группе, 22 % – во 2-й, что в 1,5 раза превышало аналогичный показатель у морских свинок из группы интактного контроля (16,5 %). Начальные гиперпластические процессы в РЛУ сопровождалась некоторой активацией аргентаффинных (АТ) клеток, особенно на введение вакцинного штамма в дозе $5 \cdot 10^7$ м.к., в то время как реакция аргирофильных (АГ) элементов практически не отличалась от аналогичных показателей у животных из группы интактного контроля (таблица). Прослеживалась обратная зависимость между выраженностью воспалительного компонента в РЛУ и степенью активности нейроэндокринных элементов в них.

В отдаленных лимфатических узлах (ОЛУ) на фоне явлений незначительного очагового серозного лимфаденита регистрировали умеренную гиперпла-

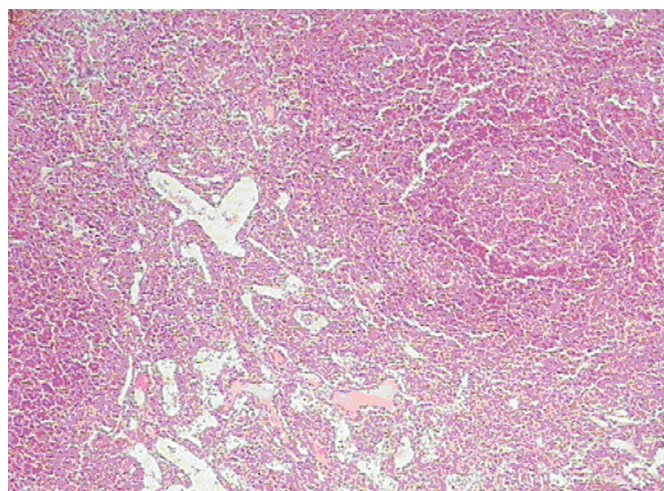


Рис. 1. Морская свинка. Подкожное введение *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе $5 \cdot 10^7$ м.к, 5-е сутки. Серозный лимфаденит. Начальные признаки гиперпластических процессов в ПКЗ и фолликулах. Гематоксилин-эозин. Ув. $\times 40$

зию фолликулов (от $41256,44 \pm 21120,17$ мкм² в 1-й группе и до $42264,13 \pm 11207,24$ мкм² во 2-й группе) по сравнению с животными из группы интактного контроля ($32154,35 \pm 1245,68$ мкм²), но без изменения количества фолликулов с выраженными пролиферативными процессами в их центрах. Нейроэндокринные клетки (НЭК) в ОЛУ биомodelей реагировали резкой активацией как АТ, так и АГ клеток на введение культуры вакцинного штамма в дозе $5 \cdot 10^9$ м.к. и умеренной активацией АГ элементов на иммунизацию $5 \cdot 10^7$ м.к. (таблица).

Селезенка у биомodelей опытных групп была увеличена в размере [$(2,7 \pm 0,96) \times (1,5 \pm 0,64) \times (0,9 \pm 0,17)$ см], умеренно полнокровна, с единичными беловато-серыми узелками (не более 3 на орган). При гистологическом исследовании наблюдали умеренную гиперплазию клеток белой пульпы (фолликулов и периартериальных муфт), незначительную плазмоклеточную реакцию, очаги серозного спленита (рис. 2), мелкие лимфогистиоцитарные инфильтраты в строме органа и единичные без очагов некроза в центре эпителиоидноклеточные гранулемы. По результатам морфометрического исследования площадь фолликулов у животных опытных групп была увеличена ($70659,25 \pm 27669,88$ мкм² и $83878,63 \pm 25443,32$ мкм² соответственно) в 1,6–1,9 раза по отношению к аналогичному показателю у морских свинок из группы интактного контроля ($43121,12 \pm 13564,21$ мкм²). Количество НЭК в органе повышалось на введение культуры вакцинного штамма, но в дозе $5 \cdot 10^7$ м.к. показатели активности как АТ, так и АГ элементов были значительно выше (таблица).

В тимусе животных опытных групп наблюдали

Реакции клеток APUD-системы морских свинок, иммунизированных культурой вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ

Окраска по	1-я группа	2-я группа	Интактный контроль
Легкие			
Массону	2,3 $\pm$ 0,4	4,2 $\pm$ 0,14	3,6 $\pm$ 0,50
Гримелиусу	2,9 $\pm$ 1,17	3,5 $\pm$ 1,06	3,9 $\pm$ 1,52
Регионарные лимфатические узлы (РЛУ)			
Массону	6,7 $\pm$ 1,08*	4,4 $\pm$ 0,28	3,3 $\pm$ 0,68
Гримелиусу	4,1 $\pm$ 0,89	3,6 $\pm$ 0,17	3,7 $\pm$ 0,50
Отдаленные лимфатические узлы (ОЛУ)			
Массону	2,6 $\pm$ 1,06	7,1 $\pm$ 1,48*	3,8 $\pm$ 1,51
Гримелиусу	4,2 $\pm$ 0,72*	7,4 $\pm$ 0,99*	2,8 $\pm$ 0,64
Тимус			
Массону	5,4 $\pm$ 1,22	6,7 $\pm$ 0,92*	2,1 $\pm$ 0,95
Гримелиусу	3,9 $\pm$ 0,64	6,9 $\pm$ 1,34*	2,8 $\pm$ 1,01
Селезенка			
Массону	11,5 $\pm$ 2,14*	5,7 $\pm$ 1,91	5,6 $\pm$ 0,35
Гримелиусу	9,8 $\pm$ 1,45*	5,8 $\pm$ 3,68	3,7 $\pm$ 0,64
Надпочечники			
Массону	6,5 $\pm$ 1,24	3,9 $\pm$ 0,07*	7,1 $\pm$ 1,05
Гримелиусу	4,2 $\pm$ 0,98	5,5 $\pm$ 0,35	3,8 $\pm$ 1,22

* Достоверное различие ($p < 0,05$).

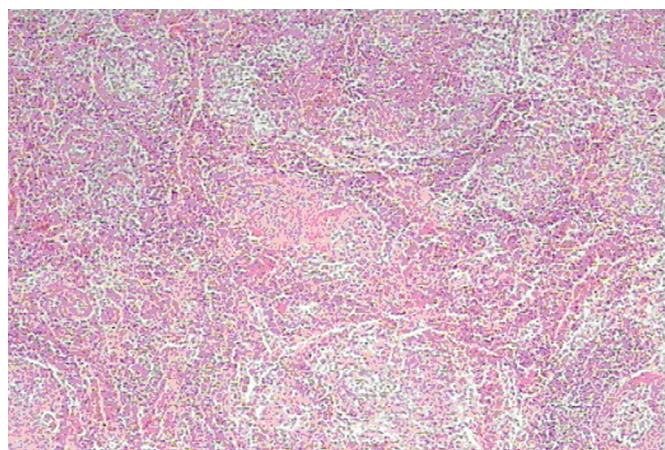


Рис. 2. Морская свинка. Подкожное введение *F. tularensis* 15 НИИЭГ в дозе $5 \cdot 10^9$ м.к. 5-е сутки. Серозный сплениит, умеренная гиперплазия клеток белой пульпы. Гематоксилин-эозин. Ув. $\times 40$

более выраженную активацию НЭК при иммунизации ЖТВ в дозе $5 \cdot 10^9$ м.к.

Подтверждением регуляторной функции апудоцитов, находящим свое отражение в адаптационных реакциях организма, является изменение количества и функционального состояния клеток APUD-системы. Расположенные практически во всех органах и продуцирующие биологически активные вещества клетки APUD-системы играют роль местных регуляторов гомеостаза макроорганизма [13]. Отмеченная реакция апудоцитов в лимфоидных органах явилась косвенным свидетельством тесного молекулярного и клеточного взаимодействия иммунокомпетентных клеток с их нейроэндокринным окружением. Проведенное исследование подтвердило, что, по-видимому, апудоциты в периферических (РЛУ, ОЛУ, селезенка) и центральных (тимус) органах иммунитета активно участвуют в ауторегуляторных процессах при противотуберкулезной вакцинации, влияют на интенсивность иммунологических и ограничивают воспалительных реакций в этих структурах.

В легких наблюдали умеренную очаговую инфильтрацию межальвеолярных перегородок лимфогистиоцитарными элементами, участки дистелектазов. Если у животных из группы контрольного заражения имело место снижение перфузионно-вентиляционного отношения (ПВО) в 13 раз по отношению к аналогичному показателю у морских свинок из группы интактного контроля, то у иммунизированных биомodelей этот показатель отличался лишь в 1,5–1,6 раза. Аргирофильные клетки, встречающиеся среди бронхиального эпителия, по своему строению сходны с ЕС-клетками в кишечнике [3]. Локализация апудоцитов в органах дыхания и известный физиологический эффект продуктов их секреции предполагают региональный контроль за вентиляцией и перфузией в легких [10]. На фоне незначительного изменения ПВО у иммунизированных животных отмечали некоторое снижение как АТ,

так и АГ клеток на введение ЖТВ в дозе $5 \cdot 10^7$ м.к. и умеренное увеличение АТ элементов при иммунизации в дозе $5 \cdot 10^9$ м.к. вакцинного штамма (таблица). Отсутствие достоверного отличия в количестве апудоцитов в легких животных из опытных и контрольной групп свидетельствовало о сохранении адаптационного потенциала у иммунизированных животных. Это подтверждало наличие определенной зависимости между морфофункциональной активностью апудоцитов в легких и показателя перфузии в периферических отделах органа, приспособляемого к иным условиям вентиляции [10].

В надпочечниках на фоне умеренного обеднения липоидами клеток коркового и незначительного снижения феохромии мозгового вещества в ранние сроки иммуногенеза, вследствие введения ЖТВ, реакция НЭК сводилась к дегрануляции клеток и снижению количества АТ элементов, достоверному во 2-й опытной группе. При этом количество АГ клеток в обеих группах несколько увеличивалось (таблица). Реакция энтерохромаффинных клеток мозгового вещества надпочечников была ответом на умеренное стрессорное действие вакцины, отмечаемое исследователями при использовании живых препаратов для специфической профилактики особо опасных инфекций [1].

Со стороны внутренних органов иммунизированных биомodelей отмечали умеренное неравномерное полнокровие сосудов лишь на введение вакцинного штамма в дозе $5 \cdot 10^9$ м.к., а у одного животного в печени наблюдали 3 мелких узелка беловато-серого цвета. При гистологическом исследовании в печени регистрировали на фоне относительного функционального напряжения гепатоцитов очаговые зоны вакуольной и жировой дистрофии клеток, мелкие лимфогистиоцитарные инфильтраты в строме вокруг сосудов. На введение вакцинного штамма в дозе $5 \cdot 10^9$ м.к. дополнительно отмечали появление единичных эпителиоидноклеточных гранул и небольших очагов некроза и некробиоза клеток. В почках грубых дистрофических изменений или признаков воспалительной реакции не регистрировали.

Таким образом, были получены количественные параметры состояния нейроэндокринного окружения лимфоидных органов биомodelей, отражающие характер адаптационно-компенсаторных процессов и иммуногенеза в макроорганизме при моделировании вакцинального процесса, обусловленного введением различных доз культуры штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Анализ реакции клеток APUD-системы ряда функционально значимых органов биомodelей при введении *F. tularensis* вакцинного штамма, расширяя представления о механизмах нейроиммуноэндокринных взаимоотношений в макроорганизме, позволил определить перспективу применения количественного учета апудоцитов в целях совершенствования и оптимизации методов оценки безопасности и эффективности живых вакцин.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимова Т.И., Сергеева Г.М., Саяпина Л.В. Стрессорное действие вакцинного и аттенуированного штаммов чумного микроба в зависимости от степени их остаточной вирулентности. Биопрепараты. 2005; 3:17–20.
2. Бессмертный Б.С. Математическая статистика в клинической, профилактической и экспериментальной медицине. М.: Медицина; 1967. 303 с.
3. Блинова С.А. Возрастные особенности морфологии и распределения эндокринных клеток APUD-системы в легких человека. Мед. журн. Узбекистана. 1986; 9:54–7.
4. Кутырев В.В., Девдариани З.Л., Саяпина Л.В. Современное состояние научных исследований в области вакцинопрофилактики особо опасных бактериальных инфекций. Пробл. особо опасных инф. 2006; 2(92):18–24.
5. Медуницын Н.В. Вакцинология. 2-е изд. М.: «Триада-Х»; 2004. 448 с.
6. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. М.: Медицина; 1969. 423 с.
7. Мещерякова И.С. Туляремия: современное состояние заболеваемости и профилактики туляремии в Российской Федерации. В кн: Актуальные вопросы эпидемиологии инфекционных болезней. Науч. Тр. ВУНМЦ МЗ РФ. 1999. С. 290–312.
8. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2006 году: Государственный доклад. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2007. 360 с.
9. Пирс Э. Гистохимия. Португалова В.В., редактор; пер. с англ. М.: Изд-во Иностранная литература; 1962. 962 с.
10. Райхлин Н.Т., Кветной И.М., Осадчук М.А. APUD-система (общепатологические и онкологические аспекты). Обнинск; 1993. Ч. 1–2. С. 217.
11. Труфакин В.А., Шурлыгина А.В. Проблемы центральной регуляции биоритмов иммунной системы. Роль мелатонина. Вестник Российской АМН. 2006; 9–10:121–7.
12. Grimelius L. A silver nitrate stain for 12 cells in human pancreatic islets. Acta Soc. Med. Upsaliensis. 1968; 73:243–70.
13. Feldman S.A., Eiden L.E. The chromogranins: their roles in secretion from neuroendocrine cells and as markers for neuroendocrine neoplasia. Endocr. Pathol. 2003; 14(1):3–23.

Об авторах:

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

Барулина И.С., Саяпина Л.В. Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А.Тарасевича.

S.A.Bugorkova, I.S.Barulina, T.N.Schukovskaya, L.V.Sayapina

Neuroendocrinal Aspects of Analysis of Biomodel Lymphoid Organs Response to Administration of Live Tularemia Vaccine

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

Evaluated were alterations in thymus, regional and remote lymphatic glands, and spleen of biomodels as well as neuroendocrinal cells reaction in these organs in simulating anti-tularemia vaccinal process. Received are quantitative characteristics of neuroendocrinal environment state of biomodels' lymphoid organs on the 5th day after administration of anti-tularemia vaccine in different doses. Elucidated were certain principles in cells' reaction of APUD-system of biomodel's lymphoid organs and lungs, associated with nature of their alterations. Identified were the prospects of application of the APUD-system cells quantitative characteristics in view of improving and optimizing the evaluation methods as regards safety and efficiency of live vaccines.

Key words: tularemia vaccine, neuroendocrinal cells.

Authors:

Bugorkova S.A., Barulina I.S., Schukovskaya T.N. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Sayapina L.V. L.A.Tarasevich State Institute of Standartization and Control. Moscow.

Поступила 22.01.09

В.Г.Помелова¹, Т.А.Быченкова¹, Н.С.Осин²

ИММУНОЧИП НА ОСНОВЕ МИКРОПЛАНШЕТНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ФОСФАН ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ G К ВИРУСАМ ЗАПАДНОГО НИЛА, КРЫМСКОЙ-КОНГО ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ И КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

¹ГНЦ ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения»,
²ЗАО «ИММУНОСКРИН», Москва

Продemonстрирована возможность использования микропланшетной технологии ФОСФАН для одновременного обследования сывороток крови человека и выявления в них специфических IgG антител к трем арбовирусам: Западного Нила (ЗН), Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ) и клещевого энцефалита (КЭ). Чувствительность и специфичность анализа с помощью иммуночипа были сопоставимы с показателями ИФА при раздельном тестировании проб. На основе не менее чем 2-кратного превышения значения Р/Н с гомологичным антигеном над гетерологичным удалось дифференцировать группоспецифические антитела к флавивирусам КЭ и ЗН примерно в 60 % перекрестно-реагирующих сывороток. Преимущества ФОСФАН связаны с миниатюризацией формата иммуноанализа и повышением его мультиплексности, что может способствовать снижению стоимости обследования клинических образцов.

Ключевые слова: вирус Западного Нила, вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки, вирус клещевого энцефалита, иммуночип, фосфоресцентный иммуноанализ, ФОСФАН, серодиагностика.

Перспективным методическим подходом к выявлению инфекционных заболеваний при проведении скринингово-сероэпидемиологических исследований эндемичных территорий является разработка мультиплексных тестов (иммуночипов), позволяющих определять специфические антитела к нескольким возбудителям при обследовании одной пробы от больного. В отличие от обычных иммунохимических методов, таких как иммуноферментный анализ (ИФА), проведение реакции в формате иммуночипа включает взаимодействие обследуемой сыворотки с набором диагностически значимых иммунодоминантных и контрольных антигенов, «напечатанных» в виде микрозон («микроэртеев» или микропятен) на поверхности стеклянных слайдов [11], микросфер [15] или на дне лунок микропланшетов [14], что позволяет охарактеризовать спектр содержащихся в пробе специфических антител.

Ранее мы сообщали о разработке на основе микропланшетной технологии фосфоресцентного анализа (ФОСФАН) [4, 5, 6, 12] иммуночипов для выявления иммуноглобулинов М (IgM) и иммуноглобулинов G (IgG) к вирусу клещевого энцефалита (КЭ), антигенов и кДНК вируса КЭ [5], специфических антигенов других вирусов и бактерий [6, 12].

Цель настоящей работы – продемонстрировать возможность создания на основе метода ФОСФАН теста для выявления специфических IgG к трем арбовирусам: Западного Нила (ЗН), Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ) и КЭ и дифференцировать группоспецифические IgG к флавивирусам ЗН и КЭ в перекрестно-реагирующих сыворотках.

Выбор вирусных моделей основывался на данных о заболеваемости лихорадкой ЗН (ЛЗН) и ККГЛ

в южном районе европейской части России [1, 7, 10], возможности существования активных очагов КЭ в Краснодарском крае в горных и предгорных лесных зонах Кавказа, где распространен клещ *Ixodes ricinus* – переносчик вируса КЭ [7], а также сведениях о завозных случаях этих инфекций в неэндемичные регионы. Исследование проводили на панели сывороток от больных ЛЗН, ККГЛ или КЭ, у которых клинический диагноз был подтвержден серологически выявлением IgM, при этом каждая сыворотка была охарактеризована по наличию IgG к гомологичному вирусу в ИФА.

Материалы и методы

Сыворотки. В исследовании были использованы 24 пробы, в том числе 18 сывороток крови больных ЛЗН, ККГЛ или КЭ, у которых клинический диагноз был подтвержден выявлением специфических IgM к гомологичному вирусу, и 6 сывороток от клинически здоровых доноров крови (табл. 1).

Сыворотки больных ЛЗН (1 проба) и ККГЛ (6 проб) были получены из лаборатории биологии и индикации арбовирусов НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН. Согласно паспортным данным, эти сыворотки были собраны в 2007 г. в Астраханской области и охарактеризованы в экспериментальных ИФА-тест-системах, разработанных сотрудниками этой лаборатории (табл. 1). В 3 сыворотках больных ЛЗН (№ 1) и ККГЛ (№ 6 и № 7) были выявлены специфические IgG только к гомологичному вирусу; в 4 сыворотках больных ККГЛ – IgG к обоим вирусам (табл. 1).

Сыворотки больных КЭ (11 проб) были собраны

Таблица 1

Характеристика сывороток, включенных в исследование

Номер сыворотки	Место и год сбора	Диагноз больного	Данные ИФА о наличии (+) или отсутствии (-) антител к вирусу:					
			ЗН		ККГЛ		КЭ	
			IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG
1	АО, 2007	ЛЗН	+	+	-	-	н.и.	н.и.
2	АО, 2007	ККГЛ	-	+	+	+	н.и.	н.и.
3	АО, 2007	ККГЛ	-	+	+	+	н.и.	н.и.
4	АО, 2007	ККГЛ	-	+	+	+	н.и.	н.и.
5	АО, 2007	ККГЛ	-	+	+	+	н.и.	н.и.
6	АО, 2007	ККГЛ	-	+	+	+	н.и.	н.и.
7	АО, 2007	ККГЛ	-	-	+	+	н.и.	н.и.
8	ПО, 2003	КЭ	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	+	+
9	ПО, 2003	КЭ	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	+	+
10	ПО, 2003	КЭ	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	+	+
11	ПО, 2003	КЭ	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	+	+
12	ПО, 2003	КЭ	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	+	+
13	ПО, 2003	КЭ	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	+	+
14	ПО, 2003	КЭ	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	+	+
15	ПО, 2003	КЭ	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	+	+
16	ПО, 2003	КЭ	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	+	+
17	ПО, 2003	КЭ	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	+	+
18	ПО, 2003	КЭ	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	+	+
19	ПО, 2006	Донор	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	-	-
20	ПО, 2006	Донор	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	-	-
21	ПО, 2006	Донор	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	-	-
22	ПО, 2006	Донор	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	-	-
23	ПО, 2006	Донор	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	-	-
24	ПО, 2006	Донор	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	-	-

Примечания: АО – Астраханская область, ПО – Пермская область, н.и. – не исследовали.

в Пермской области в 2003 г. (получены из клинической инфекционной больницы № 1 Перми). По данным ИФА (в тест-системе «Векто ВКЭ-IgG стрип», Новосибирск), все сыворотки содержали IgG к вирусу КЭ (табл. 1).

Сыворотки доноров Пермской областной станции переливания крови (6 проб) были получены в 2006 г. вне сезона активности клещей-переносчиков КЭ. По данным ИФА (в тест-системе «Векто ВКЭ-IgG стрип», Новосибирск), эти сыворотки не содержали IgG к вирусу КЭ (табл. 1).

Все сыворотки до исследования хранились при температуре минус 20 °С.

Контрольные сыворотки. Контрольные сыворотки (положительная и отрицательная) приготовлены нами. В первом случае были объединены сыворотки № 4 и № 11, которые, по данным ИФА, содержали IgG к вирусам ЗН, ККГЛ и КЭ, во втором случае – несколько сывороток доноров, не содержащих антитела к вирусу КЭ (табл. 1).

Дизайн флуоресцентного иммуночипа. Иммуночип представлял собой 96-луночный полистироловый микропланшет. На дне лунок с помощью наноплоттера для контактной печати (разработка

ЗАО «ИММУНОСКРИН», Москва) были «напечатаны» 4 микрозоны (диаметром примерно 0,7 мм каждая), содержащие моноклональные антитела (МКА) к одному из вирусов (ЗН, ККГЛ, КЭ) и нормальный иммуноглобулин (внутренний контроль специфичности), а затем добавлены вирусспецифические антигены. Таким образом, активные микрозоны для улавливания IgG к вирусам ЗН, ККГЛ и КЭ из исследуемых сывороток представляли собой комплекс специфических антигенов с иммобилизованными МКА. Оптимальные концентрации МКА и вирусных антигенов были определены титрованием в предварительных опытах.

Использовали группоспецифические МКА 9Е2 к структурному гликопротеину Е вируса ЗН (штамм Vlg99-27889), обладающие нейтрализующей и антигеммагглютинирующей активностью [13] (получены из НПО Вектор, Новосибирск, Россия); МКА ГЕМА-12 к структурному нуклеокапсидному гликопротеину N вируса КГЛ (штамм УЗ 10145), обладающие нейтрализующей и комплементсвязывающей активностью [2] (получены из НИИ вирусологии РАМН); МКА КЭН 46-8 к поверхностному гликопротеину Е вируса КЭ, обладающие нейтрализующей активно-

Результаты исследования сывороток на IgG к вирусам ЗН, ККГЛ и КЭ в тесте на основе ФОСФАН
(жирным шрифтом выделены положительные реакции; жирным шрифтом с подчеркиванием – гомологичные реакции)

Номер пробы	Значение Р/Н с антигеном вируса:			Отношение между значениями Р/Н с антигенами вирусов ЗН и КЭ	Выявлены IgG к вирусу:
	ЗН	ККГЛ	КЭ		
1	226,1	<2,1	70,8	3,2	ЗН
2	306	1114	19,5	15,7	ЗН и ККГЛ
3	300	8,9	6,0	50	ЗН и ККГЛ
4	320,4	4,1	2,9	110,5	ЗН и ККГЛ
5	12	4,8	<2,1	н.о.	ЗН и ККГЛ
6	<2,1	13	<2,1	н.о.	ККГЛ
7	<2,1	181,5	<2,1	н.о.	ККГЛ
8	68,5	<2,1	57,1	1,2	ЗН? КЭ?
9	51,2	<2,1	92,2	1,8	ЗН? КЭ?
10	45,7	<2,1	91,4	2,0	КЭ
11	38,2	<2,1	72,5	1,9	ЗН? КЭ?
12	4,6	<2,1	13,3	2,9	КЭ
13	86,9	<2,1	95,8	1,1	ЗН? КЭ?
14	33,8	<2,1	87,8	2,6	КЭ
15	48	<2,1	50,4	1,1	ЗН? КЭ?
16	59,6	<2,1	83,7	1,4	ЗН? КЭ?
17	<2,1	<2,1	8,5	н.о.	КЭ
18	97,7	<2,1	71,4	1,4	ЗН? КЭ?
19	<2,1	<2,1	<2,1	н.о.	Не выявлены
20	<2,1	<2,1	<2,1	н.о.	Не выявлены
21	<2,1	<2,1	<2,1	н.о.	Не выявлены
22	<2,1	<2,1	<2,1	н.о.	Не выявлены
23	<2,1	<2,1	<2,1	н.о.	Не выявлены
24	<2,1	<2,1	<2,1	н.о.	Не выявлены

Примечание. н.о. – показатель не оценивается.

стью [3] (получены из НИИ вирусологии РАМН). Специфические антигены вирусов ЗН, ККГЛ и КЭ были выделены методом сахарозо-ацетоновой экстракции из мозга инфицированных новорожденных белых мышей; нормальный иммуноглобулин – из асцитической жидкости незараженных белых мышей (эти препараты были получены из НИИ вирусологии РАМН).

Проведение ФОСФАН. Фосфоресцентный иммуноанализ проводили в микролунках аналогично ТИФА. Исследуемые пробы вносили в разведении 1:100 и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и встряхивании на шейкере. Каждую пробу исследовали в дублях в двух лунках планшета. При постановке иммуноанализа в состав анализируемых проб включали контрольную положительную и контрольную отрицательную сыворотки. Для проявления реакции использовали биотинилированные МКА против IgG человека и конъюгат стрептавидина с Рт копропорфирином; время инкубации составляло, соответственно, 1 ч и 15 мин при комнатной температуре и встряхивании на шейкере. На финальной стадии лунки планшета промывали 3 раза промывочным буфером и еще 3 раза дистиллированной

водой, затем высушивали на воздухе. Интенсивность фосфоресценции (ИФ) измеряли путем сканирования дна микролунки с помощью прибора-сканера «Фосфан» (разработка ЗАО «ИММУНОСКРИН»).

Анализ результатов сканирования. Результаты сканирования представляли как интегральное число фотоимпульсов от каждой микрозоны. После компьютерной обработки картина распределения сигнала фосфоресценции по поверхности дна микролунки была представлена в виде 4 окрашенных микрозон. В микрозонах, содержащих вирусспецифические антигены, интенсивность окраски была пропорциональна концентрации IgG к соответствующему антигену в исследуемой пробе; интенсивность окрашивания в контрольной микрозоне, содержащей нормальный иммуноглобулин, показывала уровень неспецифического связывания данной пробы.

Критерии выбора положительного результата. Результаты исследования каждой пробы в данной микролунке представляли в виде значений Р/Н, где Р – ИФ пробы при взаимодействии с антигенами вирусов ЗН, ККГЛ или КЭ, N – ИФ пробы в контрольной микрозоне. Результат исследования пробы считали положительным (антитела к данному вирусу

выявлены), если P/N было равно или выше значения 2,1, а величина N не превышала 50 имп.

Дифференциация IgG к вирусам КЭ и ЗН. Для дифференциации IgG к вирусам КЭ и ЗН сравнивали значения P/N исследуемой сыворотки с антигенами этих вирусов и рассчитывали их отношение. С учетом предложенных критериев [8], определение видовой принадлежности антител проводили на основе не менее чем 2-кратного превышения значения P/N пробы с антигеном гомологичного вируса по сравнению с гетерологичным.

Результаты и обсуждение

При исследовании в ФОСФАН, IgG к вирусу ККГЛ были выявлены только в сыворотках больных ККГЛ (табл. 2). IgG к вирусу ЗН были выявлены в 15 из 24 (62,5 %) исследованных проб, в том числе в сыворотке больного ЛЗН, в 4 из 6 сывороток больных ККГЛ и в большинстве сывороток больных КЭ (табл. 2). IgG к вирусу КЭ были обнаружены в 15 из 24 (62,5 %) исследованных проб, в том числе в сыворотке больного ЛЗН, в 3 сыворотках больных ККГЛ и во всех сыворотках больных КЭ (табл. 2). Эти результаты совпали с данными ИФА, полученными при тестировании проб из групп «ЛЗН», «ККГЛ» и «КЭ» с гомологичными антигенами (табл. 1).

В сыворотках доноров IgG к какому либо из включенных в исследование вирусов не были выявлены (табл. 2).

Из числа положительных проб сыворотка больного ЛЗН, 3 сыворотки больных ККГЛ (в которых были выявлены IgG не только к гомологичному вирусу, но и к гетерологичному вирусу ЗН) и 10 сывороток больных КЭ (всего 14 проб) взаимодействовали с антигенами двух флавивирусов: ЗН и КЭ (табл. 2). Значения P/N проб из групп «ЛЗН» и «ККГЛ» были от 3 до 111 раз выше с антигеном вируса ЗН, чем с антигеном вируса КЭ. Значения этого показателя для проб из группы «КЭ» были, в среднем, в 1,7 раза выше с антигеном вируса КЭ, чем с антигеном вируса ЗН (табл. 2). По критерию 2-кратной (или более) разницы в значениях P/N с гомологичным и гетерологичным антигеном видовая принадлежность антител была правильно определена для всех проб из групп «ЛЗН» и «ККГЛ», содержащих IgG к вирусу ЗН, и только для 4 из 10 сывороток больных КЭ. Не удалось идентифицировать 6 проб из группы «КЭ», для которых соотношение P/N с гомологичным и гетерологичным антигеном было менее 2 (табл. 2).

В настоящей работе показано, что иммуночип на основе микропланшетной технологии ФОСФАН может быть использован для одновременного обследования сывороток крови человека и выявления в них специфических IgG к трем арбовирусам: ЗН, ККГЛ и КЭ. При этом чувствительность и специфичность методов ФОСФАН и ИФА (при раздельном тестировании проб) оказались одинаковыми.

При обследовании методами ФОСФАН и ИФА

проб, собранных в Астраханской области, специфические IgG к буньявирусу ККГЛ были обнаружены только в сыворотках больных ККГЛ. В противоположность этому, IgG к вирусу ЗН были выявлены не только в сыворотке больного ЛЗН, но также более чем в половине проб, полученных от больных ККГЛ (табл. 1, 2). Эти данные подтверждают известные сведения о высоком уровне иммунной прослойки к вирусу ЗН у населения Астраханской области [9].

Важно отметить, что значительная часть положительных проб из групп «КЭ», «ЛЗН» и «ККГЛ» взаимодействовали с антигенами двух флавивирусов: ЗН и КЭ. Сыворотки групп «ЛЗН» и «ККГЛ» были получены от жителей эндемичного по ЛЗН региона (Астраханская область), где не выявлена циркуляция вируса КЭ. Наоборот, сыворотки группы «КЭ» были получены от жителей высокоэндемичного по КЭ региона (Пермская область), где не циркулирует вирус ЗН. Поэтому антитела, выявленные при взаимодействии указанных сывороток с гетерологичным антигеном, в этом случае, являются группоспецифическими, так как реагируют одновременно с двумя родственными флавивирусами. Это необходимо учитывать при дифференциальной диагностике КЭ и ЛЗН [8] и оценке результатов лабораторного исследования сывороток.

Благодаря использованию панели охарактеризованных сывороток от больных ЛЗН, ККГЛ и КЭ, в которых наличие антител к флавивирусам ЗН и КЭ было выявлено в ИФА, удалось правильно установить видовую принадлежность антител к этим вирусам при анализе примерно 60 % сывороток этих групп. Исключение составили 7 проб из группы «КЭ», для которых значения P/N с антигенами обоих флавивирусов различались менее чем в 2 раза. Эти результаты свидетельствуют о необходимости повышения дифференцирующей способности разработанного на основе ФОСФАН теста за счет целенаправленного подбора МКА и, возможно, вирусных антигенов (например, рекомбинантных антигенов вместо сахарозаацетоновых).

Таким образом, технология ФОСФАН позволяет выявлять IgG к вирусам ЗН, ККГЛ и КЭ при исследовании одной пробы сыворотки в одной лунке планшета, что обеспечивает экономию биоматериала и является преимуществом по сравнению с ИФА. Вместе с тем при использовании обоих методов положительный результат выявления антител к вирусам ЗН и КЭ может быть следствием перекрестных реакций между этими антигенно-родственными флавивирусами, что необходимо учитывать при интерпретации результатов.

Перспективы ФОСФАН для сероэпидемиологического мониторинга и серодиагностики арбовирусных инфекций, на наш взгляд, связаны с созданием мультиплексных тестов для определения IgM и IgG к 6–8 вирусам, циркулирующим в сочетанных очагах. Мы имеем технические возможности для «печати» на дне лунки до 16–36 микрозон, которые могут

включать набор антигенов одного или нескольких вирусов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта ВТЕР 104/ МНТЦ 3135.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азарян А.Р., Гришанова А.П., Бутенко А.М. и др. Серологическая диагностика арбовирусных инфекций в Астраханской области. В кн.: Арбовирусы и арбовирусные инфекции: Матер. расширенного пленума проблемной комиссии «Арбовирусы» и науч.-практич. конф. «Арбовирусы и арбовирусные инфекции»; 17–20 октября 2006; Астрахань. Москва; 2007. С. 115–9.
2. Гайдамович С.Я., Мельникова Е.Э., Шуткова Т.М. и др. Характеристика моноклональных антител, индуцированных вирусом Крымской геморрагической лихорадки. Вopr. вирусол. 1989; 3: 201–4.
3. Гайдамович С.Я., Мельникова Е.Э., Gresikova M. Два типа моноклональных антител против вируса клещевого энцефалита. Acta virol. 1986; 206–12.
4. Gaidamovich S.Ya., Melnikova Ye.E., Gresiková M., Sekeyová M., Novokhatsky A.S., Kushch A.A., Novák M., Sveshnikova N.A., Mikheeva T.G., Krasnobayeva Z.N., et al. Two kinds of monoclonal antibodies to tick-borne encephalitis virus. Acta Virol. 1986; 30(3):206–12.
5. Осин Н.С., Помелова В.Г., Быченкова Т.А., Соколов А.С. Новая технология фосфоресцентного иммуноанализа для обнаружения микроорганизмов и вирусов. В кн.: Современные технологии в диагностике особо опасных инфекционных заболеваний: Матер. 4-й Межгос. науч.-практич. конф. стран СНГ; 29 сентября – 2 октября 2003 г. Саратов, 2003. С. 138–42.
6. Осин Н.С., Помелова В.Г., Быченкова Т.А. Фосфоресцентный микроанализ (ФОСФАН) как новая технология для диагностики инфекций. В кн.: Арбовирусы и арбовирусные инфекции: Матер. расширенного пленума проблемной комиссии «Арбовирусы» и науч.-практич. конф. «Арбовирусы и арбовирусные инфекции»; 17–20 октября 2006; Астрахань. Москва; 2007. С. 79–87.
7. Осин Н.С., Помелова В.Г., Соколов А.С. и др. Фосфоресцентный микроанализ как новая технологическая платформа для молекулярной диагностики. Вестник РАМН. 2007; 12:3–8.
8. Пиликова О.М., Юничева Ю.В., Ларицев В.Ф. Изучение циркуляции арбовирусов на территории, курируемой Причерноморской противочумной станцией. В кн.: Арбовирусы и арбовирусные инфекции: Матер. расширенного пленума проблемной комиссии «Арбовирусы» и науч.-практич. конф. «Арбовирусы и арбовирусные инфекции»; 17–20 октября 2006; Астрахань. Москва; 2007. С. 152–5.
9. Распопин В.В., Топычанова Н.Г., Жуков В.А. Дифференциальная серодиагностика клещевого энцефалита и лихорадки Западного Нила. Новости «Вектор-Бест». 2006; 2 (40):4.
10. Шишкина Е.О. Серологическая диагностика лихорадки Западного Нила [автореф. дис. ... канд. мед. наук]. М.; 2003. 20 с.
11. Шелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Москвина Т.М. и др. Выявление циркуляции вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки в предгорных степях Северного Кавказа. Вopr.

вирусол. 2005; 50(5):9–15.

11. Mendoza L.G., McQuary P., Mongan A. et al. High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Biotechniques. 1999; 27:778–80.

12. Osin N.S., Pomelova V.G. Multi-array immunophosphorescence technology for the detection of pathogens. In: Frontiers in research. Humana Press; 2008; 24:233–40.

13. Razumov I.A., Kazachinskaya E.I., Ternovoi V.A. et al. Neutralizing monoclonal antibodies against Russian Strain of the West Nile Virus. Viral Immunol. 2005; 18(3):558–68.

14. de Vegvar Neuman H.E., Robinson W.H. Microarray profiling of antiviral antibodies for the development of diagnostics, vaccines, and therapeutics. Clin. Immunol. 2004; 111:196–201.

15. Wong S.J., Demarest V.L., Boyle R.H. et al. Detection of human anti-flavivirus antibodies with a West Nile virus recombinant antigen microsphere immunoassay. J. Clin. Microbiol. 2004; 42(1):65–72.

Об авторах:

Помелова В.Г., Быченкова Т.А., Осин Н.С. Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения. 125424, Москва, Волоколамское шоссе, 75, к. 1. E-mail: v.pomelova@immunoscreen.ru

V.G.Pomelova, T.A.Bychenkova, N.S.Osin

PHOSPHAN Microplate Technology-Based Microarray For Detection of IgG Antibodies against West Nile, Crimean Congo Hemorrhagic Fever and Tick-Borne Encephalitis Viruses

Research Institute of Biological Engineering, Moscow;
CJSC "Immunoscreen", Moscow

Demonstrated was the possibility to use PHOSPHAN microplate technology to examine human sera and detect simultaneously specific IgG antibodies to three arboviruses, including the West Nile virus (WNV), Crimean Congo Hemorrhagic Fever virus (CCHFV), and Tick-borne encephalitis virus (TBEV). Both sensitivity and specificity of microarray immunoassay approach were similar to those of ELISA tests (when serum specimens were investigated separately). Using the criterion of 2-fold or stronger reaction of the examined serum specimen with homologous antigen than with heterologous one, we succeeded in differentiation of group specific anti WNV and anti TBEV IgG antibodies in about 60% of cross reactive sera. From the economical standpoint, the PHOSPHAN technology may have advantages as compared with currently used ELISAs due to miniaturization of immunoassay format and ability to multiplex.

Key words: West Nile virus, Crimean-Congo Hemorrhagic Fever virus, Tick-borne encephalitis virus, antigen microarray, Phosphorescence Assay, PHOSPHAN, serodiagnosis.

Authors:

Pomelova V.G., Bychenkova T.A. Research Institute of Biological Engineering. 125424, Moscow, Volokolamskoe Shosse, 75, B. 1. E-mail: v.pomelova@immunoscreen.ru

Osin N.S. CJSC "Immunoscreen", Moscow.

Поступила 15.04.09.

**И.С.Тюменцева, Е.Н.Афанасьев, Л.В.Ляпустина, О.И.Коготкова, И.В.Жарникова, В.И.Ефременко,
Д.А.Будыка, Н.Ф.Василенко, Е.Е.Афанасьева, А.Н.Куличенко**

ИММУНОМАГНИТНЫЕ СОРБЕНТЫ ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ: АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ И ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ

ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»

На основе кремнезема – алюмосиликата, модифицированного полиглюкином и вторичным алкилсульфатом натрия, получены композиционные микрогранулированные иммуномагнитные сорбенты (ИМС), которые имеют высокую адсорбционную активность за счет развитой поверхности и привитого специфического лиганда, характеризуются стандартностью структурных характеристик, обладают механической прочностью, химической и микробиологической устойчивостью, присутствие магнитного материала обеспечивает упрощение и удобство манипуляций с сорбентами при проведении анализов. Применение ИМС позволяет на этапе подготовки пробы путем многократных промываний сорбента с фиксированным на нем инфекционным агентом освободиться от всевозможных примесей, тем самым исключая их отрицательное влияние на реакцию, максимально концентрируя искомый патоген, что повышает специфичность и чувствительность методов экспресс-анализа (ИФА и ПЦР), при этом значительно сокращается время проведения анализа (до 1–3 ч).

Ключевые слова: антиген, антитело, экспресс-диагностика инфекционных болезней, иммуномагнитный сорбент, химическая модификация, чувствительность, специфичность, биотехнология.

Одним из приоритетных направлений в лабораторной диагностике инфекционных болезней является разработка высокоэффективных способов концентрирования патогенов в исследуемом материале с последующей детекцией их антигенов или нуклеиновых кислот, либо их селективной сепарацией для бактериологических или вирусологических исследований. Одним из перспективных методов концентрирования при идентификации микроорганизмов непосредственно в исследуемом материале является применение иммуномагнитной сепарации. Основой ее методологии является использование магнитных частиц с антителами, маркерными белками, либо иными лигандами, иммобилизованными на их поверхности, что обуславливает возможность высокоэффективного распознавания антигенов и других целевых молекул, их концентрации и выделения из сложных биологических образцов [13]. В качестве сорбционного материала используют различные вещества неорганической и органической природы: целлюлозу, полистирол, агарозу, поливинил, хитин и др. Особую нишу среди материалов, используемых для получения сорбентов, занимают кремнеземы (пористые стекла, силикагель, силихромы, аэросил и т.п.), имеющие ряд преимуществ: физическую и химическую устойчивость, хорошо развитую поверхность, на которой может находиться до 5 видов функционально активных групп (гидроксильные, силанольные, силоксановые, геминальные гидроксиды, вичинальные гидроксильные группы). Это делает возможным проводить химическую модификацию поверхности кремнезема в заданном направлении [1, 5, 8, 9]. Разнообразие реакций химического модифицирования поверхности кремнезема и используемые при этом приемы часто более напоминают химию органическую, чем неорганическую [11]. Введение в элементный состав кремнеземных сорбентов оксидов

металлов (Al, Ni, Co, Fe) придает им дополнительные свойства: на сорбирующей поверхности образуются электронно-акцепторные (Льюисовские) и протонно-донорные (Бренстедоновские) центры, что обуславливает супермагнетизм частиц. За счет этого микро-частицы не «склеиваются» в суспензии [10, 13].

Цель исследования – получение иммуномагнитных сорбентов (ИМС) на основе прочной, технологичной неорганической матрицы для мониторинга возбудителей бактериальной и вирусной природы.

Материалы и методы

В работе использовали обеззараженные бактериальные массы возбудителей холеры, сибирской язвы, лептоспироза, кампилобактериоза, листериоза, из которых изолировали водорастворимые комплексы по методу Е.Н.Афанасьева [2]. Гипериммунные кроличьи сыворотки получали по схемам, разработанным И.С.Тюменцевой и соавт. [6]. Антигены и асцитические жидкости к вирусам КГЛ, ЛЗН получены из ГУ НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН (Москва). Биологическим компонентом при конструировании гепатитного ИМС служила иммунная сыворотка человека, полученная в стадии реконвалесценции. Иммуноглобулины фракционировали из сывороток крови и асцитических жидкостей полиэтиленгликолем – 6000 [14]. Активность антигенов, сывороток, иммуноглобулинов определяли методом радиальной диффузии по О.Оuchterlony [12]. Удельную поверхность магносорбентов (МС) определяли по методу А.А.Клячко-Гурвича [4], а суммарный объем и радиус пор – по методу Н.В.Кельцева [3]. Микроструктуру сорбентов исследовали на сканирующем электронном устройстве IMZ-T3000 по методике Д.Фрайфельдера [7].

Результаты и обсуждение

Синтез МС с высокой сорбционной активностью осуществлен методом формирования структуры носителя в присутствии органических полимеров. В качестве сорбционного материала использовали алюмосиликат (ТУ 38-10276-84), который представляет собой тонкодисперсный продукт, содержащий двуокись кремния и оксид алюминия. Химическое модифицирование поверхности сорбента осуществляли в присутствии полимера декстрана (полиглюкина) и поверхностно-активного вещества (ПАВ) – вторичного алкилсульфата натрия.

Механизм образования пористого кремнийорганического магносорбента в присутствии полиглюкина сопровождается формированием корпускулярной структуры кремнеземного скелета из непористых частиц кремнезема и включением в данный остов полимера (декстрана) за счет многоточечной адсорбции на катионообменных центрах поверхности кремнеземного носителя.

При активировании твердофазного носителя на поверхности его частиц образуется мономолекулярный адсорбционный слой, препятствующий сближению частиц, их агрегированию и образованию пространственных структур. ПАВ, растворяясь в воде, образует мицеллы, которые благодаря гидрофобности, связывают мономерные формы поверхностных белков. При этом образуются структуры, напоминающие пчелиные соты. Они обеспечивают эффективное действие, намного превышающее эффективность исходных белков.

Процесс получения магносорбента осуществляли следующим образом: к 1 г алюмосиликатного наполнителя добавляли 40 мл 3 % водного раствора полиглюкина и 2 г магнитного порошка (Fe_2O_3), перемешивали и проводили гелеобразование при температуре $(22 \pm 4)^\circ\text{C}$ в течение 2 ч. Значение pH гелеобразования составляло 7,0. Полученный сорбент высушивали при $100\text{--}110^\circ\text{C}$ в течение 30 мин, измельчали и методом рассева выделяли фракции с размером частиц 80–120 микрон. На стадии гидрогеля протекают конденсационные процессы с участием силановых групп частиц алюмосиликата, происходит перераспределение вещества, частицы укрупняются, контакты срастаются. Синерезис (самопроизвольное уменьшение объема геля с отделением жидкости) происходит в результате уплотнения пространственной структуры сетки, образованной частицами дисперсной фазы. Структурированная система при синерезисе переходит в термодинамически более устойчивое состояние. При термообработке гидрогель превращается в ксерогель, при этом объем гидрогеля уменьшается более чем в 10 раз, благодаря действию капиллярных сил. Таким образом, ксерогель композиционного магносорбента – это корпускулярная система, состоящая из аморфных частиц кремнезема, покрытых органическим полимером (декстраном), связанных друг с другом в пространственном каркасе. При корпускулярном

строении композиционных сорбционных материалов поры представляют собой пустоты между глобулами. Исследование удельной поверхности показало, что сорбент, не содержащий в своем составе Fe_2O_3 , имеет удельную поверхность – $58\text{ м}^2/\text{г}$, объем пор – $1,70\text{ см}^3/\text{г}$, радиус пор – $42,5\text{ нм}$. Введение оксида железа в структуру кремнеземного сорбента изменяло его структурные характеристики: удельная поверхность имела значение $18\text{ м}^2/\text{г}$, объем пор – $1,19\text{ см}^3/\text{г}$, радиус пор – $132,2\text{ нм}$. В микроструктуре поверхности алюмосиликатного МС сочетаются обширные участки сплошной непористой массы со структурой губчатого характера. По данным электронной микроскопии, алюмосиликатный сорбент в своей структуре объединяет элементы структуры, характерные для макропористого стекла и гидротермального силихрома С-120. Магнитный порошок, входящий в состав структуры композиционного сорбента, усиливает срастание глобулярных частиц в сплошные непористые участки за счет участия силанольных групп поверхности – Si-OH в дегидратационных процессах.

Для химического активирования МС использован вторичный алкилсульфат натрия. Оно заключалось в следующем: к 1 г МС приливали 7,5 мл дистиллированной воды, содержащей 0,25 мл ПАВ. Смесь инкубировали 1–2 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, затем сорбент отмывали 100 мл 0,9 % раствора натрия хлорида и 100 мл дистиллированной воды. Для придания магносорбенту биоспецифических свойств проводили иммобилизацию специфических белковых лигандов (Ig G) в концентрации 2,5–3 мг/мл методом ковалентного связывания в течение 2 ч, при значении pH раствора белка 6–7 и температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Эффективность использования иммуномагнитных сорбентов была продемонстрирована во время вспышки холеры в Республике Дагестан в 1994 г. Холерные ИМС, помещенные на специальные магнитные «ловушки», ставили в канализационные стоки, оросительные каналы, артезианские колодцы и другие объекты. Доставляемые пробы исследовали методом количественной иммунофлуоресценции (КИФА) и бактериологическим методом путем посева сорбентов на питательные среды. Методом КИФА удалось получить 15 положительных результатов. Из канализационных стоков одного из поселков, кроме дважды подтвержденных люминесцентно-серологическим методом результатов, удалось выявить культуру холерного вибриона при посеве сорбентов на питательные среды. Общепринятым бактериологическим методом ни в одном случае выделить культуру холерного вибриона не удалось.

Впервые использование магнитных лептоспирозных сорбентов с ИФА позволило осуществить крупномасштабный мониторинг поверхностных водоемов Краснодарского края на наличие в них лептоспир во время эпидемиологических вспышек в 1997–1998, 2003, 2005 гг. Положительные результаты на наличие лептоспир были получены в 78 % исследованных проб, что подтверждено традиционными методами.

Предварительное избирательное концентрирование на ИМС позволило повысить специфичность традиционных экспрессных анализов (ИФА и КИФА) и увеличить выявляемость возбудителей кампилобактериоза и листериоза на 9,4–11,8 % при исследовании 1946 проб из объектов внешней среды (смывы с рук ветеринарных работников, пробы почвы, воды, пищевых продуктов, дикая и домашняя птица, грызуны).

В 2001 г. во время вспышки сибирской язвы в Красногвардейском районе Ставропольского края лишь в сочетанном методе (ИМС+КИФА) удалось выявить споры возбудителя сибирской язвы в пробах почвы. Традиционные методы дали отрицательный результат. Использование ИМС с ПЦР повысило чувствительность этой реакции на порядок.

В результате применения тест-системы диагностической магнимоносорбентной для экспресс-диагностики вирусного гепатита А (в ИФА и ПЦР) во время вспышки в ст. Зеленчукской Карачаево-Черкесской Республики в январе–марте 2004 г., когда заболело 180 человек, был установлен источник инфекции и подтвержден водный путь распространения, что позволило провести эпидемиологическое расследование, на основании которого были приняты оптимальные решения и реализованы конкретные мероприятия по ее ликвидации. При исследовании материала традиционными ИФА и ПЦР положительных проб не выявлено.

Диагностическая ценность и преимущества ИМС были подтверждены во время вспышек КГЛ на территории Ставропольского края в 2000–2004 гг. при исследовании клинического и полевого материала (иксодовые клещи, собранные в природных очагах инфекции). Их применение в сочетании с ИФА и ПЦР позволило повысить выявляемость заболеваний и определение инфекционного агента до 50 %.

Впервые на территории Ставропольского края при исследовании полевого материала (комаров и клещей) с применением разработанного ЛЗН-сорбента установлена циркуляция вируса лихорадки Западного Нила, при этом основным переносчиком определены комары рода *Aedes*, а резервуаром – клещи *Hyalomma marginatum*. Проведение ИФА и ПЦР с привлечением сорбционной технологии позволило максимально сконцентрировать вирус ЛЗН, что повысило число положительных находок в 2–2,5 раза.

Таким образом, на основе кремнезема-алюмосиликата, модифицированного полиглюкином и вторичным алкилсульфатом натрия, получены иммуноманитные сорбенты, применение которых позволяет на этапе подготовки пробы путем многократных промываний сорбента с фиксированным на нем инфекционным агентом освободиться от всевозможных примесей, тем самым исключать их отрицательное влияние на реакцию, максимально концентрировать искомый патоген, что повышает специфичность и чувствительность методов экспресс-анализа (ИФА и ПЦР), при этом сокращается время их проведения (до 1–3 ч), значительно повышается достоверность как положитель-

ных, так и отрицательных результатов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айлер Р. Химия кремнезема. М.: Мир; 1982. 127 с.
2. Афанасьев Е.Н. Научно-методические аспекты экспресс-диагностики возбудителей особо опасных зоонозных инфекций (чума, бруцеллез, сибирская язва) [автореф. дис. ... д-ра мед. наук]. Ростов Н/Д; 2000. 45 с.
3. Кельцев Н.В. Основы адсорбционной техники. М.: Химия; 1984. 280 с.
4. Клячко-Гурвич А.А. Методы определения удельной поверхности. М.: АН СССР, 1961. 10. 1885 с.
5. Неймарк Н.Е. Синтетические минеральные адсорбенты и носители катализаторов. Киев: Наукова Думка; 1982. 210 с.
6. Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Жданова Е.В., Жарникова И.В., Афанасьев Н.Е., Лаврешин М.П. и др. Разработка рациональной биотехнологии получения диагностических иммунных сывороток. Вестник Российской военно-медицинской академии. СПб; 2008; 1-2(22):210–1.
7. Фрайфельдер Д. Физическая биохимия. М.: Мир; 1980. 73 с.
8. Ходж Ф. Органические реакции с использованием реагентов или субстратов, ковалентно закрепленных на функционализированных неорганических носителях. Журнал Всесоюз. хим. об-ва им. Д.И.Менделеева. 1989; 34(3):331–9.
9. Чуйко А.А., Горлов Ю.И. Строение поверхности пирогенного кремнезема, природа его активных центров и механизмы сорбционных процессов. В кн.: Кремнеземы в медицине и биологии: Сб. научн. трудов. Киев – Ставрополь; 1993. С. 4–41.
10. Bangs J.B. New developments in particle – based immunoassays: introduction. Pure Appl. Chem. 1996; 68(10):1873–9.
11. Burwell R.L. Modified silica gels as adsorbents and catalysts. J. Chem. Technol. 1974; 15(1):370–7.
12. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gel. Arkiv för Kemi, Mineralogi och Geologi. 1949; 261(14):1–9.
13. Peruski A.N., Peruski L.F.Jr. Immunological methods for detection and identification of infectious disease and biological warfare agents. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2003; 10(4):506–13.
14. Polson A., Potgieter G.M., Largier J.E. et al. The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight. J. Biochem. Biophys. Acta. 1964; 82:464–75.

Об авторах:

Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н., Ляпустина Л.В., Коготкова О.И., Жарникова И.В., Ефременко В.И., Будыка Д.А., Василенко Н.Ф., Афанасьева Е.Е., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355106, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru

I.S.Tyumentseva, E.N.Afanas'ev, L.V.Lyapustina, O.I.Kogotkova,
I.V.Zhamnikova, V.I.Efremenko, D.A.Budyka, N.F.Vasilenko,
E.E.Afanas'eva, A.N.Kulichenko

Immune-Magnetic Absorbents Used for Express Diagnosis of Dangerous Infectious Diseases: Biotechnology Aspects and Experience of Application

Stavropol Anti-Plague Research Institute

Compositional micro-grained immune-magnetic absorbents (IMA) were obtained on the basis of silica – aluminosilicate, modified by polyglucine and sodium secondary alkylsulphate. IMA were shown to possess high adsorption activity due to their developed surface and implanted specific ligand, standard structural features, mechanical reliability, chemical and microbiological stability. The existence of magnetic material provided facilitation and convenience of operations with absorbents in analysis performance. Applying of IMA allowed to release of any mixtures with their adverse effect on reaction during samples preparing by means of rinsing the absorbent with fixed infected agent on it; concentrating the unknown pathogen to the extent possible increased the specificity and sensitivity of express-analysis methods (EIA and PCR), the time spending for analysis reduced substantially (up to 1–3hours).

Key words: antigen, antibody, express-diagnosis of infectious diseases, immune-magnetic absorbents, specificity, sensitivity, chemical modification, biotechnology.

Authors:

Tyumentseva I.S., Afanas'ev E.N., Lyapustina L.V., Kogotkova O.I., Zhamnikova I.V., Efremenko V.I., Budyka D.A., Vasilenko N.F., Afanas'eva E.E., Kulichenko A.N. Stavropol Anti-Plague Research Institute. 355035, Stavropol, Sovetskaya St., 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru

Поступила 20.04.09.

М.В.Антонычева, И.А.Кузьмиченко, А.К.Никифоров, О.А.Волох,
И.В.Шульгина, С.А.Нижегородцев

ЭФФЕКТИВНОСТЬ АВТОЛИЗА ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ, ИНДУЦИРОВАННОГО ФЕРМЕНТНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

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

Изучено влияние ферментных препаратов (трипсина, пепсина, проназы, протеовибрина – ферментного комплекса, выделенного из ультрафильтрата культуральной жидкости производственного штамма *Vibrio cholerae* М 41 серовара *Ogawa* и не инактивированного автолизата дрожжей) на процесс автолиза хлебопекарных дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*). Использование выбранных ферментных препаратов в сублитических дозах оказывает стимулирующее действие на автолитический процесс, сокращая его время и позволяя получить автолизат с более высоким содержанием аминного азота.

Ключевые слова: автолиз, *Saccharomyces cerevisiae*, гидролиз, ферменты, питательные среды.

В качестве питательных основ микробиологических сред обычно используют гидролизаты различного белкового сырья. Перспективным сырьем является биомасса дрожжевых клеток, удовлетворяющая требованиям стандартности, безопасности, экономичности и конкурентоспособности питательных сред. При их конструировании применяют дрожжевые экстракты, автолизаты и гидролизаты.

Автолиз является разновидностью ферментативного гидролиза, так как происходит под воздействием собственных ферментов. При создании определенных условий активизируется ферментная система дрожжевой клетки, что приводит к расщеплению белковых структур клетки до водорастворимых соединений [1, 7, 17]. Процесс является экономичным, поскольку гидролиз с образованием аминокислот, пептидов и витаминов происходит в основном под действием комплекса ферментов, находящихся на внутренней поверхности клеточной стенки и на лизосомах.

Способы получения автолизата пекарских дрожжей можно систематизировать по основным индуцирующим воздействиям: механическому (гомогенизация в мельницах вибро- и ударного типа, продавливание под высоким давлением через сопло); термическому (замораживание и продавливание через сопло замороженной массы или кратковременная высокотемпературная обработка с последующим быстрым охлаждением); электрическим или ультразвуковым полем; химическому (использование хлороформа, толуола, этанола, олеиновой кислоты и т.д.) и ферментативному (добавление ферментов – пепсина, трипсина, папаина, протосубтилина, лизоцима и др.) в дозах, стимулирующих процесс автолиза [2, 3, 4, 6, 7, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 19, 20].

К эффективным, экономичным и, соответственно, перспективным относятся способы индукции автолиза с помощью химических веществ и ферментов, в том числе микробного происхождения [2, 3, 5, 6, 7, 11, 13, 17]. Известно, что введение ферментов даже в

небольших дозах, демаскирует белковые структуры эндогенных ферментов дрожжевой клетки, переводя их в активное состояние, обеспечивая синергический эффект интенсификации автолиза [1, 3, 14]. Также эффективность процесса гидролиза повышает дробное дозированное добавление одного и того же фермента [2, 13, 14].

В качестве полиферментных препаратов для гидролиза белкового сырья используют биомассу интактных дрожжей (рода *Saccharomyces*) и их автолизаты [12, 13]. Дрожжевые клетки (*Sac. cerevisiae*), иммобилизованные на керамических носителях, используют в качестве биокатализаторов гидролизного процесса [8]. Логично предположить возможность использования в качестве ферментного индуктора автолиза неинактивированный автолизат той же культуры.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния различных по происхождению и специфическому действию ферментных препаратов на эффективность автолиза пекарских дрожжей и выбор индуктора автолитического процесса в его оптимальной концентрации.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования были выбраны дрожжи пекарские прессованные – *Sac. cerevisiae* (ГОСТ 171-81) в виде водной суспензии 1:4 (w/v). Для протеолитического воздействия на дрожжевые клетки использовали коммерческие препараты: трипсин (Serva), проназу (Serva), пепсин (Spofa) и экспериментальный ферментный комплекс – протеовибрин, полученный нами из ультрафильтрата культуральной жидкости производственного штамма *Vibrio cholerae* М 41 серовара *Ogawa*, с известным составом и активностью ферментного комплекса [9, 10].

Протеолитическую активность, в условных единицах, предварительно определяли на плотной тест-

среде с обезжиренным молоком при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Ферментный препарат в двукратном разведении вносили в лунки, единицу рассчитывали по разведению, дающему через 24 ч просветление вокруг лунки в 2 мм, при стандартных условиях постановки реакции [9, 17]. Дозы различных ферментных препаратов, вносимых в дрожжевую суспензию, выравнивали по активности (из расчета 120000, 100000, 80000 и 16000 усл.ед./л).

Шестичасовой автолизат пекарских дрожжей использовали как самостоятельный полиферментный препарат, внося его в дозе 1, 3 и 5 % к объему исходной дрожжевой взвеси. Дрожжевая биомасса после 4–6 ч автолиза проявляла протеолитическое действие на молочной тест-среде.

Автолиз проводили в объеме 100, 1000 мл в стеклянных бутылках 0,2 и 2,5 л при температуре $(49 \pm 1)^\circ\text{C}$ и периодическом перемешивании. В опытных (автолиз с добавлением ферментного препарата) и контрольных (собственно автолиз) сериях в качестве плазмолизирующего и стабилизирующего вещества использовали хлороформ (до 1,5 %). Длительность процесса составляла 24–30 ч. Пробы отбирали через каждые 2 ч.

Степень лизиса и эффективность гидролитического расщепления белка контролировали по снижению оптической плотности (в %) автолизата по отношению к оптической плотности исходной взвеси турбидиметрическим методом [7, 17] и по содержанию аминного азота методом формольного титрования [16, 17]. Динамику изменения дрожжевых клеток в процессе автолиза определяли в мазках с окраской спиртовым раствором метиленового синего на инвертированном микроскопе с фото/ви-

део съемкой [5, 17].

Ферментативный процесс останавливали прогреванием биомассы при режиме 110°C ($0,5 \text{ кгс/см}^2$) в течение 30 мин. После отстаивания взвеси надосадочную жидкость декантировали, фильтровали и лиофилизировали.

Оценку значимости различий полученных значений проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента; статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для контроля динамики изменения дрожжевых клеток (рис. 1, А – интактные клетки) в процессе автолиза из дрожжевой взвеси через каждые 2 ч делали мазки – с целью учета количества живых клеток. Погибшие клетки имеют другую форму и восприимчивость к окраске. Ферменты в дозе, превышающей 100000 усл.ед./л, оказывали протеолитическое действие через 6–12 ч, вызывая гибель около 40–45 % дрожжевых клеток (рис. 1, Б). При автолизе (рис. 1, В) за этот период количество погибших клеток – 10–15 %.

Установлено, что выбранные ферментные препараты в дозе от 100000 усл.ед./л и выше оказывали протеолитическое действие на субстрат – взвесь клеток пекарских дрожжей. В дальнейших экспериментах ферментные препараты применяли в меньших дозах.

Эффективность автолиза пекарских дрожжей по изменению оптической плотности взвеси и содержанию аминного азота, в зависимости от добавленных ферментных препаратов (концентрация которых вы-

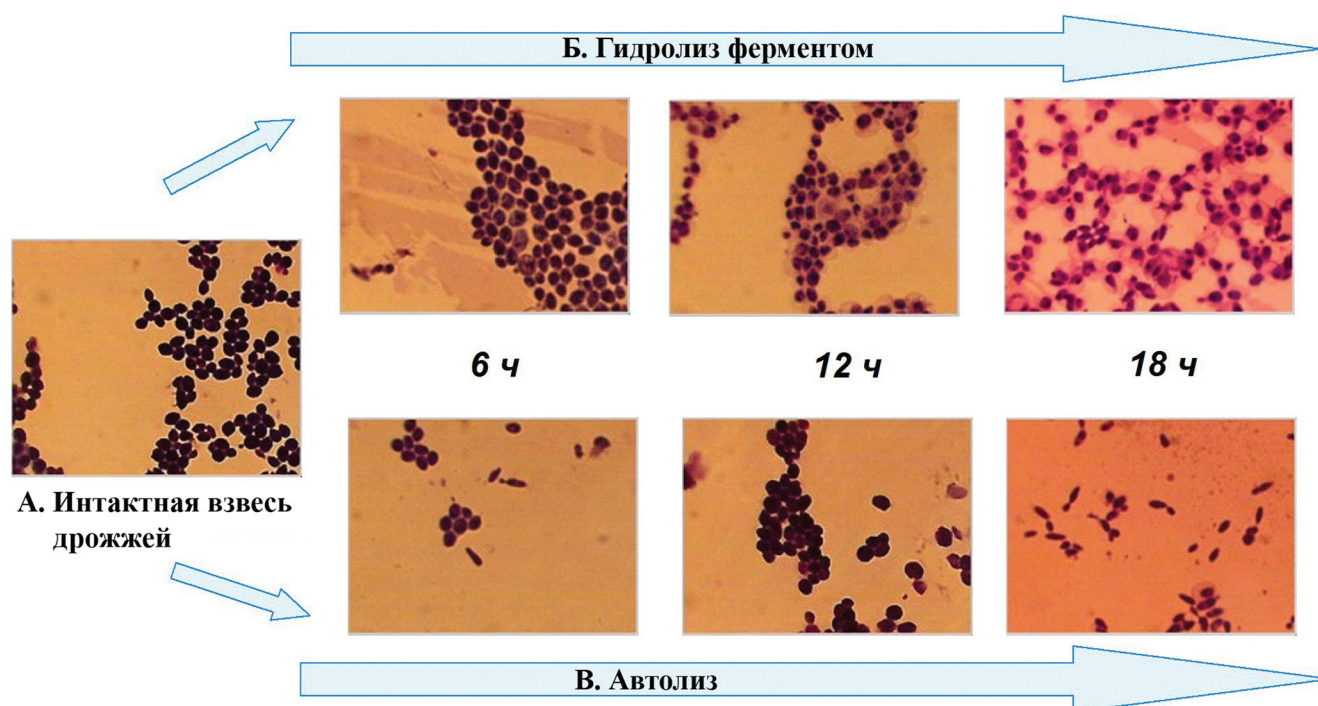


Рис. 1. Изменение морфологии дрожжевых клеток:

А – интактная взвесь; Б – гидролиз ферментом (трипсин 120000 усл.ед./л); В – собственно автолиз. Окраска метиленовым синим

Таблица 1

Влияние ферментов различного происхождения на автолиз пекарских дрожжей через 24 ч инкубации

Вариант автолиза	Аминный азот		Снижение оптической плотности, %	pH
	г/л	прирост, %		
Трипсин (Serva)	1,89	180	51,6	5,6
Пепсин (Spofa)	1,54	147	49,32	5,6
Проназа (Serva)	1,68	160	45,16	5,3
Протеовибрин	1,85	177	50	5,6
Контроль (собственно автолиз)	1,05	100	29,35	5,3

ровнена по активности – 80000 усл.ед./л), представлена в табл. 1.

Прирост аминного азота в контроле условно приняли за 100 %. Более активное действие оказали трипсин и комплексный ферментный препарат – протеовибрин, судя по накоплению аминного азота и степени лизиса дрожжевых клеток. Прирост аминного азота в автолизате через 24 ч достигал, соответственно, 180 и 177 % по сравнению с контролем. Этому соответствовала и степень лизиса, определенная турбидиметрическим методом по снижению оптической плотности.

В следующих опытах по изучению индуцирующего воздействия ферментов – трипсина и протеовибрина на автолиз клеток пекарских дрожжей была испытана доза, уменьшенная в пять раз (16000 усл.ед./л). Также изучено действие шестичасового свежеприготовленного автолизата, в качестве комплексного ферментного препарата, в концентрации от 1 до 5 % в автолизируемой взвеси дрожжей.

По уровню накопления аминного азота (см. рис. 2) было отмечено, что уже через 12 ч автолиза в присутствии ферментов трипсина, протеовибрина и шестичасового автолизата (концентрация в дрожжевой взвеси 3 и 5 %) автолитический процесс протекает эффективнее (различие с контролем статистически значимо: по результатам двенадцатичасовых проб – $p < 0,05$; по результатам двадцатичетырехчасовых проб – $p < 0,001$).

Добавление ферментов в качестве индукторов позволяет ускорить ферментативные реакции, характерные для автолиза дрожжевых клеток, и получить продукт – водорастворимую фракцию автолизата с высоким содержанием аминного азота.

Как и предполагали, максимальная степень конверсии исходного сырья произошла при добавлении трипсина и протеовибрина (80000 усл.ед./л). Применение ферментов в выбранных дозах обеспечивало достоверное по сравнению с контролем увеличение степени лизиса и прироста аминного азота. Отмечено положительное действие на процесс автолиза шестичасового автолизата той же культуры дрожжей, проявляющегося в концентрации от 3 % (см. таб. 2). Добавление 1 % свежего неинактивированного автолизата к исходной взвеси не позволило выявить статистически значимых различий в содер-

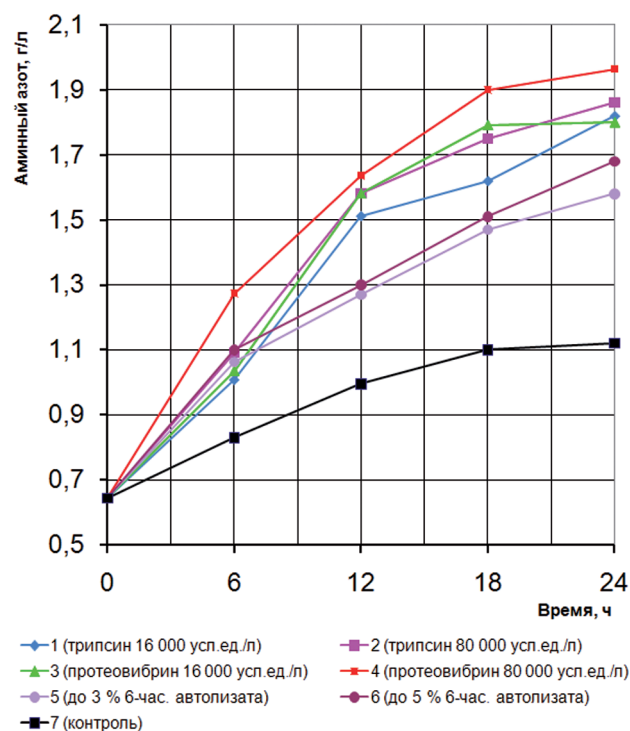


Рис. 2. Динамика накопления аминного азота в дрожжевом автолизате под действием ферментов

жания аминного азота в полученном препарате по сравнению с контролем ($p > 0,05$).

Результаты эффективности автолиза по снижению оптической плотности дрожжевой взвеси коррелировали с результатами накопления аминного азота в автолизате – максимальные показатели получены в опытах с применением протеовибрина и трипсина (таб. 2).

В работе были использованы прессованные пекарские дрожжи из разных производственных серий, при этом зарегистрированы значительные колебания уровня аминного азота (0,18–1,0 г/л) в исходной дрожжевой взвеси. Спонтанный автолиз дрожжевых клеток и расщепление эндопротеазами с образова-

Таблица 2

Зависимость эффективности автолиза от концентрации фермента в дрожжевой взвеси через 24 ч инкубации

Вариант автолиза	Аминный азот		Снижение оптической плотности, %
	г/л	%	
Трипсин 16000 усл.ед./л	1,82*	162,5	49*
Трипсин 80000 усл.ед./л	1,86*	166,2	50,99*
Протеовибрин 16000 усл.ед./л	1,80*	160,7	51*
Протеовибрин 80000 усл.ед./л	1,96*	175,4	52,63*
1 % 6-часового автолизата	1,39**	124,5	38,0**
3 % 6-часового автолизата	1,52*	136,1	45,0*
5 % 6-часового автолизата	1,68*	150,0	45,6*
Контроль (собственно автолиз)	1,12	100	32,7

*Различие с контролем статистически значимо ($p < 0,001$), $n = 17$.

**Различие с контролем статистически не значимо ($p > 0,05$).

нием инактивированных (денатурированных) форм фермента присущ всем дрожжевым культурам и происходит при положительной температуре. Уровень аминного азота во взвеси может косвенно свидетельствовать о состоянии дрожжевой популяции – ее старении [3, 15]. Поэтому при работе с прессованными пекарскими дрожжами необходимо учитывать срок их изготовления и условия хранения.

Таким образом, изучение влияния ферментных препаратов различного происхождения на процесс автолиза хлебопекарных дрожжей (*Sac. cerevisiae*) показало, что использование ферментов (трипсина, пепсина, проназы, протеовибрина и собственно автолизата пекарских дрожжей) оказывает стимулирующее действие на автолитический процесс. Применение трипсина и протеовибрина сокращает время автолиза на 6 ч и увеличивает в 1,5–1,7 раза выход водорастворимой части автолизата (по аминному азоту).

Впервые в качестве индуктора автолиза дрожжевых клеток был использован протеовибрин. Фермент микробного происхождения не уступает по гидролитической активности трипсину – ферменту поджелудочной железы, традиционно применяемому для ферментативного гидролиза при изготовлении питательных основ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонов В.К. Химия протеолиза. М.: Наука, 1991. 504 с.
2. Бабаян Т.Л., Латов В.К. Способ оценки протеиназной активности комплексного ферментного препарата по данным кинетики протеолиза модельного белкового субстрата. Биотехнология. 2003; 6:47–51.
3. Белоусова Н.И., Гордиенко С.В., Ерошин В.К. Влияние условий автолиза на характеристики аминокислотных смесей, полученных с использованием этаноласимилирующих дрожжей. Прикладная биохим. и микробиол. 1995; 31(4):458–62.
4. Белоусова Н.И., Гордиенко С.В., Ерошин В.К., Ильченко В.Я. Получение смеси аминокислот на основе автолизатов дрожжей *Saccharomyces*, выращенных на этаноле или сахарах. Биотехнология. 1990; 3:6–9.
5. Божков А.И., Леонова И.С., Облак В.И. Удаление клеточных стенок *Saccharomyces cerevisiae* ферментным комплексом *Chaetomium globosum* Kunze. Биотехнология. 2004; 6:46–53.
6. Божков А.И., Облак В.И. Экскреторная активность гидролитических ферментов *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm в глубоководной культуре. Биотехнология. 2007; 1:41–6.
7. Кислухина О.В., Калуняц К.А., Аленова Д.Ж. Ферментативный лизис микроорганизмов. Алма-Ата: Рауан; 1990. 200 с.
8. Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Чуенко Т.В., Ивицина И.Б., Куюкина М.С., Рычкова М.И., Филл Дж.К. Углеродсодержащие макроструктурированные керамические носители для адсорбционной иммобилизации ферментов и микроорганизмов. Биотехнология. 2006; 1:76–83.
9. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Киреев М.Н., Белякова Н.И., Клокова О.Д. Тест-среды для определения активности триназы, протеазы и фосфолипазы в холерной химической вакцине и ее компонентах. Пробл. особо опасных инфекций. 2002; 1(83): 148–53.
10. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Нижегородцев С.А.,

Балашова Е.В., Дятлов И.А., Киреев М.Н. Экзоферменты ультрафильтрата культуральной жидкости вакцинного штамма М-41 холерного вибриона. В кн.: Сборник материалов VIII Рос. науч.-практ. конф. по проблеме «Холера». Ростов н/Д; 2003. Вып. 16. С. 229–30.

11. Латов В.К., Бабаян Т.Л., Гордиенко С.В., Коган А.С., Цырякин В.А., Беликов В.М. Комплексная переработка дрожжевой биомассы. Биотехнология. 1990; 3:14–8.
12. Неклюдов А.Д., Илюхина В.П., Мосина Г.И., Петракова А.Н., Федорова Н.В., Кузнецов В.Д. Гидролизующая способность дрожжевых протеаз по отношению к белковым субстратам. Прикладная биохимия и микробиология. 1996; 32(2):231–6.
13. Неклюдов Д.А., Иванкин А.Н., Мосина Г.И. [и др.] Оптимизация процесса гидролиза белковых субстратов дрожжевыми протеазами *Saccharomyces cerevisiae*. Прикладная биохим. и микробиол. 1998; 34(4):394–7.
14. Плакунов В.К. Основы энзимологии. М.: Логос; 2001. 126 с.
15. Тиммербаева Р.Х., Бобкова Е.В., Туягунов М.М., Баталова Т.А., Ибрагимов Н.Ю. Биотехнологические аспекты автолиза дрожжей хлебопекарных. III. Конструирование двустадийной модели гидролиза дрожжевого сырья. В кн.: Актуал. вопр. разработки производства и применения иммунобиол. и фармацевтических препаратов: Матер. конф. Уфа, 2000. Ч. 1. С. 194–6.
16. Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов. ФС 42-3874-99. Изд. официальное. М.: Минздрав РФ.
17. Шкляр Б.Х. Ферментативный лизис дрожжей. Минск: Наука и техника; 1977. 192 с.
18. Knorr D., Shetty K., Kinsella Y. Enzymic lysis of yeast cell walls. Biotechnol. Bioeng. 1979; 21(11):2011–21.
19. Pepler H.I. Uses of food yeasts. The yeasts, London. N.Y. Academic Press; 1970. Vol. 3. 442 p.
20. Sugimoto H. Synergistic effect of Ethanol and sodium chloride in autolysis of Bakers yeast for preparing food grade Yeast extracts. J. Food Sci. 1974; 39:939.

Об авторах:

Антоничева М.В., Кузьмиченко И.А., Никифоров А.К., Волох О.А., Шулгина И.В., Нижегородцев С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

M.V.Antonycheva, I.A.Kuzmichenko, A.K.Nikiforov, O.A.Volokh,
I.V.Shulgina, S.A.Nizhegorodtsev

The Efficiency of Baker's Yeast Autolysis Induced by Enzyme Preparations

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe",
Saratov

Has been analyzed the effect of enzyme preparations (trypsin, pepsin, pronase, proteovibrin – enzyme complex isolated from cultural ultrafiltrate of the industrial strain *Vibrio cholerae* M 41 Ogawa and from non-inactivated autolysate of yeasts) upon the process of autolysis of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). The selected enzyme preparations being used in small doses render stimulatory effect to autolytic process thus reducing its duration and enabling to obtain autolysate with higher content of amine nitrogen.

Key words: autolysis, *Saccharomyces cerevisiae*, hydrolysis, enzymes, nutrient media.

Authors:

Antonycheva M.V., Kuzmichenko I.A., Nikiforov A.K., Volokh O.A., Shulgina I.V., Nizhegorodtsev S.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 26.01.09.

А.А.Курилова, Т.В.Таран, Л.С.Катунина, С.И.Головнева

РАЗРАБОТКА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»

Из растительного сырья (соевых бобов, соевого молока, мелассы свекловичной (патоки рафинадной) приготовлено 5 экспериментальных питательных основ и изучены их физико-химические показатели и аминокислотный состав. Сконструированные на экспериментальных основах питательные среды удовлетворяли питательные потребности изученных штаммов чумного, холерного, сибирезвеного микробов и спорообразующих сапрофитов.

Ключевые слова: питательные основы, питательные среды, гидролизаты, соевое сырье, меласса свекловичная (патока рафинадная), аминокислотный состав, химический состав, ростовые свойства.

В производстве питательных основ и сред для культивирования микробов актуальна проблема замены дорогостоящего мясного сырья на альтернативное, экономически выгодное, стандартное и доступное растительное сырье. Характеристика физико-химических свойств питательных основ для приготовления микробиологических сред имеет существенное значение для оценки их качества и стандартизации.

Цель работы – разработка питательных сред на основах растительного сырья для культивирования чумного, холерного, сибирезвеного микробов и почвенных спорообразующих бацилл. Задачами исследования являлось приготовление экспериментальных основ, изучение их физико-химических свойств и аминокислотного состава; конструирование питательных сред, соответствующих требованиям действующей нормативной документации [7], и изучение их ростовых качеств.

Материалы и методы

Ростовые свойства питательных сред изучали при помощи полученных из коллекционного центра ФГУЗ «Ставропольского научно-исследовательского противочумного института» Роспотребнадзора вирулентного штамма *Bacillus anthracis* 81/1; вакцинных штаммов *Yersinia pestis* EV, *Bacillus anthracis* СТИ-1; авирулентного штамма *Vibrio cholerae non* O1 P 9741 и почвенного спорообразующего сапрофита *Bacillus subtilis* 3, типичных по морфологическим и биохимическим свойствам.

В качестве контрольных питательных сред использовали традиционно применяемые агар и бульон Хоттингера, pH 7,3±0,1 и 7,8±0,1.

В экспериментальных основах (по 3 серии каждой) определяли pH, количественное содержание аминокислот, аминного азота, белка, хлоридов, калия, натрия, кальция, железа и глюкозы. Три основы готовили из соевого сырья (бобы, ГОСТ 17109-88; соевое молоко, ТУ 9146-025-10126558-98) путем гидролиза ферментами поджелудочной железы крупного рогатого скота по методике О.Л.Старцевой [8]: ферментативный гидролизат соевых бобов

(ФГС); ферментативный гидролизат соевого молока (ФГСМ); ферментативный гидролизат соевых бобов на соевом молоке (ФГСБМ). По разработанной нами технологии [4] из мелассы свекловичной, ГОСТ Р 52304-2005, готовили основу мелассу свекловичную (ОМС), представляющую собой 2 % раствор на питьевой воде с добавлением 0,5 % натрия хлористого, и ОМСдэ – такую же основу, состав которой дополняли 1 % дрожжевого экстракта.

Аминный азот, содержание хлоридов и pH измеряли в соответствии с ФС 42-3874-99 [9]. Анализ микроэлементов, белка и глюкозы проводили на биохимическом анализаторе «Stat-fax» (США) с применением наборов реагентов «Ольвекс Диагностикум» (Россия, Санкт-Петербург). Содержание свободных аминокислот определяли на автоматическом аминокислотном анализаторе 2 ААА-3 (Чехия). Все замеры производили в трехкратном повторе в каждой серии основ. Группировку первичных данных, вычисление средних арифметических и средней ошибки полученных результатов проводили на персональном компьютере IBM PC 550 с использованием пакета программ корпорации Microsoft Excel 7.0 для Windows по методам биометрии [6].

Результаты и обсуждение

Приготовленные питательные основы были прозрачными, соевые – светло-желтого, мелассовые – светло-коричневого цвета. Концентрация водородных ионов в соевых основах на начальном этапе гидролиза составляла 8,5±0,1. Смешаясь в процессе ферментации, к концу гидролиза pH достигал 7,2±0,2 в ФГС и ФГСМ и 7,3±0,1 в ФГСБМ. Технология приготовления мелассовых основ предусматривает подъем pH до 8,0±0,1 при температуре нагреваемого раствора (60±5,0) °C и доведение его до нужного значения после фильтрации. Для культивирования возбудителей чумы, сибирской язвы и сапрофитов в ОМС и ОМСдэ устанавливали pH 7,3±0,1, для выращивания холерного вибриона – pH 7,8±0,1.

В зависимости от вида сырья аминокислотный и химический состав растительных основ (таблица)

Показатели аминокислотного и химического состава экспериментальных питательных основ (M±m)

Показатель, ед измерения.	Образец питательной основы				
	ФГС	ФГСМ	ФГСБМ	ОМС	ОМСдэ
Аминный азот, %	0,880±0,030	0,740±0,040	0,860±0,030	0,030±0,001	0,090±0,001
Асп, г/л	4,600±0,920	6,430±0,850	6,620±1,910	0,640±0,240	1,720±0,220
Тре, г/л	1,730±0,150	3,140±0,700	4,660±0,560	0,004±0,001	0,330±0,015
Сер, г/л	1,630±0,110	3,470±1,370	3,310±0,950	1,530±0,470	2,380±0,740
Глу, г/л	6,460±1,160	6,560±0,930	9,610±1,130	1,860±0,090	3,250±0,970
Гли, г/л	1,780±0,880	2,180±0,180	3,060±0,980	0,340±0,016	0,910±0,019
Ала, г/л	1,690±0,470	2,570±0,560	4,120±1,720	0,420±0,018	0,830±0,012
Вал, г/л	2,410±0,980	3,690±0,470	4,970±1,230	0,290±0,007	1,150±0,054
Мет, г/л	0,150±0,030	0,250±0,080	3,680±0,130	0,002±0,001	0,012±0,003
Изо, г/л	3,920±0,540	5,480±0,770	7,800±1,440	0,230±0,005	0,560±0,008
Лей, г/л	3,170±0,320	5,360±0,690	5,940±1,860	0,310±0,003	1,130±0,025
Тир, г/л	0,630±0,240	1,120±0,140	1,410±0,090	0,190±0,006	0,550±0,009
Фала, г/л	1,150±0,110	1,680±0,250	2,490±0,670	0,001±0,001	0,430±0,004
Гис, г/л	0,920±0,030	1,300±0,150	2,080±0,120	0,001±0,001	0,390±0,022
Лиз, г/л	2,670±0,750	3,970±0,920	6,300±0,820	0,002±0,001	0,610±0,067
Арг, г/л	0,490±0,060	1,700±0,080	1,620±0,070	-	0,470±0,030
Белок, г/л	7,600±0,200	12,300±0,100	22,500±0,500	*	4,000±0,300
К, г/л	0,750±0,010	0,750±0,020	0,700±0,010	0,660±0,020	0,430±0,010
Na, г/л	5,400±0,250	5,500±0,190	5,380±0,220	2,620±0,080	2,190±0,060
Ca, г/л	0,270±0,020	0,010±0,001	0,020±0,001	0,010±0,001	0,020±0,001
Fe, мг/л	1,610±0,150	1,160±0,120	1,690±0,090	-	-
СГ, г/л	0,530±0,200	1,010±0,040	0,880±0,060	4,540±0,500	3,510±0,300
Глюкоза, г/л	0,840±0,020	0,920±0,030	1,200±0,400	0,040±0,002	0,320±0,010

Примечания: «*» – не определяли; «-» – не обнаружено.

были различными.

Соевые основы на порядок превосходили мелассовые по процентному содержанию аминного азота при наличии остаточного белка в количестве от (7,600±0,200) г/л в ФГС до (22,500±0,500) г/л в ФГСБМ, который, при учете содержания аминного азота (0,860±0,030) %, можно охарактеризовать как наиболее насыщенную по органическому азоту экспериментальную основу. Минимальное содержание аминного азота среди соевых основ зафиксировано в результате гидролиза соевого молока. Обогащенная дрожжевым экстрактом мелассовая основа по данному показателю в 3 раза превзошла базовую и, кроме этого, содержала (4,000±0,300) г/л белка.

Суммарное содержание анализируемых аминокислот и индивидуальные показатели их концентраций в соевых основах были существенно выше, чем в мелассовых. Лишь количество серина в ОМСдэ (2,380±0,740) г/л, превысившее таковое в ФГС (1,630±0,110) г/л, $p < 0,05$, составило исключение. Во всех основах отмечено преобладание глутаминовой кислоты, играющей существенную роль в аминокислотном метаболизме бактерий. Содержание практически всех аминокислот было наибольшим в ФГСБМ, кроме серина и аргинина, концентрации которых были выше в ФГСМ. Статистически достоверно сумма аминокислот в ОМСдэ (14,720±1,150) г/л преобладала над таковой в ОМС (5,820±2,440) г/л, $p < 0,05$. За счет добавления дрожжевого экстракта в

полтора раза увеличилось содержание серина и глутаминовой кислоты, почти вдвое – аланина, почти втрое и более раз – изолейцина, глицина, аспарагиновой кислоты, тирозина, лейцина, валина, метионина, треонина, лизина, гистидина и фенилаланина. В ОМСдэ было выявлено (0,470±0,030) г/л аргинина, совсем не обнаруженного в ОМС.

При изучении химического состава экспериментальных основ было выявлено максимальное количество калия в ФГС и ФГСМ, натрия – в ФГСМ, минимально оба эти элемента были представлены в ОМСдэ. На порядок превосходил все остальные показатели содержания кальция в ФГС (0,270±0,020) г/л. В ОМСдэ кальция было обнаружено вдвое больше, чем в ОМС. Наименьший показатель содержания железа среди соевых гидролизатов отмечен в ФГСМ, а наибольший – в ФГСБМ. В обеих основах на мелассе свекловичной не было обнаружено железа, однако они преобладали над соевыми по количеству хлорид-ионов. Содержание глюкозы в ОМСдэ в 8 раз превышало таковое в ОМС, оставаясь, тем не менее, ниже чем в соевых гидролизатах.

В результате исследований показано преимущество соевых основ над мелассовыми по большинству изученных показателей химического и аминокислотного состава. На основе ФГС были сконструированы питательные среды для культивирования чумного и холерного микробов [1, 2, 3].

Биологическая ценность мелассы свекловичной

(патоки рафинадной), отхода свеклосахарного производства, состоит в наличии углеводов, биологически активных веществ, аминокислот, витаминов, микроэлементов. Практически ОМС и без добавления стимуляторов является жидкой питательной средой с минимальными ростовыми свойствами, достаточными, например, для удовлетворения необходимых питательных потребностей холерного вибриона. В то же время питательные потребности сибиреязвенного микроба ОМС обеспечивала не в полной мере [5]. Недостаточный рост бацилл на ОМС мог быть обусловлен дефицитом существенных для их роста гистидина, лизина, треонина, метионина и отсутствием тиамина. Внесение в ОМС ($10 \pm 0,50$) г/л дрожжевого экстракта, при оптимальном сочетании цвета и прозрачности питательной среды, обеспечило полноценную вегетацию на ней тестируемых нами сибиреязвенных и сапрофитных штаммов. При том, что содержание аминного азота в бульоне Хоттингера (контроль) составляло ($0,140 \pm 0,052$) %, а в ОМСдэ ($0,090 \pm 0,001$) %, в испытуемой среде рост культур был более обильным и визуализировался на 2 ч раньше, что указывает на сбалансированность среды по компонентам, обеспечивающим благоприятные осмотические условия для роста данных микробов. Положительно отразилось на ростовых качествах питательных сред на основе мелассы свекловичной (патоки рафинадной) использование не дистиллированной воды, а питьевой, наличие в которой ряда элементов и солей имеет значение в микробном метаболизме и выравнивании окислительно-восстановительного потенциала. Исключение обязательных при получении традиционных питательных сред этапов гидролиза сырья и дистилляции воды при использовании патоки рафинадной – дешевого и доступного сырья, упрощает процедуру производства и еще более снижает себестоимость сред на ее основе.

Показатель прорастания ($79,6 \pm 1,5$) % на жидкой среде для культивирования чумного вакцинного штамма ЕВ [3] статистически достоверно превышал показатель прорастания ($55,2 \pm 3,7$) % на контрольной среде, $p < 0,05$. Показатели прорастания на остальных средах не имели статистически достоверных различий с контрольными показателями: ($69,4 \pm 3,2$) % на жидкой питательной среде для культивирования холерного вибриона [1] и ($67,5 \pm 2,4$) % на контрольной среде; для штаммов *B. anthracis* 81/1, СТИ-1, *B. subtilis* 3 показатели прорастания на ОМСдэ [4] были соответственно ($56,9 \pm 5,6$), ($78,5 \pm 2,2$), ($71,1 \pm 1,7$) %, и на контрольной среде соответственно ($54,3 \pm 7,5$), ($76,7 \pm 1,3$), ($68,8 \pm 0,9$) %. При посеве 0,1 мл взвеси, содержащей $1 \cdot 10^3$ м.к./мл, через 12 ч выращивания на плотной питательной среде для культивирования холерного вибриона [2] формировалось ($48,2 \pm 2,5$) % колоний типичной морфологии диаметром ($2,0 \pm 0,5$) мм, на контрольной среде – ($44,7 \pm 1,9$) % колоний диаметром ($1,5 \pm 0,5$) мм. Культурально-морфологические, тинкториальные и биохимические свойства протестированных штаммов, параллельно выращенных на опытных и контрольных средах, были удовлетво-

рительными и стабильными. После 10 пересевов на опытных средах не было обнаружено каких-либо изменений в изучаемых свойствах микроорганизмов.

Полученные результаты показали, что питательные среды, сконструированные на растительных основах из соевого сырья и мелассы свекловичной (патоки рафинадной), пригодны для культивирования возбудителей особо опасных инфекций, отвечают требованиям действующей нормативной документации [7] и могут являться альтернативой дорогостоящим средам на мясных основах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Катунина Л.С., Ефременко В.И., Старцева О.Л., Малецкая О.В., Курилова А.А., Бабий А.М., изобретатели. Питательная среда жидкая для культивирования холерного вибриона. Патент РФ № 2301256, МПК C12N 1/20, C12Q 1/04. Оpubл. 20.06.07. Бюл. № 17.
2. Катунина Л.С., Ефременко В.И., Старцева О.Л., Малецкая О.В., Курилова А.А., Бабий А.М., изобретатели. Питательная среда плотная для культивирования холерного вибриона. Патент РФ № 2303630, МПК C12N 1/20, C12Q 1/04. Оpubл. 27.07.07. Бюл. № 21.
3. Катунина Л.С., Старцева О.Л., Малецкая О.В., Головнева С.И., Смирнова Е.Б., Курилова А.А., изобретатели. Питательная среда (жидкая) для культивирования чумного микроба вакцинного штамма ЕВ. Патент РФ № 2260620, МПК C12N 1/20, C12Q 1/04. Оpubл. 20.09.05. Бюл. № 26.
4. Курилова А.А., Катунина Л.С., Малецкая О.В., Старцева О.Л., Рязанова А.Г., Проскурина В.А. и др., изобретатели. Питательная среда (жидкая) для культивирования сибиреязвенного микроба и близкородственных сапрофитов. Патент РФ № 2288950, МПК C12N 1/20, C12Q 1/04. Оpubл. 10.12.06. Бюл. № 34.
5. Курилова А.А., Малецкая О.В., Катунина Л.С., Старцева О.Л., Таран Т.В. О применении питательных сред на основе патоки (мелассы свекловичной) для выращивания сибиреязвенных и близкородственных им бацилл. Вестник российской военной медицинской академии. СПб; 2006; 1(15), приложение: 480–1.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа; 1990. 352 с.
7. Методические указания 3.3.2.124-06. Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза. М.; 2006.
8. Старцева О.Л. Совершенствование биотехнологии производства питательных сред для культивирования чумного микроба на основе сырья животного и растительного происхождения [дис. ... канд. биол. наук]. Ставрополь; 2005. 158 с.
9. Фармакопейная статья № 42-3874-99. Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов. М.; 1999.

Об авторах:

Курилова А.А., Таран Т.В., Катунина Л.С., Головнева С.И. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru

A.A.Kurilova, T.V.Taran, L.S.Katunina, S.I.Golovneva

Development of Nutrient Media out of Vegetable Material for Culturing Particularly Dangerous Infections Agents

Stavropol Anti-Plague Research Institute

5 experimental nutritious bases were prepared out of plant materials (soybeans, soymilk, sugar-beet molasses – sugar syrup), and their physical and chemical parameters and amino-acid composition were studied. Nutrient media developed on experimental basis met the nutritious demands of studied strains of plague, cholera, anthrax microbes and sporogenous saprophytes.

Key words: nutritious bases, nutrient media, hydrolyzates, soybean raw materials, sugar-beet molasses, amino-acid composition, chemical composition, growth features.

Authors:

Kurilova A.A., Taran T.V., Katunina L.S., Golovneva S.I. Stavropol Anti-Plague Research Institute. 355035, Stavropol, Sovetskaya St., 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru

Поступила 09.04.09.

Л.В.Ляпустина, П.А.Омельянчук, Г.И.Лямкин, С.В.Вилинская, С.И.Головнева, О.И.Коготкова,
Д.А.Будыка, Д.В.Русанова, А.Н.Куличенко

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА БРУЦЕЛЛЕЗНЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ БАКТЕРИОФАГОВ

ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»

На основе определения оптимальных условий репродукции бактериофагов, разработаны и представлены технологии производства бруцеллезных диагностических бактериофагов. Проведена оценка стабильности получаемого готового продукта с использованием контрольных карт Шухарта.

Ключевые слова: бруцеллезные бактериофаги, репродукция, статистические карты.

Лабораторная диагностика бруцеллеза у людей в Российской Федерации проводится согласно методическим указаниям «Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей» (МУ 3.1.7.1189-03) [3], регламентирующим бактериологический, иммуносерологический, молекулярно-генетический и аллергический методы исследования. Осуществляемая в ходе бактериологического анализа межвидовая дифференциация штаммов бруцеллезного микроба, предусматривает использование в комплексной оценке штаммов-изолятов тест на чувствительность к лизирующему действию бруцеллезного диагностического бактериофага Тб (Тбилиси).

В соответствии с рекомендациями объединенного комитета экспертов ФАО/ВОЗ по бруцеллезу [7] в числе комплексных тестов дифференциации выделяемых штаммов бруцелл применяется определение их чувствительности к литическому действию набора бруцеллезных диагностических бактериофагов Тб, Fi (Firenze), Wb (Weybridge), Bk2 (Berkley).

В настоящее время в Российской Федерации отсутствуют зарегистрированные препараты бактериофагов бруцеллезных диагностических, что затрудняет выполнение всего комплекса тестов межвидовой дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза и стандартизации результатов бактериологических исследований на бруцеллез.

Целью исследования явилось совершенствование технологии производства бруцеллезных диагностических бактериофагов для обеспечения выпуска готовой продукции со стандартизованными качественными показателями.

Материалы и методы

В качестве маточных в работе были использованы четыре бруцеллезных бактериофага, находящиеся в коллекции ФГУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора. Отработку технологии производства бактериофагов бруцеллезных диагностических и оценку их качества проводили с использованием референтных штаммов бруцелл и штаммов-изолятов из коллекции ФГУЗ СтавНИПЧИ Роспотребнадзора, в числе которых: *Brucella (B.) melitensis* – 31 штамм; *B. abortus* – 26 штаммов; *B. suis* – 29 штаммов. При выполнении бактериологических исследований были использованы: мясо-пептонный печеночный бульон (МППБ), pH 7,2±0,1; мясо-пептонный печеночный агар, pH 7,2±0,1; агар Альбими, pH 7,2±0,1; бульон Альбими, pH 7,2±0,1; эритроцит-агар, pH 7,2±0,1; агар «Д», pH 7,2±0,1; бульон «Д», pH 7,2±0,1. Питательные среды перед использованием проходили качественную оценку согласно методическим указаниям «Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей» [3].

Размножение бактериофагов проводили в бульоне, в слое полужидкого агара, на агаровой культуре с использованием стандартных штаммов размножения по методикам, описанным M.J.Corbet, E.L.Thomas [5]. Концентрацию (количество фаговых частиц) бактериофагов определяли по методу A.Gratia [6] с соответствующими индикаторными штаммами подсчетом числа негативных колоний на газоне индикаторного штамма, вычисляя среднюю величину по 4 вариантам по формуле:

$$K = (a_1 + a_2 + a_3 + a_4) \times 10^n$$
, где:
K – концентрация бактериофага
 $a_{1...4}$ – количество негативных колоний на чашке при посеве фага, разведенного в n раз.

За диагностический титр разведения (ДТР) принимали наибольшее разведение бактериофага, одна капля которого способна образовать литическое пятно с определенным видом бруцелл и не образовывать – с другими видами. Для определения ДТР бактериофагов использовали по пять штаммов каждого вида бруцелл: *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*.

Для построения кривой одиночного цикла размножения бруцеллезных бактериофагов использовали базовую методику, описанную М.Адамс [1].

Оценку стабильности технологического процесса производства бруцеллезных бактериофагов проводили с использованием контрольных карт Шухарта [2] в системе STATISTICA 6.0.

Результаты и обсуждение

В последнее время значительно расширилась номенклатура питательных сред, используемых в ми-

кробиологической практике, и одним из направлений перспективных разработок в этой области является изыскание новых источников непищевого сырья, что актуально с экономических позиций.

Для подбора оптимальных условий репродукции бруцеллезных бактериофагов было проведено сравнительное изучение использования для этих целей сред различного состава: на основе мясных гидролизатов (МППБ, бульон Мартена), на основе дрожжевого (бульон Альбими) и рыбного гидролизатов (бульон Д). При этом учитывалось, что факторы, которые влияют на эффективность размножения бруцеллезных фагов, включают: рН репродуктивной среды; питательное соответствие среды штамму-размножения; наличие двухвалентных и поливалентных катионов и анионов, а также амфотерных соединений – аминокислот.

Установлено, что для воспроизводства бруцеллезных бактериофагов с успехом можно применять среды немясного происхождения (бульон Альбими), при этом средняя концентрация получаемых фаговых препаратов с использованием данной питательной среды составляла $(7,1 \pm 0,2) \cdot 10^{11}$ фаговых частиц (ф.ч.)/мл, что было сопоставимо с концентрацией бактериофагов, получаемых на средах на основе мясного сырья (МППБ, бульон Мартена) $((6,5 \pm 0,15) \cdot 10^{11}$ ф.ч./мл), но являлось экономически более выгодным.

При сравнительной оценке используемых для размножения бактериофагов способов их воспроизводства (на бульонной культуре, в слое агаровой культуры, на агаровой культуре) было показано, что наилучший выход конечного продукта давала методика репродукции фагов в слое агаровой культуры. Однако, учитывая трудоемкость осуществления данного способа размножения в технологическом цикле производства бактериофагов, было определено, что ее применение возможно только для репродукции бруцеллезного бактериофага Bk2, размножение которого в достаточной конечной концентрации ($1 \cdot 10^7$ ф.ч./мл и более) не удалось осуществить двумя другими способами.

Согласно описанным методикам [5], воспроизводство бруцеллезных фагов Wb и Bk2 осуществляется на вирулентных представителях рода *Brucella* (*B. suis* 1330, *B. melitensis* Isfahan или *B. melitensis* Ispania соответственно), для воспроизводства бактериофагов Tb и Fi используется вакцинный штамм *B. abortus* 19.

Технологический цикл получения фаговых препаратов предусматривает применение ряда процессов (центрифугирование, фильтрация), которые при определенных условиях могут создавать угрозу биологической безопасности производства. В связи с чем была изучена возможность репродукции бактериофагов Wb и Bk2 на вакцинных аналогах (*B. suis* 61 и *B. melitensis* Rev1) вместо рекомендуемых вирулентных штаммов. В качестве определяющего использован критерий сравнительного изучения циклов оди-

ночного размножения бактериофагов на типичных штаммах-кормилках и на предлагаемых вакцинных аналогах [1].

В качестве наиболее существенных сравниваемых показателей рассматривались длительность латентного периода размножения бактериофага и выход фагового потомства на одну инфицированную микробную клетку.

Проведенные исследования показали, что процесс воспроизводства бруцеллезных бактериофагов на вакцинных штаммах характеризовался некоторым удлинением латентного периода размножения (до 2,5–3 ч) по сравнению с репродукцией на вирулентных культурах (2–2,5 ч) при достоверном ($p \leq 0,5$), хотя и незначительном увеличении (4–8 %) выхода фагового потомства.

Предложенные (*B. suis* 61, *B. melitensis* Rev1) и регламентированный (*B. abortus* 19) штаммы были апробированы для размножения бруцеллезных бактериофагов на отобранных нами средах (агар и бульон Альбими) с применением соответствующих методических приемов репродукции: для фагов Tb, Wb, Fi воспроизводство осуществляли на бульонных культурах, для бактериофага Bk2 – в слое агаровой культуры. В результате были получены серии фаговых препаратов с конечной концентрацией, удовлетворяющей нормативным требованиям ($1 \cdot 10^{9-11}$ ф.ч./мл).

Готовые препараты бактериофагов были стандартизованы по ряду показателей: количественных (концентрация и ДТР) и качественных (специфичность и специфическая активность). Установлено, что средние значения концентраций фаговых препаратов составляли для бактериофага Tb – $(2,7 \pm 0,7) \cdot 10^{12}$, Fi – $(5,2 \pm 0,4) \cdot 10^{12}$, Wb – $(1,3 \pm 0,8) \cdot 10^{11}$, Bk2 – $(1,9 \pm 0,8) \cdot 10^{11}$ ф.ч./мл. ДТР для бактериофагов Tb, Wb, Bk2 составлял 10^{-4} , для фага Fi – 10^{-5} .

Специфичность и специфическая активность экспериментальных серий бруцеллезных бактерио-

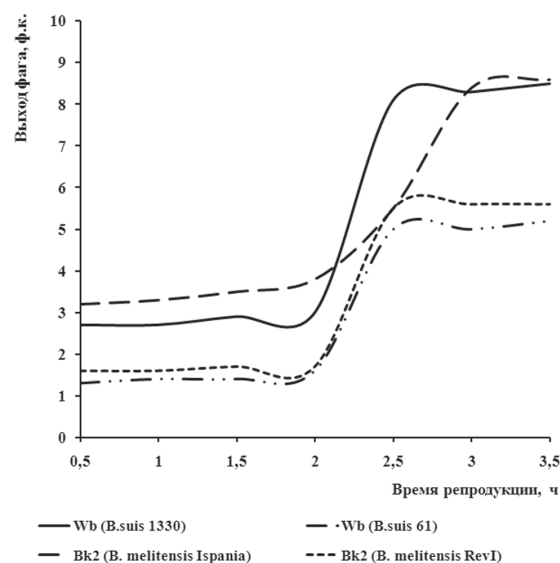


Рис. 1. Кривые одиночного цикла размножения бруцеллезных бактериофагов на соответствующих штаммах размножения

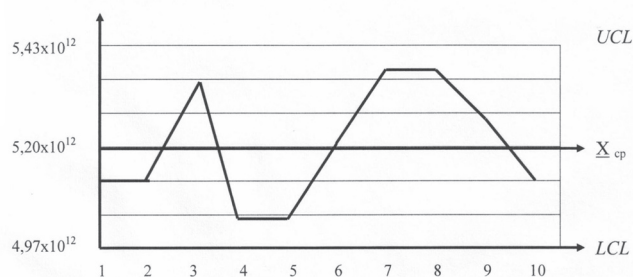


Рис. 2. Карты средних значений $\bar{X}_{cp}$ (Шухарта) концентрации бруцеллезного диагностического бактериофага Fi

фагов оценивалась по диапазону литических свойств в отношении штаммов бруцелл 3 видов (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*) в стабильной S-форме, показавшая полное соответствие изученных свойств фагов с таковыми у их исходных маточных образцов.

Для оценки стабильности показателей готового продукта бактериофагов бруцеллезных диагностических, полученного по разработанным технологическим схемам производства были использованы контрольные карты Шухарта [2]. В качестве количественного критерия, контролируемого согласно ФСП 42-8969-07 [7], анализировалась концентрация бруцеллезных диагностических бактериофагов Tb, Fi, Wb, Bk2.

На примере бактериофага Fi представлена карта средних значений $\bar{X}_{cp}$. Карта Шухарта имеет центральную линию (CL – Control Limit), соответствующую эталонному значению характеристики (концентрации бактериофага Fi – $\bar{X}_{cp}$), и две статистические определяемые контрольные границы верхнюю (UCL – Upper Control Limit) и нижнюю (LCL – Lower Control Limit).

При анализе контрольных карт Шухарта показано, что ни одно значение концентрации изученных серий бактериофага бруцеллезного диагностического Fi не вышло за верхний и нижний пределы карты, поэтому можно констатировать стабильность протекания процесса производства препарата с использованием предлагаемых технологических схем, с погрешностью $\pm 3\sigma$. Контрольные границы на картах Шухарта находятся на расстоянии 3σ от центральной линии, где σ – генеральное стандартное отклонение статистики. Границы $\pm 3\sigma$ указывают, что 99,7 % значений характеристики показателей концентрации бактериофагов бруцеллезных диагностических попадут в эти пределы при условии, что процесс находится в статистически управляемом состоянии.

На основе полученных результатов предложены биотехнологические схемы репродукции бактериофагов бруцеллезных диагностических (Tb, Wb, Fi, Bk2). При этом основополагающими технологическими моментами производства являются: репродукция бактериофагов Tb, Wb, Fi (рис. 3) осуществляется на бульонных культурах соответствующих вакцинных штаммов размножения с использованием питательных сред на основе дрожжевого гидролизата (бульон Альбими); размножение бруцеллезного

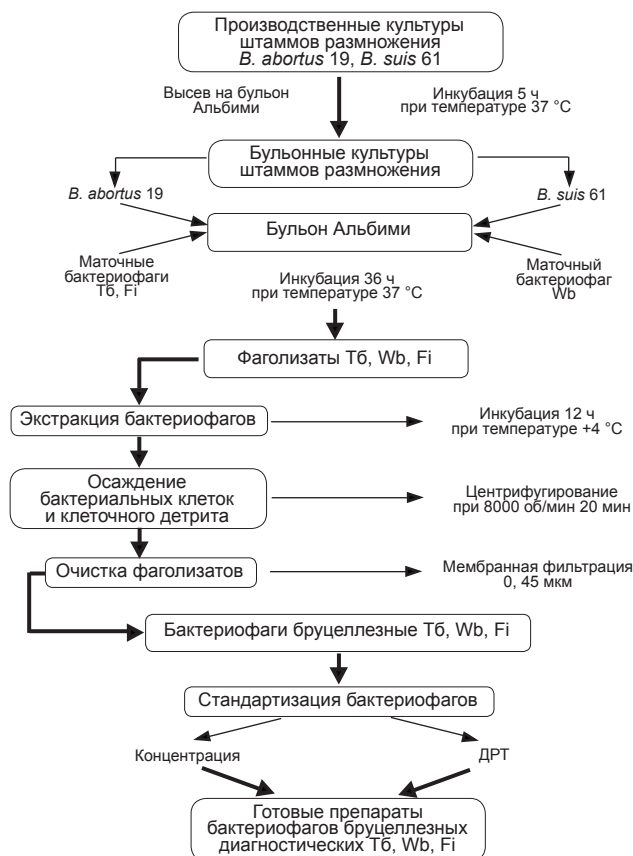


Рис. 3. Биотехнологическая схема получения бруцеллезных диагностических бактериофагов Tb, Wb, Fi

бактериофага Bk2 в технологической схеме производства предусматривает его репродукцию на вакцинном штамме в слое агаровой культуры с использованием агара Альбими.

Применение описанной технологии обеспечивает снижение риска биологической опасности производства за счет использования вакцинных штаммов бруцеллезного микроба в качестве штаммов размножения бактериофагов и снижение себестоимости готового препарата за счет использования в технологии производства сред немясного происхождения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамс М. Бактериофаги. М.: Иностранная литература; 1961. 528 с.
2. ГОСТ Р 50779.42-99. Статистические методы. Контрольные карты Шухарта. М.: ИПК Издательство стандартов, 1999. 32 с.
3. Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей: Методические указания (МУ 3.1.7.1189-03). М.; 2003. 59 с.
4. ФСП 42-8969-07. Бактериофаги бруцеллезные диагностические жидкие, раствор для диагностических целей. 11 с.
5. Corbel M.J., Thomas E.L. The Brucella-phage: their properties, characterization and applications. New Haw, Weybridge; 1980. 106 p.
6. Gratia A. Des relations numeriques entre bacteries lysogenes, et particules de bacteriophage. Ann. Inst. Pasteur. 1936; 57:652–67.
7. Report. Joint FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. Fifth Report. Wld. Hlth. Org. Techn. Rept. Ser. 1986. N 464. 65 p.

Об авторах:

Ляпустина Л.В., Омелянчук П.А., Лямкин Г.И., Вилинская С.В., Головнева С.И., Коготкова О.И., Будыка Д.А., Русанова Д.В., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru

L.V.Lyapustina, P.A.Omelyanchuk, G.I.Lyamkin, S.V.Vilinskaya,
S.I.Golovneva, O.I.Kogotkova, D.A.Budyka, D.V.Rusanova,
A.N.Kulichenko

**Mastering of Technology of Production
of Brucellosis Diagnostic Bacteriophages**

Stavropol Anti-Plague Research Institute

Presented are technologies of production of brucellosis diagnostic bacteriophages developed on the basis of determination of optimal conditions of the phages reproduction. Stability of the finished product was evaluated using

Shuhard control charts.

Key words: brucellosis bacteriophages, reproduction, statistical charts.

Authors:

*Lyapustina L.V., Omelyanchuk P.A., Lyamkin G.I., Vilinskaya S.V.,
Golovneva S.I., Kogotkova O.I., Budyka D.A., Rusanova D.V., Kulichenko
A.N.* Stavropol Anti-Plague Research Institute. 355035, Stavropol, Sovetskaya
St., 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru

Поступила 18.06.09.

И.В.Сергеева

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ОШИБКИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ФОРМЕ БРУЦЕЛЛЕЗА

*ГОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет
имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого Министерства здравоохранения и социального развития»*

Проанализированы 53 истории болезни пациентов с хроническим бруцеллезом за период 1994–2009 гг. Приведены примеры из анамнеза заболевания больных, обследованных в инфекционном отделении ГКБ № 6 Красноярск, которым диагноз бруцеллеза был поставлен несвоевременно. Анализируются причины диагностических ошибок при различных формах бруцеллеза.

Ключевые слова: хронический бруцеллез, диагностические ошибки.

Бруцеллез чаще всего регистрируется в странах и регионах с хорошо развитой животноводческой отраслью сельского хозяйства. Чаще всего заболевают лица молодого трудоспособного возраста, что наносит социально-экономический урон и является ещё одним аспектом актуальности этой проблемы. Бруцеллез – системная инфекция, в которую могут быть вовлечены любой орган или система организма [1, 2].

В России эндемичными по бруцеллезу районами являются Северный Кавказ, Дагестан, где ежегодно регистрируется 100 случаев на миллион населения, Тыва, Хакасия, Адыгея, Алтайский, Красноярский, Ставропольский края, Поволжье, Омская, Новосибирская, Ростовская области, а также районы, граничащие со странами Ближнего Востока. Ежегодно в Красноярском крае выявляется 4–5 новых случаев первично-хронического бруцеллеза, а на территории Хакасии и Тывы – по 2–3 случая острого бруцеллеза [3].

В связи с изменением клинической картины современного бруцеллеза, отличающегося стертой симптоматикой, правильный диагноз может быть установлен только на основании эпидемиологического анамнеза, клинического симптомокомплекса и лабораторных исследований.

Анализ 53 историй болезни за период с 1994 по 2009 год показал, что диагноз первично-хронического бруцеллеза до поступления в инфекционное отделение ГКБ № 6 Красноярск своевременно был поставлен только 29 больным (54,7 %). Чаще всего первичным диагнозом был ревматизм (у 7 пациентов – 13,2 %), пояснично-крестцовый радикулит (у 6 – 11,3 %), нейроинфекция (у 5 – 9,4 %), люмбаго (у 4 – 7,5 %), и у 2 (3,8 %) – полиартрит неясной этиологии. Ниже приведены примеры из анамнеза заболевания обследованных больных.

История болезни № 1. Больная А., 43 года. На протяжении пяти лет беспокоили боли в крупных суставах нижних конечностей и поясничном отделе позвоночника, потливость, субфебрильная температура. Неоднократно лечилась по поводу рев-

матизма амбулаторно, в стационаре и в санатории, после лечения наступало временное улучшение. Проконсультирована врачом-инфекционистом и обследована на бруцеллез. Серологические реакции Райта и Хеддльсона, а также аллергическая проба Бюрне были резко положительными, что подтвердило диагноз первично-хронического бруцеллеза. При сборе эпидемиологического анамнеза было выяснено, что больная работает в разделочном цеху Уярского мясокомбината.

История болезни № 2. Больная В., 39 лет. Заболела четыре года назад, когда появились боли в голеностопных и коленных суставах, повышенная потливость, субфебрильная температура. Диагностирован ревматический полиартрит, по поводу которого в течение трех месяцев лечилась в терапевтическом отделении без эффекта. Боли в суставах усиливались, появилась деформация голеностопных, коленных и лучезапястных суставов с резким ограничением движения в них. Больная была переведена на 2-ю группу инвалидности. Лишь через четыре года от начала заболевания проконсультирована инфекционистом ККБ № 1 Красноярск, который из эпидемиологического анамнеза выяснил, что больная систематически употребляла сырое молоко от домашней коровы, больной бруцеллезом. Обследование показало, что реакции Райта и Хеддльсона, а также проба Бюрне у больной резко положительные.

В данном случае ошибка в диагнозе явилась следствием пренебрежительного отношения врачей к эпидемиологическому анамнезу.

Сроки установления первично-хронического бруцеллеза оказываются запоздалыми так же, как и вторично-хронического. Так, в первые шесть месяцев болезни бруцеллез выявляется только у 25 % больных. В большинстве случаев запоздалая диагностика объясняется стертой клинической симптоматикой, на что указывает история болезни № 3.

Больной К., 41 год. Поступил в клинику с жалобами на боли в пояснице и спине, головные боли, раздражительность, быструю утомляемость. В 28 лет впервые стал отмечать незначительную периодиче-

скую болезненность в правом тазобедренном суставе и по ходу седалищного нерва, через два года стали беспокоить боли в плечевых суставах. Было назначено физиолечение, но без улучшения. С 32 лет боли в плечевых суставах усилились, появились боли в позвоночнике, что больной связывал с повышенной физической нагрузкой. Был обследован на бруцеллез, так как проживает в сельской местности: реакции Райта и Хеддльсона и проба Бюрне слабо положительные. После безуспешной терапии антибиотиками тетрациклинового ряда с диагнозом бруцеллеза направлен на санаторно-курортное лечение. Так как по возвращению серологическое обследование дало отрицательный результат, диагноз был снят. Через пять лет боли в суставах и позвоночнике обострились. Травматолог поставил диагноз «анкилозирующий спондилоартрит, статическая недостаточность позвоночника», назначено лечение вытяжением, которое не дало улучшения. При повторной консультации врача-инфекциониста установлено, что появлению болей в суставах и позвоночнике предшествовало употребление сырого молока от больной бруцеллезом коровы. Госпитализирован в инфекционное отделение ГKB № 6 Красноярск. При обследовании выявлены положительные результаты реакций Райта и Хеддльсона и пробы Бюрне, а также рентгенографические данные остеохондроза позвоночника, предположительно бруцеллезной этиологии. Диагноз при выписке – первично-хронический бруцеллез с преимущественным поражением опорно-двигательного аппарата, стадия субкомпенсации.

Следует отметить, что в диагностике бруцеллеза ведущая роль принадлежит врачам поликлинической службы. В связи с полиморфизмом клинических проявлений бруцеллеза больные обращаются к врачам различных специальностей. Это подтверждает и анализ данных статистики: диагноз хронического бруцеллеза впервые установлен терапевтами (65,7 %), неврологами (18 %), хирургами (3,3 %), врачами других специальностей (8 %), инфекционистами – только в 5 % случаев, что связано с запоздалой диагностикой бруцеллеза врачами общей практики.

Причиной диагностических ошибок является недооценка симптомокомплекса клинических проявлений бруцеллеза в зависимости от формы заболевания.

В ряде случаев не учитывается эпидемиологический анамнез, который в значительной мере способствует своевременной диагностике. Недостаточно используются специфические лабораторные методы исследования. Чаще всего диагностические ошибки являются следствием недостаточного знакомства врачей с особенностями клиники современного бруцеллеза, слабой настороженностью их в отношении этой инфекции, а также результатом некачественной оценки лабораторных данных без учета их зависимости от клинической формы. В диагностике современного бруцеллеза необходимо учитывать значительное преобладание хронических форм в сравнении с остросептической, а потому и в дифференциальной диагностике в первую очередь следует учитывать поражение периферической и центральной нервной системы, суставов и различные хронические заболевания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Покровский В.И., Пак С.Г. Инфекционные болезни и эпидемиология. М.: ГЭОТАР-Мед; 2004. 816 с.
2. Шувалова Е.П. Инфекционные болезни. М.; 2005. 836 с.
3. Шульдякова А.А., Романцова М.Г. Бруцеллез. Современные подходы к терапии: Пособие для врачей. Саратов-СПб.; 2006. 28 с.

Об авторах:

Сергеева И.В. Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого. 660100, Красноярск, ул. Кравченко, 2–275. E-mail: infecia7979@mail.ru

I.V.Sergeeva

Diagnostic Mistakes as Regards Chronic Form of Brucellosis

Voino-Yasenetchkiy State Medical Institute, Krasnoyarsk

Analyzed were case records of patients with chronic brucellosis for the period of 1994–2009. Presented are the examples from the disease anamnesis of the patients examined in the infectious unit of Krasnoyarsk municipal hospital, with diagnosis of brucellosis established not in time. The reasons of diagnostic mistakes in various forms of brucellosis are considered.

Key words: chronic brucellosis, diagnostic mistakes.

Authors:

Sergeeva I.V. Voino-Yasenetchkiy State Medical Institute. 660100, Krasnoyarsk, Kravchenko St., 2–275. E-mail: infecia7979@mail.ru

Поступила 09.04.09.

IX МОСКОВСКИЙ МЕЖДУНАРОДНЫЙ САЛОН ИННОВАЦИЙ И ИНВЕСТИЦИЙ



С 26 по 29 августа 2009 г. во Всероссийском выставочном центре (Москва) прошел IX Московский международный салон инноваций и инвестиций, организованный Министерством образования и науки Российской Федерации, Федеральным агентством по науке и инновациям, Федеральным агентством по образованию и Правительством города Москвы. Московский международный салон инноваций и инвестиций – крупнейший в России научно-технический форум разработчиков и производителей высокотехнологичной продукции, а также инвесторов, заинтересованных в инновационных проектах.

В IX Салоне приняли участие около 700 экспонентов из 46 регионов Российской Федерации и 15 зарубежных стран. Среди участников – научно-исследовательские центры и промышленные предприятия, ВУЗы, технопарки, предприятия малого и среднего бизнеса российских регионов, наукограды, центры международного научно-технического и инновационного сотрудничества.

Мероприятия деловой части Салона были объединены общей тематикой «Национальные приоритеты развития России: образование, наука, инновации», связанной с реализацией одного из важнейших направлений государственной политики в инновационной сфере – повышения эффективности использования результатов научно-технической деятельности и их четкой ориентации на производство конкурентоспособного инновационного продукта. Программные мероприятия были объединены общей задачей при-

влечения инвестиций в научно-технологическую сферу, технологического перевооружения производства, развития рынка объектов интеллектуальной собственности, совершенствования патентной и лицензионной деятельности, объединения интересов изобретателей, разработчиков и производителей высокотехнологичной продукции и представителей промышленного и финансового бизнеса из регионов России, стран ближнего и дальнего зарубежья.

На Салоне было представлено более 1500 инновационных разработок по различным направлениям сфер деятельности: атомная и ядерная физика; безопасность, защита и спасение человека; биотехнология и биоинженерия; защита окружающей среды; информационные технологии; машиностроение; медицина и здравоохранение; металлургия; метрология; нанотехнологии и новые материалы; оптика и лазерная техника; приборостроение и робототехника; сельское хозяйство; пищевая и химическая промышленность; системы связи; транспорт; электроника; энергетика и электротехника.

В рамках Салона был проведен Конкурс инновационных разработок и изобретений, цель которого – выявление перспективных научных направлений и определение готовых к практическому использованию в реальном секторе экономики инновационных изобретений и разработок, награждение лучших и содействие их продвижению на рынок. ФГБУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора представил на конкурс инновационную разработку «Набор для

детекции и определения биотипа, серогруппы и токсигенности возбудителя холеры методом мультилокусной ПЦР» (Осина Н.А., Бугоркова Т.В., Коннова С.С., Куклев В.Е., Кутырев В.В.). Отличительной особенностью тест-системы является использование трех генов в качестве ДНК-мишеней, что позволяет одновременно с выявлением холерных вибрионов определить их серогруппу, биовар и эпидемическую значимость. Комплектация набора включает необходимые ингредиенты для проведения всех этапов ПЦР-анализа: подготовки проб, проведения ПЦР, учета результатов амплификации. Набор прост в использовании и имеет сниженные требования к ор-

ганизации холодовой цепи при транспортировке. Набор соответствует требованиям, предъявляемым к современным генодиагностическим препаратам: чувствительность не менее 1000 м.к./мл, специфичность 100 %, воспроизводимость 100%. Набор защищен патентом РФ № 2360972 (10.07.2009) и ранее удостоен Диплома Роспатента на XII Международном Салоне «Архимед» (2009 г.).

По решению Международного жюри разработка ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб» «Набор для детекции и определения биотипа, серогруппы и токсигенности возбудителя холеры методом мультилокусной ПЦР» была награждена золотой медалью и Дипломом.

ЮБИЛЕИ

К 80-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ПАВЛА ИВАНОВИЧА АНИСИМОВА



Доктору медицинских наук, профессору, Заслуженному деятелю науки Российской Федерации Павлу Ивановичу Анисимову 5 июля 2009 года исполнилось 80 лет.

Окончив Саратовский государственный медицинский институт, Павел Иванович основную часть своей большой жизни посвятил научной и организаторской деятельности. Он

прошел все этапы профессионального становления от врача-бактериолога Небит-Дагского противочумного отделения Туркменской ПЧС до доктора медицинских наук, профессора, директора Всесоюзного научно-исследовательского противочумного института «Микроб» Минздрава СССР.

Анисимов П.И. – известный ученый, один из основоположников генетики возбудителей особо опасных инфекций в нашей стране, признанный эксперт в области микробиологии и эпидемиологии. Под руководством Анисимова П.И. еще в 80-х годах был выполнен цикл работ, которые внесли существенный вклад в фундаментальные исследования чумного микроба и возбудителей других особо опасных инфекционных болезней. Методы генетического анализа, молекулярной биологии, биофизики, геномной инженерии позволили проводить большую консультативную и методическую работу. На основе проведенных исследований в практику противоэпидемической работы были внедрены многие эффективные диагностические и профилактические препараты.

Анисимов П.И. вел широкую научно-исследовательскую работу, сочетая ее с решением практических

задач. Он активно участвовал в разработке стратегии и тактики эпидемиологического надзора за чумой в ее природных очагах, вопросов организации санитарно-эпидемиологической службы.

Круг научных интересов Павла Ивановича широк. Он – автор около 200 научных работ и 10 изобретений, многих научно-методических документов союзного уровня, один из авторов «Руководства по профилактике чумы», которое стало для чумологов страны настольной книгой. Большое внимание Он уделял подготовке научных кадров. Под его руководством защищены 35 кандидатских и 9 докторских диссертаций. Сегодня многие ученики Павла Ивановича стали маститыми учеными, занимают руководящие посты в научно-исследовательских противочумных институтах нашей страны.

Много времени и сил Павел Иванович отдавал научно-общественной деятельности: был председателем и заместителем председателя двух специализированных советов по защите докторских диссертаций, ответственным редактором сборников трудов противочумных учреждений, членом межотраслевого совета при Министерстве здравоохранения СССР, депутатом Кировского районного Совета народных депутатов.

Анисимов П.И. за заслуги перед медицинской наукой и здравоохранением отмечен высокими государственными наградами – орденами «Трудового Красного Знамени» и «Знак Почета», двумя медалями; знаком «Отличник здравоохранения», бронзовой медалью ВДНХ, значком «Изобретатель СССР», присвоено почетное звание «Заслуженный деятель науки».

Редакционная коллегия журнала сердечно поздравляет Павла Ивановича Анисимова с юбилеем и желает ему доброго здоровья, долгой и счастливой жизни.