

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 102

4 · 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.Караваевой
А.Ю.Мощиной

Подписано в печать 01.12.09

Формат 60×88 1/8

Бумага офсетная

Печать офсетная

Усл. печ. л. 9,2

Гарнитура Таймс

Заказ 1197

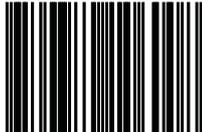
Подписной индекс – 24687

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

ISSN 0370-1069. Пробл. особо
опасных инф. 2009. Вып. 102. 1–74

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

В.В.Алексеев, докт. мед. наук, профессор (Волгоград),
В.Е.Безсмертный, канд. мед. наук (Москва),
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 ВИНИТИ.
Сведения о журнале ежегодно публикуются в международной
справочной системе по периодическим и продолжающимся
изданиям «Ulrich's Periodicals Directory»*

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

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

**Problemy
osobo opasnyh infekcij**

ISSN 0370-1069

**Problems
of Particularly Dangerous Infections**

Обзоры

- Попов Ю.А., Ерошенко Г.А., Булгакова Е.Г., Смирнова Н.И.** Разработка комплексного алгоритма генотипирования и методов оценки генетического разнообразия природных штаммов возбудителей чумы и холеры 5
- Уткин Д.В., Осина Н.А., Куклев В.Е., Ерохин П.С., Щербакова С.А., Кутырев В.В.** Биосенсоры: современное состояние и перспективы применения в лабораторной диагностике особо опасных инфекционных болезней 11

Эпидемиология, биобезопасность

- Гурина И.Н.** Эпизоотическая обстановка по бешенству в Республике Мордовия в 2006–2008 гг. 15
- Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Осипов В.П., Князева Т.В., Поршаков А.М., Попов Н.В., Куклев Е.В., Щербакова С.А., Топорков В.П.** Принципы организации эпизоотологического мониторинга сочетанных природных очагов чумы и других опасных инфекционных болезней в регионе Нижнего Поволжья 17
- Пчелинцева М.В., Ляпин М.Н.** Нормативное обеспечение биобезопасности функционирования специализированных противоэпидемических бригад 21
- Ростовцев М.Г., Кол Н.А., Чульдун А.Ф., Калущ Ю.А.** Результативность выявления эпизоотий чумы при исследовании различного полевого материала в Тувинском природном очаге (Каргинский мезоочаг) 32
- Спиридонов В.А., Андрус В.Н., Елизаров В.В.** Эффективность некоторых дезинфицирующих средств при обеззараживании поверхностей и изделий медицинского назначения, контаминированных потенциально опасными биологическими агентами бактериальной природы категории А 37
- Турцева М.А., Кресова У.А., Матросов А.Н., Чекашов В.Н., Поршаков А.М., Яковлев С.А., Шарова И.Н., Красовская Т.Ю., Кузнецов А.А., Князева Т.В., Мокроусова Т.В., Щербакова С.А., Котоманова В.Г., Сантылова О.А.** Новые данные о распространении иксодовых клещей и переносимых ими возбудителей природно-очаговых инфекций в Саратовской области 40
- Шарова И.Н., Карнаухов И.Г., Казакова Е.С., Щербаков Д.А., Пчелинцева М.В., Чекашов В.Н., Поршаков А.М., Глазков А.Н., Щербакова С.А., Топорков А.В., Кутырев В.В.** Разработка мобильной лаборатории индикации для осуществления эпизоотологического мониторинга природно-очаговых и других опасных инфекционных болезней 45

Review

Popov Yu.A., Eroshenko G.A., Bulgakova E.G., Smirnova N.I. Development of Complex Genotyping Algorithm and Methods of Evaluation of the Genetic Diversity of Plague and Cholera Agents Natural Strains

Utkin D.V., Ossina N.A., Kouklev V.E., Erokhin P.S., Scherbakova S.A., Kutyrev V.V. Biosensors: Current State and Prospects of Applying in Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases

Epidemiology, Biosafety

Gurina I.N. Rabies Epizootic Situation in the Republic of Mordovia in 2006–2008

Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Ossipov V.P., Knyazeva T.V., Porshakov A.M., Popov N.V., Kouklev E.V., Scherbakova S.A., Toporkov V.P. Principles of Management of the Epizootologic Monitoring of Combined Natural Foci of Plague and Other Dangerous Infectious Diseases in the Lower-Volga Region

Pchelintseva M.V., Lyapin M.N. Normative Provision of Biosafety of the Specialized Anti-Epidemic Teams Functioning

Rostovtsev M.G., Kol N.A., Chouldun A.F., Kalush Ju.A. Effectiveness of Plague Epizootics Detection upon Investigation of Different Field Material in Tuvinian Natural Focus (Karginisk Mesofocus)

Spiridonov V.A., Andrus V.N., Elizarov V.V. The Efficiency of Some Disinfectants in Decontamination of Surfaces and Items of Medical Purpose Contaminated with Potentially Dangerous Biological Agents of Bacterial Nature of A Category

Turtseva M.A., Kresova U.A., Matrosov A.N., Chekashov V.N., Porshakov A.M., Yakovlev S.A., Sharova I.N., Krasovskaya T.Yu., Kuznetsov A.A., Knyazeva T.V., Mokrousova T.V., Scherbakova S.A., Kotomanova V.G., Santylova O.A. The New Data on Distribution of Ixodic Ticks and Agents of Natural-Focal Infections Transferred by Them in Saratov Region

Sharova I.N., Karnaukhov I.G., Kazakova E.S., Scherbakov D.A., Pchelintseva M.V., Chekashov V.N., Porshakov A.M., Glazkov A.N., Scherbakova S.A., Toporkov A.V., Kutyrev V.V. Development of Mobile Indication Laboratory for Carrying out the Epizootiological Monitoring of Natural-Focal and Other Dangerous Infectious Diseases

Микробиология, иммунология, патогенез		Microbiology, Immunology, Pathogenesis	
Борздов А.А., Ефременко В.И., Борздова И.Ю., Логвиненко О.В., Бондаренко А.И. Изучение некоторых иммунологических показателей крови экспериментальных животных при различных путях введения им интактных липосом	49	Borzdov A.A., Efremenko V.I., Borzdova I.Yu., Logvinenko O.V., Bondarenko A.I. Analysis of Some Immunological Blood Indices of Experimental Animals when Administering Them Intact Liposomes in Different Ways	
Куклева Л.М., Ерошенко Г.А. Межклеточная коммуникация <i>quorum sensing</i> у патогенных бактерий рода <i>Yersinia</i>	54	Koukleva L.M., Eroshenko G.A. Intercellular Communication <i>Quorum Sensing</i> in Pathogenic Bacteria of the Genus <i>Yersinia</i>	
Диагностика, биотехнология		Diagnostics, Biotechnology	
Домотенко Л.В., Подкопаев Я.В., Храмов М.В., Дятлов И.А. Питательные среды для диагностики чумы	60	Domotenko L.V., Podkopaev Ya.V., Khramov M.V., Dyatlov I.A. Nutrient Media for Plague Diagnostics	
Лапин А.А., Павлов В.М., Мокриевич А.Н., Домотенко Л.В., Храмов М.В. Простая жидкая питательная среда для молекулярно-генетических исследований <i>Francisella tularensis</i>	66	Lapin A.A., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Domotenko L.V., Khramov M.V. Simple Liquid Nutrient Medium for Molecular Genetic Investigations of <i>Francisella tularensis</i>	
Будыка Д.А., Абзаева Н.В., Иванова Г.Ф., Гостищева С.Е., Фисун А.А., Ляпустина Л.В. Сравнительный анализ экспериментальных серий вакцины чумной живой по показателям жизнеспособности и термостабильности	68	Budyka D.A., Abzaeva N.V., Ivanova G.F., Gostischeva S.E., Fissun A.A., Lyapustina L.V. Comparative Analysis of Experimental Series of Plague Live Vaccine as for Viability and Thermostability Indices	
Юбилейные даты		Jubilee Dates	
75 лет Противочумному центру Роспотребнадзора	72	To the 75-th Anniversary of Plague Control Center of Rospotrebnadzor	
<i>Правила для авторов</i>	74	<i>Instruction to Authors</i>	

Ю.А.Попов, Г.А.Ерошенко, Е.Г.Булгакова, Н.И.Смирнова

**РАЗРАБОТКА КОМПЛЕКСНОГО АЛГОРИТМА ГЕНОТИПИРОВАНИЯ И МЕТОДОВ
ОЦЕНКИ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЧУМЫ И ХОЛЕРЫ**

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

В обзоре обобщены и проанализированы данные литературы по использованию молекулярно-генетических методов для оценки генетического разнообразия штаммов возбудителей чумы и холеры. Предложен алгоритм генодиагностического анализа штаммов *Yersinia pestis* и *Vibrio cholerae*.

Ключевые слова: возбудители чумы и холеры, генетическое разнообразие, алгоритм генотипирования.

Большинство существующих методов индикации, идентификации, дифференциации, типирования микроорганизмов, в том числе патогенных бактерий, основано на определении различных фенотипических свойств. Однако нестабильность фенотипа (в частности, зависимость экспрессии генов от условий роста, мутационная утрата свойства) затрудняет интерпретацию получаемых результатов. Это вызывает необходимость разработки приемов молекулярной диагностики, основанной на анализе структуры генома, отличающегося большей консервативностью по сравнению с фенотипическими свойствами.

В настоящее время разработано множество молекулярно-генетических технологий и методов генодиагностического анализа, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки, которые могут быть устранены при комплексном подходе с использованием наиболее эффективных способов.

Целью данной работы был анализ данных литературы, посвященных применению методов молекулярной генетики для типирования, дифференциации и изучения генетического полиморфизма штаммов чумы и холеры, определение эффективности использования разных методов и разработка комплексного алгоритма оценки генетического разнообразия природных изолятов этих патогенов.

Возбудители чумы и холеры вызывают особо опасные инфекционные заболевания, представляющие серьезную проблему здравоохранения. Кроме того, существует реальная угроза их применения в качестве агентов биотерроризма.

Чума – природно-очаговая инфекционная болезнь с трансмиссивным механизмом передачи возбудителя. По данным ВОЗ, в мире ежегодно регистрируется более 2000 случаев заболеваний человека чумой [58].

Геном возбудителя чумы состоит из хромосомы размером 4,65 млн п.н. и трех неконъюгативных плазмид – pCad (70,3 т.п.н.), pFra (96,2 т.п.н.) и pPst (9,6 т.п.н.). Плазмида кальцийзависимости pCad (синонимы pYV, pCD) родоспецифична и присутствует в клетках менее патогенных иерсиний – *Y. pseudotu-*

berculosis и *Y. enterocolitica*. Наличие этой плазмиды обязательно для вирулентности *Y. pestis*. Две другие плазмиды – pFra (pMT1) и pPst (pPla, pPCP1) видоспецифичны. Первая из них кодирует синтез капсульного антигена и «мышинного» токсина, а вторая – продукцию бактериоцина пестицина и активатора плазминогена [11].

По данным многих авторов, даже среди изолятов из одного природного очага чумы наблюдается генетическая и фенотипическая изменчивость, в том числе различия по составу и структуре плазмид [1, 18, 27]. Их размеры варьируют, что может быть результатом мутаций (делеций, вставок), мультимеризации или рекомбинаций. Чаще всего мультимеры образует плазмида pPst. Размеры плазмиды pCad меняются от 65 до 75 т.п.н. Изменчивы размеры и плазмиды pFra – от 60 до 80–90 т.п.н. [27]. Кроме того у штаммов чумного микроба из разных природных очагов выявляются дополнительные плазмиды.

Хромосома *Y. pestis* содержит большое количество псевдогенов, представляющих собой остатки генов, которые функционально активны у возбудителя псевдотуберкулеза. Структура этих генов нарушена внедрениями различных IS элементов (IS100, IS285, IS1541 и др.), делециями, вставками, точечными мутациями [15]. В геноме возбудителя чумы присутствуют участки, содержащие варибельные tandemные повторы различной протяженности [47]. Наличие перечисленных особенностей генома и обуславливает фенотипическое и генетическое разнообразие штаммов *Y. pestis*.

Согласно распространенной классификации чумного микроба, предложенной R.Devignat (1951), штаммы *Y. pestis*, на основании биохимических различий (способности к ферментации глицерина, редукции нитратов и окислению аммиака) и по историко-географическому происхождению, разделены на три биовара: *antiqua* (античный), *medievalis* (средневековый) и *orientalis* (восточный). Изоляты античного биовара наиболее активны по экспрессии дифференциальных биохимических признаков: они ферментируют глицерин и обладают денитрифи-

цирующей активностью. Штаммы средневекового биовара не редуцируют нитраты, но ферментируют глицерин и арабинозу, восточного – не способны ферментировать глицерин, но активно редуцируют нитраты. Штаммы предложенного недавно биовара *microtus*, циркулирующие в природных очагах полевочьего типа на территории Китая, в отличие от штаммов античного, средневекового и восточного биоваров, арабинозонегативны, но утилизируют рамнозу и мелибиозу.

В соответствии с классификацией, принятой в 1985 г. на Всесоюзном совещании по таксономии чумного микроба, которая основана на фенотипических свойствах, вирулентности по отношению к лабораторным животным и ландшафтно-географической приуроченности, штаммы *Y. pestis* делят на пять подвидов – основной и 4 неосновных (кавказский, алтайский, гиссарский и улегейский). Как правило, штаммы основного подвида высоковирулентны и имеют большой эпидемический потенциал. Они не ферментируют рамнозу и мелибиозу, не чувствительны к пестицину, вирулентны для лабораторных животных. По фенотипическим характеристикам штаммы основного подвида включают три классических биовара: *antiqua*, *medievalis*, *orientalis*. Штаммы неосновных подвигов ферментируют рамнозу и мелибиозу, избирательно вирулентны для лабораторных животных, эпидемически малозначимы.

Существующие фенотипические схемы классификации, базирующиеся на морфологических, культуральных, биохимических, серологических и других свойствах не утратили своего значения и в настоящее время, однако достигнутые в последнее время успехи генетики и молекулярной микробиологии позволяют перевести решение задач по систематике *Y. pestis* на новый уровень, основанный на использовании молекулярно-генетических особенностей возбудителя. Перевод классификации чумного микроба на генетическую основу повысит надежность, достоверность и качество систематизации, благодаря отсутствию присущих классическим схемам недостатков, обусловленных изменчивостью фенотипических свойств.

Холера – антропонозная инфекционная болезнь с фекально-оральным механизмом передачи возбудителя. Распространение холеры во многих странах определяет реальную возможность ее завоза на территорию России.

Согласно современным представлениям, в пределах вида *Vibrio cholerae*, образовались три эпидемически опасных варианта: вибрионы O1-серогруппы классического биовара, вызвавшие, видимо, первые 6 пандемий азиатской холеры (1817–1923 гг.), вибрионы O1-серогруппы биовара эльтор – возбудители 7-й пандемии (с 1961 г. по настоящее время) и появившийся в 1992 г. высоковирулентный штамм *V. cholerae* O139-серогруппы, с которым связывали начало 8-й пандемии холеры [10, 43].

Поскольку в современный период продолжа-

ется 7-я пандемия холеры, *V. cholerae* биовара эльтор, остается в центре внимания исследователей. Секвенирование его генома позволило выявить следующие особенности.

1. Этот патоген имеет две кольцевые хромосомы, различающиеся по размеру (2,96 и 1,07 млн п.н.) и кодируемым продуктам [32].

2. Значительная часть генов вирулентности входит в состав мигрирующих генетических элементов (профаги CTXφ и RS1φ, острова патогенности VPI-1 и VPI-2, острова пандемичности VSP-1 и VSP-2, остров персистенции EPI и остров кодирующий O-антиген). Они локализованы на большой хромосоме и отличаются по ГЦ-составу от остальной части генома [25, 32].

3. Многие гены малой хромосомы входят в состав интегронного острова протяженностью 126 т.п.н., содержащего 179 генных кассет, из которых лишь немногие связаны с вирулентностью или резистентностью к антибиотикам.

Мобильность генетических элементов и обусловленная этим нестабильность геномов, а также изменение экологии и иммунного статуса человека во многих регионах мира, включая Россию, создают предпосылки для образования штаммов с новыми ранее неизвестными свойствами. Такая ситуация определяет актуальность выяснения генетического разнообразия природных штаммов для оценки основных направлений эволюции возбудителя холеры эльтор в современный период, что необходимо для прогнозирования эпидситуации.

Для исследования природного разнообразия штаммов возбудителей чумы и холеры используются различные молекулярно-генетические технологии: мультилокусное секвенирование, мультилокусный анализ вариабельного числа tandemных повторов, анализ полиморфизма длин рестриционных фрагментов и его варианты – риботипирование, IS-типирование, макрорестриционный анализ, различные виды полимеразной цепной реакции, оценки плазмидного состава [44, 53].

Метод определения плазмидного профиля штаммов достаточно прост и эффективен для мониторинга патогенных микроорганизмов, однако его применение возможно только в отношении плазмидосодержащих видов и штаммов. Исследования показали, что как типизирующий критерий плазмидный профиль может использоваться только в отношении штаммов кавказского подвида.

Параллельно с плазмидным анализом используют методы, основанные на идентификации более стабильных генетических последовательностей. Удачным генетическим маркером для видовой и подвидовой классификации является полиморфизм длин рестриционных фрагментов высококонсервативной ДНК, кодирующей рибосомальную РНК. В настоящее время описано более 20 риботипов чумного микроба, которые авторы соотносят с различными биоварами [30, 31]. Однако штаммы чумного микро-

ба неосновных подвидов этим методом не дифференцируются [7].

Метод IS-типирования широко применяется для сравнения штаммов чумного микроба разного географического происхождения и выяснения их филогенетических связей [2, 5, 16]. Типирование ДНК-зондом на основе IS100 позволило А.Г.Боброву и А.А.Филиппову (1997) построить филогенетическое дерево, три ветви которого представляют биовары возбудителя чумы: *orientalis*, *antiqua* и *medievalis* [2]. Е.П.Савостина и соавт. выявили корреляцию полученных при помощи ДНК-зонда ВХ фингерпринтов штаммов *Y. pestis* с определенным видом носителя и разделили по этому принципу все штаммы на семь генетических вариантов [9]. М.Аchtman *et al.* выяснили геномный полиморфизм 49 штаммов *Y. pestis* трех биоваров генным зондированием с 255 т.п.н.-фрагментом IS100-элемента в качестве зонда [16]. А. Leclercq *et al.* [37], G.Torrea *et al.* [55] успешно применили комбинацию трех IS-RFLP (IS100, IS285, IS1541) для дискриминации штаммов *Y. pestis* и одновременно их кластеризации по биоварам и географическому положению [37, 55]. К недостаткам этой модификации метода генетического зондирования следует отнести то, что мобильные элементы придают нестабильность геному чумного микроба, следствием которой могут быть вариации фингерпринтов одних и тех же штаммов.

Одним из вариантов молекулярного типирования является оценка числа вариабельных tandemных повторов (VNTR-анализ) – монотонно повторяющихся нуклеотидных последовательностей произвольного состава, которые могут быть использованы для определения степени родства отдельных штаммов и групп штаммов. Данный метод успешно применяется для типирования чумного микроба [34]. Возможно его применение для эпидемиологического мониторинга [17]. Показана высокая дискриминирующая способность VNTR-тестирования для установления источника происхождения штаммов чумного микроба [1, 3, 9, 12, 13, 40]. Метод позволяет определять филогенетическое родство штаммов из разных регионов, принадлежащих к одному биовару [33, 47]. В настоящее время разрабатываются различные модификации мультилокусного VNTR-анализа (MLVA) с использованием новых локусов и способов регистрации результатов [22].

Наибольшей простотой и доступностью среди методов генотипирования отличается полимеразная цепная реакция (ПЦР). Существуют множество модификаций метода (REP, ERIC, RAPD и др.), но принцип ПЦР един – многократная амплификация различных коротких последовательностей ДНК, присутствующих в геноме бактерий. В качестве примера: с помощью пяти «произвольных» праймеров методом RAPD-ПЦР S.Shivaji *et al.* дифференцировали штаммы чумного микроба, выделенные от больных людей и из других источников [52]. Полученные результаты коррелировали с данными риботипирова-

ния [31].

Наиболее информативным методом молекулярного типирования является мультилокусное секвенирование (MLST), при этом в качестве ДНК-мишеней используются гены жизнеобеспечения. Две MLST системы разработали для дифференциации патогенных иерсиний М.Аchtman *et al.*, М.Кotetishvili *et al.* – для других представителей рода *Yersinia* [16, 35]. Т.Revazishvili *et al.* провели сравнение MLST-профилей, основанных на анализе структуры генов жизнеобеспечения и патогенности штаммов, выделенных на территории США и Грузии [50]. Вариантом MLST является метод выявления единичного нуклеотидного полиморфизма. Компьютерное сравнение геномов штаммов *Y. pestis* CO92 и FP1 обнаружило 32 единичные нуклеотидные замены. В коллекции из 24 штаммов чумного микроба, выделенных в Северной Америке, при скринировании единичных замен нуклеотидов выделено семь генотипов [56]. С.Pourcel *et al.* и G.Vergnaud *et al.* применили метод анализа кластеризованных регулярно-расположенных в межгенных пространствах коротких палиндромных последовательностей для изучения геномного полиморфизма штаммов *Y. pestis* [47, 57]. Y.Cui *et al.* использовали его для типирования 125 штаммов возбудителя чумы, выделенных на энзоотических территориях Китая, Монголии и бывшего Советского Союза [23].

Анализ изложенных материалов позволяет сделать следующие предложения по формированию комплексного алгоритма генодиагностического анализа штаммов *Y. pestis*. Определение видовой принадлежности штамма (дифференциация чумного микроба от близкородственных иерсиний) проведением моно- и мультилокусных ПЦР и плазмидного скрининга; определение распространенности генов, ассоциированных с вирулентностью возбудителя с помощью моно- и мультилокусных ПЦР; определение параметров изменчивости генов вирулентности у штаммов *Y. pestis* различного происхождения методом секвенирования; определение принадлежности штаммов к конкретному подвиду, биовару, природному очагу посредством моно- и мультилокусных ПЦР, мультилокусного VNTR-анализа и секвенирования генов, кодирующих дифференциальные признаки.

Исследование выделенного изолята последовательно по четырем ступеням позволит: идентифицировать его видовой и подвидовой статус; определить наличие генов вирулентности и степень их полиморфизма, принадлежность штамма к конкретному биовару, природному очагу, а также оценить наличие филогенетических связей с другими штаммами *Y. pestis*.

Центральными проблемами ретроспективного и оперативного эпидемиологического анализа холеры остаются выявление генетических связей между штаммами холерного вибриона со сходными фенотипическими свойствами и разным эпидемическим потенциалом, а также расшифровка механизма фор-

мирования патогенных клонов с новыми свойствами. Для решения этих проблем используют методы молекулярного типирования. В геноме *V. cholerae* присутствует несколько копий *rrn* оперона, кодирующих рРНК. Рекомбинации, происходящие между *rrn* оперонами, лежат в основе вариативности риботипов холерных вибрионов. По результатам риботипирования был сделан вывод, что *V. cholerae* классического биовара, вызвавший шестую пандемию холеры, отличается по структуре генома от возбудителя седьмой пандемии. Вибрионы двух биоваров произошли от разных авирулентных штаммов, обитающих во внешней среде, которые независимо друг от друга в процессе горизонтального переноса генов получили гены O1-антигена, а также умеренные фаги СТХф и VPI с ключевыми генами вирулентности [19, 32]. Несмотря на то, что этот метод характеризуется умеренной разрешающей способностью [14], он широко используется для типирования штаммов *V. cholerae*, выделенных из различных географических регионов и обладающих разным эпидемическим потенциалом [24, 49]. Так, по данным риботипирования с зондом на 16S рРНК, установлено, что клинические штаммы *V. cholerae* O139, возникшие в Индии и Бангладеш (1992–1993 гг.), и авирулентные *V. cholerae* O139, появившиеся в воде открытых водоемов России с 1993 г., не имеют генетического родства и последние не могут служить резервуаром для формирования эпидемически опасной популяции возбудителя O139 серогруппы [6]. Таким образом, обладая высокой воспроизводимостью и легко интерпретируемыми результатами, позволяющими объединять тестируемые штаммы в группы (риботипы), этот метод может быть использован при определении степени родства штаммов *V. cholerae*, выделенных на географически удаленных территориях [24, 36].

Сравнительно недавно для генотипирования холерного вибриона стали использовать в качестве зондов мобильные генетические элементы. В 2002 г. M.Li *et al.* с помощью RFLP-анализа полиморфных длин рестрикционных фрагментов большой и малой хромосом, расщепленных эндонуклеазой *SphI*, и фингерпринтинга на основе IS1004-элемента исследовали 300 штаммов *V. cholerae* не O1 было обнаружено четыре изолята неэпидемических серогрупп, имеющих сходные с классическими и эльтор холерными вибрионами фингерпринты, геномы которых, по данным секвенирования и ПЦР-анализа, содержали основные «блоки вирулентности» (СТХф и VPI) различного происхождения. Полученные данные позволили сделать предположение о возможности возникновения эпидемических вспышек холеры, вызванных вибрионами не O1/не O139, обладающих патогенным потенциалом [39].

Результаты исследований метода электрофореза в пульсирующем поле (PFGE) показали его высокую разрешающую способность и его преимущество по сравнению с другими генотипическими методами [21, 28], поскольку он позволяет выяснять географи-

ческое происхождение штамма. Тем не менее, несмотря на явные достоинства, этот метод пока не нашел широкого применения в практике отечественного здравоохранения не только из-за высокой стоимости оборудования и сложности исследования.

Одними из наиболее простых методов типирования *V. cholerae* являются методы, основанные на ПЦР с использованием различных олигонуклеотидных праймеров, ориентированных как на конкретные ДНК-мишени (REP-ПЦР, ERIC-ПЦР, ISSR-ПЦР), так и на случайные участки ДНК (RAPD-ПЦР). В 1995 г. I.G.Rivera *et al.* впервые применили ERIC-ПЦР для изучения генетических связей между штаммами холерных вибрионов, показав, что токсигенные вибрионы эльтор и *V. cholerae* O139 серогруппы, выделенные от больных и из воды открытых водоемов в разные годы, имели один вариант распределения ПЦР-фрагментов, отличающийся от молекулярного «типа» авирулентных вибрионов O1 серогруппы. Между тем, у 36 изученных нетоксигенных штаммов *V. cholerae* не O1/не O139 выявлено 15 различных ERIC-профилей [51]. Аналогичные результаты получены при ПЦР-типировании клинических и «водных» штаммов *V. cholerae* 17 неэпидемических серогрупп, выделенных в Калькутте в 1997–1998 гг., с использованием «универсальных» олигонуклеотидных праймеров. Обнаружено, что исследуемые штаммы отличаются по ПЦР-фингерпринтам как от вирулентных вибрионов O1 и O139 серогрупп, так и между собой, причем не имелось корреляции между источником, местом выделения и серогруппой [20]. Следует отметить, что ERIC- и RAPD-ПЦР широко используются для выявления генетического родства между штаммами *V. cholerae* [8, 46, 48].

Метод MLVA успешно применяется для изучения генома возбудителя холеры [4]. С помощью MLVA показана возможность выявлять географическое происхождение клонов *V. cholerae* [29, 54]. В работе J.S.Olsen *et al.* (2009) описаны мультиплексные ПЦР системы для проведения MLVA, использование которых позволяет через 5 ч получить окончательные данные [45].

Широкое применение при изучении геномного полиморфизма *V. cholerae* нашел метод типирования, основанный на мультилокусном секвенировании отдельных фрагментов генома. Использование метода MLST позволяет не только определять вид, биовар, но также филогенетическое родство штаммов *V. cholerae*, выделенных на разных территориях и в разное время. Так, в исследованиях S.S.Mohapatra *et al.* показано, что токсигенные и некоторые нетоксигенные штаммы *V. cholerae* имеют различное происхождение. В то же время выявлены нетоксигенные штаммы, генетически тесно связанные с токсигенными. Эти данные дают ключ к пониманию механизмов формирования токсигенных штаммов из нетоксигенных путем приобретения кластеров генов вирулентности [41]. На основании данных сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей шести

генов «домашнего хозяйства» (*asd*, *cadA*, *epd*, *idh-II*, *lap*, *mdh*) показано существование у 29 изолятов *V. cholerae* O139, по крайней мере, трех разных клонов, один из которых действительно имеет генотипическое родство с вибрионами эльтор [26].

На основе анализа литературных и собственных данных предложен комплексный алгоритм оценки генетического разнообразия природных штаммов *V. cholerae*, который включает 4 этапа: определение видовой принадлежности, серогруппы и биовара с помощью микробиологических и серологических методов и мультилокусных ПЦР; выяснение распространенности основных генов, связанных с вирулентностью, персистенцией, пандемичностью и антибиотикорезистентностью на основе моно- и мультилокусных ПЦР; оценка параметров структурной изменчивости генома природных штаммов *V. cholerae*, выделенных на различных территориях, с использованием мультилокусной ПЦР и секвенирования ключевых ДНК-мишеней; определение генетических связей между природными штаммами, выделенными на разных территориях, для выяснения их происхождения с помощью методов мультилокусного секвенирования генов жизнеобеспечения и вирулентности, VNTR-анализа и риботипирования.

Использование предложенного алгоритма обеспечит: идентификацию возбудителя холеры, включая его серогруппу и/или биовар; получение сведений о распространенности основных генов, определяющих вирулентность, персистенцию, резистентность к антибиотикам и пандемический потенциал; генетические связи между штаммами различного происхождения. Эти сведения создадут базу данных генотипов возбудителя, которая необходима для определения направления эволюции его патогенности, а также совершенствования системы молекулярно-эпидемиологического мониторинга.

Предлагаемый алгоритм соответствует современным требованиям к молекулярной диагностике и генотипированию *Y. pestis* и *V. cholerae*. Он является высокоэффективным, позволяет определять видовую и внутривидовую принадлежность штаммов, устанавливать происхождение и географическую приуроченность изолята, в том числе с атипичными свойствами. Возможна стандартизация и унификация получаемых результатов. Разработанный алгоритм позволяет проводить широкомасштабные исследования геномов штаммов чумного микроба и холерного вибриона. Использование предложенного комплекса методов анализа генетического разнообразия штаммов чумы и холеры не ограничивает числа используемых для генодиагностического анализа ДНК мишеней, а быстрые темпы развития этих технологий и усовершенствования используемой приборной базы способствует ускорению темпов проведения исследований.

При накоплении большого массива информации, использование алгоритма даст возможность, во-первых, повысить эффективность мониторинга

чумы и холеры, во-вторых, с использованием специализированных компьютерных программ создать базы данных молекулярных портретов штаммов этих возбудителей.

Работа выполнена по Государственному контракту № 111-Д от 11.06.2009 г. в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балахонов С.В., Шестопалов М.Ю. Изучение информативности различных модификаций ПЦР с универсальными праймерами при характеристике геномного полиморфизма *Yersinia pestis*. Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2004; 1:34–8.
2. Бобров А.Г., Филиппов А.А. Распространенность IS285 и IS100 в геномах *Yersinia pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis*. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 1997; 2:36–40.
3. Брюханов А.Ф., Жаринова Н.В., Брюханова Г.Д. и др. Генетическое типирование штаммов *Yersinia pestis* Центрального Кавказа. В кн.: Генодиагностика инфекционных заболеваний. Тез. докл. 4-й Всерос. науч.-практ. конф. М.; 2002; 263–5.
4. Водопьянов С.О., Олейников И.П., Гончаров Е.К. и др. Вариативный tandemный повтор *Vca Vibrio cholerae*. Мол. биология. 2002; 36(6):1074–9.
5. Горшков О.В., Савостина Е.П., Попов Ю.А., Плотников О.П. Сравнительное изучение структуры некоторых генетических зондов, используемых для типирования штаммов *Yersinia pestis*. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 1999; 4:29–33.
6. Ерошенко Г.А., Осин А.В., Смирнова Н.И. Риботипирование штаммов *Vibrio cholerae* O139, полученных из различных источников. Пробл. особо опасных инф. 2002; 1:80–5.
7. Ерошенко Г.А., Павлова А.И., Куклева Л.М. и др. Генотипирование штаммов *Yersinia pestis* на основе вариативности генов биосинтеза рРНК. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 3:6–10.
8. Мишанькин Б.Н., Романова Л.В., Ломов Ю.М. и др. *Vibrio cholerae* O139, выделенные от людей и из воды открытых водоемов: сравнительное генотипирование. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2000; 3:3–7.
9. Савостина Е.П., Попов Ю.А., Каушанова Т.Н., Яшечкин Ю.И. Анализ геномного полиморфизма типовых и атипичных штаммов возбудителя чумы с использованием полимеразной цепной реакции с универсальными праймерами. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2004; 1:22–6.
10. Смирнова Н.И. Возбудитель холеры новой O139-серогруппы: молекулярно-генетические особенности и происхождение. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2002; 3:23–33.
11. Смирнова Н.И., Кутырев В.В. Сравнительный анализ молекулярно-генетических особенностей генома и их эволюционных преобразований у возбудителей холеры, чумы и сибирской язвы. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2006; 2:9–19.
12. Сучков И.Ю., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О. и др. Мультилокусный VNTR-анализ в изучении популяционной структуры *Yersinia pestis* в природных очагах. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2004; 4:19–28.
13. Сучков И.Ю., Мишанькин Б.Н., Водопьянов С.О. и др. Генотипирование *Yersinia pestis*: вариативность локуса (CAAA)_n у природных штаммов, выделенных на территории бывшего СССР. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2002; 4:18–21.
14. Шагинян И.А. Роль и место молекулярно-генетических методов в эпидемиологическом анализе внутрибольничных инфекций. Клин. микроб. и антимикроб. терапия. 2000; 3(2):82–95.
15. Achtman M., Morelli G., Zhu P. et al. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. PNAS. 2004; 101:17837–432.
16. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiryoule A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. 1999; 96(24):14043–8.
17. Adair D., Worsham P., Hill K. et al. Diversity in a variable-number tandem repeat from *Yersinia pestis*. J. Clin. Microbiol. 2000; 38:1516–9.
18. Anisimov A.P., Lindler L., Pier G. Intraspecies Diversity of *Yersinia pestis*. Clin. Microbiol. Rev. 2004; 17(2):434–64.
19. Byun R., Elbourne L. D., Lan R. et al. Evolutionary relationships of pathogenic clones of *Vibrio cholerae* by sequence analysis of four housekeeping genes. Infect. Immun. 1999; 67(3):1116–1124.
20. Chakraborty S., Garg P., Ramamurthy T. et al. Comparison of antibiogram, virulence genes, ribotypes and DNA fingerprints of *Vibrio cholerae* of matching serogroups isolated from hospitalized diarrhea cases and from the environment during 1997–1998 in Calcutta,

- India. *J. Med. Microbiol.* 2001;50(10):879–88.
21. Chatterjee S., Ghosh K., Raychoudhuri A. et al. Phenotypic and genotypic traits and epidemiological implication of *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains in India during 2003. *J. Med. Microbiol.* 2007; 56(6):824–32.
 22. Ciannaruconi A., Grassi S., Riccardo De Santis et al. Fieldable genotyping of *Bacillus anthracis* and *Yersinia pestis* based on 25-loci Multi Locus VNTR Analysis. *BMC Microbiol.* 2008; 8:21.
 23. Cui Y., Li Y., Gorge et al. Insight into microevolution of *Yersinia pestis* by clustering regularly interspaced short palindromic repeats. *PLoS ONE.* 2008; 3(7):e2652.
 24. Dalsgaard A., Echeverria P., Larsen J.L. et al. Application of ribotyping for differentiating *Vibrio cholerae* non-O1 isolates from shrimp farms in Thailand. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61(1):245–51.
 25. Dziejman M., Balon E., Boyd D. et al. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99(3):1556–61.
 26. Farfán M., Miñana-Galbis D., Fusté M.C., Lorén J.G. Allelic diversity and population structure in *Vibrio cholerae* O139 Bengal based on nucleotide sequence analysis. *J. Bacteriol.* 2002; 184(5):1304–13.
 27. Filippov A.A., Solodovnicov N.S., Kukleva L.M., Protsenko O.A. Plasmid composition of *Yersinia pestis* strains of different origin. *FEMS Microbiol. Lett.* 1990; 67:45–8.
 28. Fraga S.G., Villagra De Trejo A., Pichel M. et al. Caracterización de aislamientos de *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 asociados a cuadros de diarrea. *Revista Argentina de Microbiología.* 2009; 41:11–9.
 29. Ghosh R., Nair G.B., Tang L. et al. Epidemiological study of *Vibrio cholerae* using variable number of tandem repeats. *FEMS Microbiol. Lett.* 2008; 288(2):196–201.
 30. Guiyole A., Grimont F., Itean I. et al. Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32(3):634–41.
 31. Guiyole A., Rasoamanana A., Buchrieser C. et al. Recent emergence of new variants of *Yersinia pestis* in Madagascar. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(11):2826–33.
 32. Heidelberg J.F., Eisen J.A., Nelson W.C. et al. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature.* 2000; 406:477–83.
 33. Kingston J.J., Urmil Tuteja, Minakshi Kapil et al. Genotyping of Indian *Yersinia pestis* strains by MLVA and repetitive DNA sequence based PCRs. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2009; 96(3):303–12.
 34. Klevytska A.M., Price L.B., Schupp J.M., Worsham P., Wong J., Keim P. Identification and Characterization of Variable-Number Tandem Repeats in the *Yersinia pestis* Genome. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39(9):3179–85.
 35. Kotetishvili M., Kreger A., Wauters G. et al. Multilocus Sequence Typing for Studying Genetic Relationships among *Yersinia* Species. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(6):2674–84.
 36. Lan R., Reeves P.R. Recombination between rRNA operons created most of the ribotype variation observed in the seventh pandemic clone of *Vibrio cholerae*. *Microbiology.* 1998; 144(5):1213–21.
 37. Leclercq F., Torrea G., Chenal-Francisque V., Carniel E. 3IS-RFLP a powerful tool for geographical clustering of global isolates of *Yersinia pestis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007; 603:322–6.
 38. Le Fleche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A. et al. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol.* 2001; 1:2.
 39. Li M., Shimada T., Morris J. G. et al. Evidence for the emergence of non-O1 and non-O139 *Vibrio cholerae* strains with pathogenic potential by exchange of O-antigen biosynthesis regions. *Infect. Immun.* 2002; 70(5):2441–53.
 40. Lowell J.L., Zhansarina A., Yockey B. et al. Phenotypic and molecular characterization of *Yersinia pestis* isolates from Kazakhstan and adjacent regions. *Microbiology.* 2007; 153:169–77.
 41. Mohapatra S.S., Ramachandran D., Mantri C.K. et al. Determination of relationships among non-toxicogenic *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor strains from housekeeping gene sequences and ribotype patterns. *Res. Microbiol.* 2009; 160(1):57–62.
 42. Motin V.L., Georgescu A.M., Elliott J. et al. Genetic Variability of *Yersinia pestis* Isolates as Predicted by PCR-based IS-100 Genotyping and Analysis of Structural Genes Encoding Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase (glpD). *J. Bacteriol.* 2002; 184(4):1019–27.
 43. Mukhopadhyay A.K., Garg S., Nair G.B. et al. Biotype traits and antibiotic susceptibility of *Vibrio cholerae* serogroup O1 before, during and after the emergence of the O139 serogroup. *Epidemiol. Infect.* 1995; 115(3):427–34.
 44. Olive D.M., Bean P. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. *J. Clin. Microb.* 1999; 37(6):1661–9.
 45. Olsen J.S., Aarskaug T., Skogan G. et al. Evaluation of a highly discriminating multiplex multi-locus variable-number of tandem-repeats (MLVA) analysis for *Vibrio cholerae*. *J. Microbiol. Methods.* 2009; 78(3):271–85.
 46. Pichel M., Rivas M., Chinen I. et al. Genetic diversity of *Vibrio cholerae* O1 in Argentina and emergence of a new variant. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(1):124–34.
 47. Pourcel C., Andre-Mazeaud F., Neubauer H. et al. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol.* 2004; 4:22.
 48. Pugliese N., Maimone F., Scarscia M. et al. SXT-related integrating conjugative element and IncC plasmids in *Vibrio cholerae* O1 strains in Eastern Africa. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009; 63(3):438–42.
 49. Qu M., Xu J., Ding Y. et al. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* O139 in China: polymorphism of ribotypes and CTX elements. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(6):2306–10.
 50. Revazishvili T., Rajanna C., Bacanidze L. Characterization of *Yersinia pestis* isolates from natural foci of plague in the Republic of Georgia, and their relationship to *Y. pestis* isolates from other countries. *Clin. Microbiol. Infect.* 2008; 14(5):429–36.
 51. Rivera I.G., Chowdhury M.A.R., Huq A. et al. Enterobacterial repetitive Intergenic consensus sequences and the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139, and non-O1 strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 1995; 61(8):2898–904.
 52. Shivaji S., Bhanu N.V., Aggarwal R.K. Identification of *Yersinia pestis* as causative organism of plague in India as determined by 16S rDNA sequencing and RAPD-based genomic fingerprinting. *FEMS Microbiol. Lett.* 2000; 189:247–52.
 53. Singh A., Goering R.V., Simjee S. et al. Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Clin. Microb. Rev.* 2006; 19(3):512–31.
 54. Stine O.C., Alam M., Tang L. et al. Seasonal cholera from multiple small outbreaks, rural Bangladesh. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(5):831–3.
 55. Torrea G., Chenal-Francisque V., Leclercq F. et al. Efficient tracing of global isolates of *Yersinia pestis* by restriction fragment length polymorphism analysis using three insertion sequences as probes. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:2084–92.
 56. Touchman J. W., Wanger D.M., Hao J. et al. A North American *Yersinia pestis* draft genome sequence: SNPs and phylogenetic analysis. *PLoS ONE.* 2007; 2(2):e220.
 57. Vergnaud G., Li Y., Gorge O. et al. Analysis of the three *Yersinia pestis* CRISPR loci provides new tools for phylogenetic studies and possibly for the investigation of ancient DNA. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007; 603:327–38.
 58. World Health Organization. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs267/en/index.htm>. Accessed April 18. Plague. 2006; Fact sheets 267.

Об авторах:

Попов Ю.А., Ерошенко Г.А., Булгакова Е.Г., Смирнова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Yu.A. Popov, G.A. Eroshenko, E.G. Bulgakova, N.I. Smirnova

Development of Complex Genotyping Algorithm and Methods of Evaluation of the Genetic Diversity of Plague and Cholera Agents Natural Strains

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Present review summarizes the literary data on applying the modern molecular genetic methods to analyze the diversity of natural strains of plague and cholera agents. Chosen was the complex of most perspective methods on the basis of which was developed the algorithm of gene-diagnostic analysis of *Yersinia pestis* and *Vibrio cholerae* strains.

Key words: plague and cholera agents, genetic diversity, genotyping algorithm.

Authors:

Popov Yu.A., Eroshenko G.A., Bulgakova E.G., Smirnova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 13.10.09.

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

БИОСЕНСОРЫ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

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

В обзоре представлены функциональные характеристики основных видов биосенсоров: электрохимических, пьезоэлектрических и оптических. Приведены примеры использования биосенсоров для детекции патогенных биологических агентов. Обсуждаются вопросы, связанные с перспективами конструирования биосенсоров для лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней.

Ключевые слова: биосенсоры, иммуносенсоры, индикация, особо опасные инфекционные болезни.

Одной из наиболее важных задач обеспечения национальной безопасности Российской Федерации и здоровья населения страны является защита от особо опасных инфекционных болезней, к которым относятся чума, сибирская язва, туляремия, холера, вирусные геморрагические лихорадки. Определяющим фактором предупреждения распространения особо опасных инфекций является раннее и быстрое обнаружение возбудителя и своевременное проведение противоэпидемических мероприятий [7]. Задача мониторинга особо опасных инфекционных болезней определяет необходимость разработки высокочувствительных средств индикации патогенов, базирующихся на достижениях современной науки и техники, характеризующихся высокой избирательностью, быстродействием, низкой себестоимостью, доступностью и малыми габаритными размерами. Таким требованиям удовлетворяют биосенсорные системы, созданные с применением новейших технологий.

Биосенсор или биологический датчик – это устройство безреагентного анализа соединений. Биосенсор состоит из биологически чувствительного элемента (рецептора), физического преобразователя и рабочего раствора. Биологический компонент биосенсора может включать ферменты, ткани, микроорганизмы, антитела, антигены, ДНК, РНК, иммобилизованные на специальном физическом носителе. Биосенсоры, содержащие антитела или антигены, называют иммуносенсорами, имеющие ДНК или олигонуклеотиды, – геносенсорами. Биосенсоры, способные быстро и воспроизводимо восстанавливаться являются многоразовыми. С помощью многоразовых биосенсоров осуществляют прямой мониторинг увеличения или уменьшения концентрации определяемого биологического агента. Биосенсоры, которые не могут быть воспроизводимо и быстро восстановлены, называют одноразовыми, к их числу относятся биотесты и биоиндикаторы [5]. Потенциальное использование одноразовых биосенсоров, особенно в мониторинге состояния окружающей среды, в большей степени ориентировано на системы предупреждения и получения сигнального ответа, не требующие точного определения концентрации ПБА.

Принцип действия биосенсоров основан на

взаимодействии биологического компонента с исследуемым материалом и на регистрации этого взаимодействия с помощью физического преобразователя (трансдьюсера) биохимического сигнала в электрический [5]. Достоинства биосенсоров заключаются в способности преобразовывать различные виды энергии, в высокой избирательности, высокой чувствительности, возможности обнаружения ионных примесей, простых и сложных неорганических и органических молекул, возможности многократного использования. Биосенсоры характеризуются быстродействием (время отклика составляет от нескольких минут до 1 ч), в то время как специфическая индикация микроорганизмов с использованием иммуноферментного анализа составляет 3–4 ч (таблица).

По виду преобразователя выделяют четыре основные группы биосенсоров: электрохимические, пьезоэлектрические, калориметрические и оптические [2]. Для обнаружения микроорганизмов в основном используют электрохимические, пьезоэлектрические и оптические биосенсоры [15].

Принцип действия **электрохимических биосенсоров** основан на измерении электрического тока, возникающего в результате окисления или восстановления электрохимически активных веществ на поверхности рабочего электрода (амперометрические биосенсоры) или на измерении разности потенциалов между двумя электродами – рабочим и электродом сравнения при постоянном токе (потенциометрические биосенсоры). В меньшей степени распространены другие виды электрохимических биосенсоров – кондуктометрические и импедансометрические [5].

К **амперометрическим биосенсорам** относят портативное электронное устройство «электронный нос» [19]. Прибор представляет собой тонкую кремниевую пластинку с нанесенными сенсорами для распознавания молекул, с помощью которой можно быстро и точно анализировать газовые смеси и обнаруживать бактерии в воздухе. Принцип его действия похож на функционирование биологических рецепторов запахов. Перспективно применение «электронного носа» для идентификации возбудителей заболе-

Сравнительные характеристики биосенсоров и тест-систем для иммуноферментного анализа

Группа	Чувствительность, м.к./мл	Время анализа, мин	Преимущества	Недостатки	Источник
Потенциометрические биосенсоры	$2,5 \cdot 10^4$	30–45	Простота, надежность	Медленный отклик, чувствительность к электрическим шумам	[15]
Амперометрические биосенсоры	$1 \cdot 10^5$	55	Низкая стоимость, малые габариты, стабильность отклика	Низкая чувствительность, низкая селективность	[22]
Пьезоэлектрические биосенсоры	$1 \cdot 10^5$	5–10	Быстрота, стабильность отклика	Низкая чувствительность, ошибка неспецифического связывания	[20, 21]
Биосенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса	$1 \cdot 10^4$	40	Высокая чувствительность, бесконтактность	Оптические помехи, необходимость применения фотоприемников	[25]
Волоконно-оптические биосенсоры	$5 \cdot 10^4 - 5 \cdot 10^5$	1–3	Быстрота отклика, малое влияние электрических помех	Необходимость применения фотоприемников	[13, 14]
Иммуноферментные тест-системы	$1 \cdot 10^6$	180–240	Специфичность	Длительность анализа, необходимость использования меток, хромогена	[22]

ваний, передающихся воздушно-капельным способом. Многие виды бактерий, такие как *Escherichia coli*, *Proteus*, *Pseudomonas* идентифицируются с помощью «электронного носа». Он позволяет диагностировать туберкулез или язвенную болезнь, вызванную *Helicobacter pylori*, по запаху слюны [15].

Амперометрические биосенсоры используют для детекции *E. coli* в воде [15], *Salmonella typhimurium* [23], *Plasmodium falciparum* [24], выявления обсемененности продуктов бактериями, обнаружения возбудителей особо опасных инфекционных болезней – сибирской язвы [15], холеры [22, 26], бруцеллеза [18, 27].

Среди **потенциометрических биосенсоров** выделяют ион-селективные электроды: pH-электроды и полевые транзисторы, которые используют для анализа ионов образующихся в растворе. Наибольшее распространение в диагностике инфекционных болезней получили светоправляемые потенциометрические биосенсоры LAPS (от англ. light-addressable potentiometric sensors). Метод LAPS сочетает в себе фильтрацию исследуемого материала через нитроцеллюлозную мембрану, сэндвич-иммуноанализ и светоправляемый биосенсор. Наличие бактерий регистрируют по изменению pH на мембране. LAPS-биосенсоры применяют для обнаружения *E. coli* O157:H7 в воде [15], стафилококкового энтеротоксина, вируса болезни Ньюкасла, возбудителя бруцеллеза *Brucella melitensis* [17].

Электрохимические биосенсоры характеризуются низкой стоимостью, малыми габаритными размерами, стабильностью отклика. К недостаткам электрохимических биосенсоров следует отнести чувствительность к колебаниям температуры, pH и излучениям (таблица).

Пьезоэлектрические биосенсоры чувствительны к изменению массы на поверхности физического носителя (гравиметрические биосенсоры); плотности, вязкости среды, частоты колебаний акустических волн. В последнее время в пьезоэлектрических биосенсорах все чаще используют пьезоэлектрические кристаллы, которые генерируют и передают акустическую волну с одной стороны кристалла на другую

(англ. bulk acoustic wave sensors – объемно-волновые сенсоры) или по одной грани кристалла (англ. surface acoustic wave sensors – сенсоры поверхностных акустических волн). На основе акустических биосенсоров разработаны иммуносенсоры для обнаружения *Salmonella typhimurium*, вируса герпеса [15]. При этом на поверхности кварцевого резонатора, покрытого золотой пленкой, иммобилизируют специфические антитела. Антитела связывают белки микробных клеток, при этом масса на поверхности увеличивается, а резонансная частота колебаний акустических волн уменьшается на тысячные доли процента, что и фиксирует биосенсор. В ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» разработан способ детекции биологических макромолекул с помощью пьезоэлектрических биосенсоров. Способ включает иммобилизацию слоев макромолекул на поверхности кварцевого резонатора, помещенного в вакуум, и последовательную регистрацию резонансных частот после нанесения каждого биослоя [3]. С использованием специфических иммуноглобулинов и антигенов *Francisella tularensis* разработаны пьезоэлектрические биосенсоры для обнаружения возбудителя туляремии в воде, молоке [21] и противотуляреминых антител в сыворотке животных [20]. Диагностика туляремии в первые дни болезни представляет значительные трудности. Поэтому раннее выявление сывороточных антител к возбудителю является основанием для постановки правильного диагноза и проведения своевременного адекватного лечения. Пьезоэлектрические биосенсоры позволяют обнаружить специфические противотуляреминые антитела на 1–3-и сутки после заражения в течение 10 мин [20]. Пьезоэлектрические биосенсоры отличаются от электрохимических быстрым откликом (5–10 мин), но, в то же время, они обладают низкой чувствительностью и наличием ложноположительных ответов в результате неспецифического связывания с пьезокристаллом.

В **оптических биосенсорах** аналитический сигнал обусловлен не химическим взаимодействием определяемого компонента с чувствительным элементом, а измеряемыми физическими параметрами

ми – интенсивностью поглощения, отражения света, люминесценции объекта и т.д. Принцип действия оптических биосенсоров основан на регистрации изменений оптических свойств среды: оптической плотности (денситометрические биосенсоры), цвета (колориметрические биосенсоры), мутности (турбидиметрические биосенсоры), показателя преломления среды (рефрактометрические биосенсоры) и других свойств в результате присутствия биологического агента. В настоящее время наибольшее развитие получили оптические биосенсоры, основанные на изменении направления распространения светового потока, проходящего через оптическое волокно или треугольную призму, покрытую тонкой пленкой металла. Последние основаны на принципе поверхностного плазмонного резонанса (англ. surface plasmon resonance) [15].

Детекция межмолекулярного взаимодействия при **поверхностном плазмонном резонансе** осуществляется по изменению показателя преломления среды в результате образования комплекса антиген-антитело на резонансном слое измерительной кюветы или проточной ячейки [15]. Принцип предусматривает систему подготовки поверхностей для иммобилизации антител, антигенов, систему перемешивания сред, термостатирования кювет или проточных ячеек. На основе принципа поверхностного плазмонного резонанса разработаны биосенсоры для выявления спор возбудителя сибирской язвы [25] и холерного вибриона O1 серогруппы [16]. В практику внедрены коммерческие биосенсоры, основанные на явлении поверхностного плазмонного резонанса: «BIAcore» (Pharmacia Biosensor AB, Швеция) [15] и «IASys» (Affinity Sensor, Финляндия) [4]. Указанные биосенсорные системы являются довольно сложными и дорогостоящими.

Перспективным является использование **оптических волокон** в качестве био- и иммуносенсоров. Они характеризуются низкой себестоимостью, быстрым откликом, простотой постановки анализа. Обычно, через волокно подается излучение различных длин волн инфракрасного (ИК) спектра. Учитывая, что многие микроорганизмы обладают специфичными ИК-спектрами, волоконная ИК-спектроскопия может использоваться для выявления изменений свойств биологических объектов. Иммобилизация антител внутри волокна позволяет осуществлять специфическую индикацию. На основе оптоволокон были разработаны иммуносенсоры для выявления капсульного антигена «фракция 1» чумного микроба [10, 11, 14] и антител к нему [12], для обнаружения протективного антигена сибиреязвенного микроба [13]. Чувствительность биосенсоров составила 5–50 нг/мл белка [10], время отклика – 1 мин [14]. Оптоволоконные биосенсоры нашли свое отражение в системе обнаружения ПБА RAPTOR™ (от англ. Rapid Automatic and Portable Fluorometer Assay System - быстрая автоматическая и портативная система флуориметрического анализа) (Research

International, США) [13, 19]. Биосенсор RAPTOR™ позволяет одновременно выявлять более 4 видов поражающих агентов, в том числе *F. tularensis*, рицин, стафилококковый энтеротоксин [13]. К достоинствам оптических биосенсоров следует отнести высокую чувствительность, малое время отклика (1–3 мин), бесконтактность и малое влияние электрических помех. Оптоволоконные биосенсоры могут осуществлять индикацию микроорганизмов без применения специфических молекул – по спектральным характеристикам патогенов, они удобны в обращении, малогабаритны и имеют низкую себестоимость, поэтому они наиболее перспективны при разработке средств сигнальной индикации патогенных биологических агентов.

Принципиально новым классом оптических биосенсоров являются биосенсоры на основе фотонно-кристаллических волокон с полый сердцевинной [1, 6, 8, 9]. Принцип действия фотонно-кристаллических волноводов основан на обнаружении и идентификации биологических объектов по спектрам излучения, проходящего через полую сердцевину, заполненную исследуемым материалом, света в диапазоне длин волн от 200 нм до 1100 нм. Фотонно-кристаллические волноводы имеют каналы для заполнения рабочими растворами, введения пробы и реагентов. Суммарная площадь рабочей поверхности фотонно-кристаллического волокна в сотни и тысячи раз больше, чем у обычного оптического волокна и плазмонно-резонансной кюветы, что ведет к повышению чувствительности метода и скорости протекания реакции межмолекулярного взаимодействия. В настоящее время фотонно-кристаллические волокна рассматриваются как один из наиболее перспективных элементов волноводно-оптических датчиков физических величин. К числу основных преимуществ можно отнести защищенность от воздействия от электромагнитных полей, высокую чувствительность и надежность, воспроизводимость и широкий динамический диапазон измерений, возможность спектрального и пространственного мультиплексирования чувствительных элементов, малое время отклика на изменение измеряемой величины (1 мин), малые объемы пробы, малые габариты. В настоящее время в ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» при участии учреждений Роспотребнадзора ведется работа по конструированию биосенсоров для детекции возбудителей особо опасных инфекционных болезней на основе фотонно-кристаллических волноводов. Экспериментально установлено различие спектральных характеристик возбудителей чумы, холеры, их антигенов и специфических комплексов антиген-антитело, что позволяет проводить сигнальную индикацию микроорганизмов с использованием фотонно-кристаллических волокон. Данная работа является основой для последующей разработки комплекса средств индикации и идентификации возбудителей особо опасных инфекций для контроля биологиче-

ской безопасности при осуществлении мониторинга объектов окружающей среды.

Применение биосенсоров для сигнальной индикации возбудителей особо опасных инфекционных болезней позволит предотвратить распространение инфекции, в том числе при актах биотерроризма, снизить возможный социально-экономический ущерб от временной потери трудоспособности заболевшими гражданами за счет быстрого и своевременного проведения противоэпидемических мероприятий.

Работа выполнена по Государственному контракту № 113-Д от 11.06.2009 г. в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоглазов В.И., Скибина Ю.С., Тучин В.В., Чайников М.В. Пропускание стеклянных фотонно-кристаллических волноводов с поллой сердцевиной». Письма в ЖТФ. 2005; 31(23):55–60.
2. Егоров А.А. Систематика, принцип работы и области применения датчиков. Журнал радиоэлектроники. 2009; 3:1–22.
3. Ефременко В.И., Кальной С.М., Бондаренко А.И., Швецова Н.В., авторы. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Способ детекции макромолекул биосенсорным устройством. РФ патент 2148259. 27.04.2000.
4. Иванов Ю.Д., Гнеденко О.В., Конев В.А. и др. Детекция поверхностного антигена вируса гепатита В с помощью оптического биосенсора. Вопросы медицинской химии: Научно-теоретический журнал. 2001; 47(4):419–25.
5. Карякин А.А., Уласова Е.А., Вагин М.Ю., Карякина Е.Е. Биосенсоры: устройство, классификация и функциональные характеристики. Сенсор 2002; 1:16–24.
6. Коноров С.О., Федотов А.Б., Белоглазов В.И., Скибина Н.Б., Щербак А.В., Желтиков А.М. Эволюция огибающей и фазы фемтосекундных импульсов в полых фотонно-кристаллических волокнах». Квантовая электроника. 2004; 34(1):51–5.
7. Онищенко Г.Г., редактор. Руководство по специфической индикации патогенных биологических агентов. М.: ЗАО «МП Гигиена»; 2006.
8. Слепов Н. Фотонное волокно – уже реальность. Новые типы оптических волокон. Электроника: Наука, Технология, Бизнес. 2004; 5:80–4.
9. Тучин В.В., Скибина Ю.С., Белоглазов В.И. и др. Сенсорные свойства фотонно-кристаллического волновода с поллой сердцевиной. Письма в ЖТФ. 2008; 34(15):63–9.
10. Anderson G.P., Breslin K.A., Ligler F.S. Assay development for a portable fiberoptic biosensor. ASAIJ. 1996; 42(6):942–6.
11. Anderson G.P., Jacoby M.A., Ligler F.S., King K.D. Effectiveness of protein A for antibody immobilization for a fiber optic biosensor. Biosens Bioelectron. 1997; 12(4):329–36.
12. Anderson G.P., King K.D., Cao L.K., Jacoby M., Ligler F.S., Ezzell J. Quantifying serum antiplague antibody with a fiber-optic biosensor. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1998; 5(5):609–12.
13. Anderson G.P., King K.D., Gaffney K.L., Johnson L.H. Multi-analyte interrogation using the fiber optic biosensor. Biosens. Bioelectron. 2000; 14(10–11):771–7.
14. Cao L.K., Anderson G.P., Ligler F.S., Ezzell J. Detection of *Yersinia pestis* fraction 1 antigen with a fiber optic biosensor. J Clin. Microbiol. 1995; 33(2):336–41.
15. Deisingh A. Biosensors for microbial detection. Microbiologist. 2003; 2:30–33.
16. Jyoung J.Y., Hong S., Lee W., Choi J.W. Immunosensor for the detection of *Vibrio cholerae* O1 using surface plasmon resonance. Biosens. Bioelectron. 2006; 21(12):2315–9.

17. Lee W.E., Thompson H.G., Hall J.G., Bader D.E. Rapid detection and identification of biological and chemical agents by immunoassay, gene probe assay and enzyme inhibition using a silicon-based biosensor. Biosens. Bioelectron. 2000; 14(10–11):795–804.
18. Li Z.Z., Gong F.C., Shen G.L., Yu R.Q. Bacteria-modified amperometric immunosensor for a *Brucella melitensis* antibody assay. Anal. Sci. 2002; 18(6):625–30.
19. Lim D.V., Simpson J.M., Kearns E.A. et al. Current and Developing Technologies for Monitoring Agents of Bioterrorism and Biowarfare. Clin. Microbiol. Rev. 2005; 18(14):583–607.
20. Pohanka M., Pavlis O., Skládal P. Diagnosis of tularemia using piezoelectric biosensor technology. Talanta. 2007; 71(2):981–5.
21. Pohanka M., Skládal P. Piezoelectric immunosensor for the direct and rapid detection of *Francisella tularensis*. Folia Microbiol (Praha). 2007; 52(4):325–30.
22. Rao V.K., Sharma M.K., Goel A.K., Singh L., Sekhar K. Amperometric immunosensor for the detection of *Vibrio cholerae* O1 using disposable screen-printed electrodes. Anal. Sci. 2006; 22(9):1207–11.
23. Salam F., Tohill I.E. Detection of *Salmonella typhimurium* using an electrochemical immunosensor». Biosens. Bioelectron. 2009; 24(8):2630–6.
24. Sharma M.K., Rao V.K., Agarwal G.S., Rai G.P. et al. Highly Sensitive Amperometric Immunosensor for *Plasmodium falciparum* Histidine Rich Protein-2 in the Serum of Humans with Malaria: Comparison with a Commercial Kit. J. Clin. Microbiol. 2008; 46(11):3759–65.
25. Wang D.B., Bi L.J., Zhang Z.P., Chen Y.Y., Yang R.F., Wei H.P. et al. Label-free detection of *B. anthracis* spores using a surface plasmon resonance biosensor. Analyst. 2009; 134(4):738–42.
26. Yean C.Y., Kamarudin B., Ozkan D.A., Yin L.S., Lalitha P., Ismail A. et al. Enzyme-linked amperometric electrochemical genosensor assay for the detection of PCR amplicons on a streptavidin-treated screen-printed carbon electrode. Anal. Chem. 2008; 80(8):2774–9.
27. Zhi-Zhang L., Fu-Chun G., Guo-Li S., Ru-Qin Y. Bacteria-modified amperometric immunosensor for a *Brucella melitensis* antibody assay. Anal. Sci. 2002; 18:625–30.

Об авторах:

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

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

Biosensors: Current State and Prospects of Applying in Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

The review presents the functional characteristics of the main types of biosensors: electrochemical, piezoelectric and optical. Shown are the examples of biosensors application for pathogenic biological agents detection. The prospects of biosensors development for laboratory diagnostics of particularly dangerous infectious diseases are discussed.

Key words: biosensors, immunosensors, indication, particularly dangerous infectious diseases.

Authors:

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

Поступила 02.11.09.

И.Н.Гурина

**ЭПИЗООТИЧЕСКАЯ ОБСТАНОВКА ПО БЕШЕНСТВУ В РЕСПУБЛИКЕ МОРДОВИЯ
В 2006–2008 гг.**

ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Мордовия», Саранск

Проведенный ретроспективный анализ заболеваемости бешенством среди животных с 2006 по 2008 год позволяет прогнозировать ухудшение эпидемической обстановки в Республике Мордовия. Исходя из анализа причиной повышенной эпидемической опасности является наличие природных очагов – главных резервуаров вируса бешенства и основными распространителями болезни остаются по-прежнему лисы (до 90 % случаев бешенства, выявляемых у диких животных), а эпизоотии в антропоургических очагах поддерживаются, в основном, за счет собак и кошек.

Ключевые слова: бешенство, эпидемическая обстановка, противоэпидемические, противоэпизоотические, профилактические мероприятия, антирабическое лечение.

Бешенство представляет серьезную проблему здравоохранения многих стран мира, что, в первую очередь, связано с проблемой распространения его среди диких животных.

Основным резервуаром на территории Республики Мордовия остается лиса, однако все шире вовлекаются в эпизоотический процесс и домашние животные: собаки, кошки и сельскохозяйственные животные (рис. 1).

За последние три года произошло резкое осложнение эпизоотической обстановки по бешенству в Республике Мордовия, обусловленное активизацией ее природных очагов.

Заражение бешенством животных (собак, кошек) в основном происходит при их контакте с дикими животными (лисами), которые часто забегают в поселки, расположенные недалеко от леса. Мордовской республиканской станцией по борьбе с болезнями животных за последние три года (2006–2008 гг.) бешенство установлено у 67 животных: 44 лисы, 10 собак, 7 кошек, 6 сельскохозяйственных животных. Максимальное число заболеваний животных (30) отмечено в 2008 г. (рис. 2).

По каждому случаю был проведен комплекс, противоэпидемических и профилактических меро-

приятий, что позволило предотвратить заболевание людей и распространение инфекции среди животных.

Количество пострадавших от укусов больных бешенством животных колебалось от 24 (2006 г.) до 112 (2008 г.), всего за период с 2006 по 2008 год – 203 человека (24,1 на 100 т.н.) (таблица).

Число пострадавших, прошедших курсы антирабического лечения, составило: 1104 (42,5 %) в 2006 г., 1815 (68,4 %) в 2007 г., 1767 (65,2 %) в 2008 г.

Отмечалось снижение тяжелых травм, множественных укусов опасной локализации на 20,9 %. Если в 2006 г. с укушенными ранами было госпитализировано в стационар 526 (19,3 %) пострадавших, то в 2008 г. – 416 (15,3 %).

Число укушенных *домашними животными* снизилось от 2089 (246,4 на 100 т.н. – 2006 г.) до 1727 (205,5 на 100 т.н. – 2008 г.). Всего пострадавших от домашних животных за три года составило 5665 человек (671,2 на 100 т.н.).

От укусов *бездомными животными* в 2008 г. пострадало 862 человека (102,6 на 100 т.н.), что на 33,8 % больше, чем в 2006 г. (571 человек – 67,4 на 100 т.н.). Увеличивалось число укушенных *дики-*

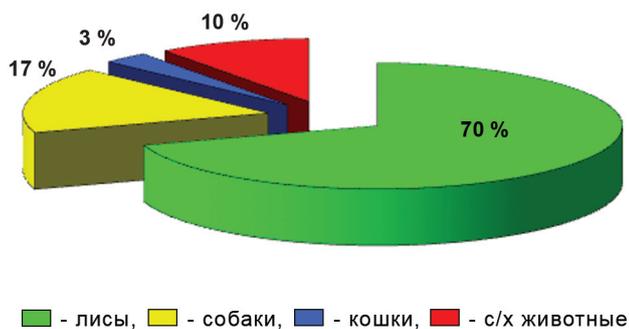


Рис. 1. Видовой состав животных, больных бешенством за 2008 г.

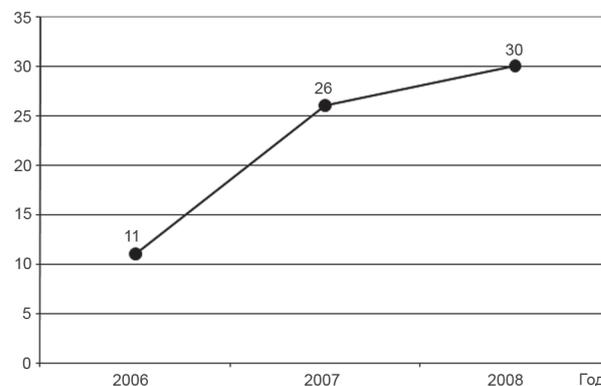


Рис. 2. Динамика числа случаев заболевания животных бешенством с 2006 по 2008 год

Антирабическая помощь пострадавшим от укусов животных в Республике Мордовия в 2006–2008 г.

Год	Число пострадавших от укусов		Госпитализировано в стационар		Пострадавшие от бешеных животных		Отказ от антирабического лечения	
	Абс. число	на 100 т.н.	Абс. число	на 100 т.н.	Абс. число	на 100 т.н.	Абс. число	на 100 т.н.
2006	2722	321,7	526	62,1	24	2,8	112	13,2
2007	2742	323,5	562	66,3	67	7,9	122	14,4
2008	2712	322,7	416	49,5	112	13,3	201	23,9

ми животными в 2008 г. по сравнению с 2006 г. на 31,1 %. В 2008 г. – 90 человек (10,7 на 100 т.н.), а в 2006 г. – 62 человека (7,3 на 100 т.н.). Были зарегистрированы укусы и от сельскохозяйственных животных. В 2007 г. по РМ – 18 человек (2,1 на 100 т.н.), в 2008 г. – 7 человек (0,8 на 100 т.н.) (рис. 2).

При обращении за медицинской помощью назначение прививок составило в 2008 г. – 97,1 % (2634 человека), что на 1,7 % больше, чем в 2006 г. – 95,4 % (2597 человек).

Анализ локализации укусов показал, что преимущественно укусы были в плечо, туловище – 57,5 %, кисти рук, пальцы ног – 37,6 %, укусы в лицо, шею, голову – 4,9 %.

Заболееваемость животных бешенством в 2008 г. в основном пришлось на октябрь, когда было зарегистрировано 8 случаев бешенства, февраль, июль, август – по 4 случая. В 2006 г. превалировал зимне-весенний период (январь, февраль, март – по 2 случая).

В Республике Мордовия основным препаратом для профилактики бешенства остается вакцина антирабическая культуральная концентрированная очищенная инактивированная сухая (КОКАВ). Несомненным успехом следует считать применение оральных вакцин для иммунизации диких животных, особенно лис. Препарат предназначен для иммунизации диких плотоядных животных, а также бродячих и одичавших домашних плотоядных животных. «Оралрабивак» изготовлен из штамма вируса бешенства, расфасованного в полистироловые капсулы, которые заключены внутрь приманки. Сама приманка изготовлена в виде брикета из продуктов, съедобных для плотоядных животных, со специфическим для их привлечения запахом.

Иммунный ответ должен наступить через 3 недели и будет продолжаться не менее 1 года. Лечебными свойствами вакцина не обладает. Для облегчения мониторинга поедаемости приманки в ее состав введен тетрациклин, который будет откладываться на эмали зубов животного, съевшего приманку.

В 2008 г. профилактическая вакцинация диких плотоядных животных пройдена на территории 22 районов Республики Мордовия. Всего на эти цели выделено 90000 доз «Оралрабивака». Наибольшее количество препарата направлено в Зубово-Полянский, Ичалковский, Ковылкинский и Краснослободский районы. Специалистами районных ветеринарных станций в декабре 2008 г. этот препарат был получен и разбросан на местах обитания диких плотоядных животных и бродячих собак.

Об авторах:

Гурина И.Н. Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Мордовия. 430030, Саранск, ул. Дальняя, д. 1а. E-mail: cgie@moris.ru

I.N.Gurina

Rabies Epizootic Situation in the Republic of Mordovia in 2006–2008

Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Mordovia

Retrospective analysis of rabies incidence in animals, carried out in 2006–2008, enables to expect deterioration of epidemiologic situation in the Republic of Mordovia. Foxes remain to be the main reservoirs of rabies virus and disease spreaders (up to 90% of rabies cases are revealed in wild animals), whereas epizootics in anthropurgic foci are maintained by dogs and cats.

Key words: rabies, epidemic situation, anti-epidemic, anti-epizootic preventive measures, anti-rabies treatment.

Authors: Gurina I.N. Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Mordovia. 430030, Saransk, Dalnaya str., 1a.

Поступила 26.10.03.

А.А.Кузнецов¹, А.Н.Матросов¹, В.П.Осипов², Т.В.Князева¹, А.М.Поршаков¹,
Н.В.Попов¹, Е.В.Куклев¹, С.А.Щербакова¹, В.П.Топорков¹

ПРИНЦИПЫ ОРГАНИЗАЦИИ ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА СОЧЕТАННЫХ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЧУМЫ И ДРУГИХ ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ В РЕГИОНЕ НИЖНЕГО ПОВОЛЖЬЯ

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

²ФГУЗ «Астраханская противочумная станция», Астрахань

На основании опыта многолетнего эпизоотологического обследования природных очагов чумы определены принципы использования отработанной методологии в целях организации мониторинга сочетанных с чумой опасных инфекционных болезней. Предложены методы сбора полевого материала для индикации возбудителей различных инфекций, рассмотрены перспективы комплексной дифференциации территории по уровню эпидемиологической опасности. Сформулированы задачи по дальнейшему изучению ареалов, пространственной и биоценотической структуры сочетанных природных очагов чумы и других опасных инфекций.

Ключевые слова: сочетанные природные очаги инфекций, чума, эпизоотологический мониторинг, эпизоотологическое обследование.

С первых лет нового тысячелетия значительно возросли темпы внедрения комплексного подхода к изучению опасных инфекционных болезней. Основная идея такого подхода заключается в выявлении сочетанных природных очагов и поиске на их территориях возбудителей различных инфекций. Обеспечение эпизоотологического благополучия населения, контактирующего с источниками заражения в естественных или антропогенных ландшафтах, является одной из важнейших задач государства. Необходимым условием решения этой задачи выступает эпизоотологический мониторинг природных очагов инфекций. Его результаты служат основой планирования противоэпизоотических и противоэпидемиологических мероприятий, проведение которых необходимо для управления инфекционными болезнями [8].

Озабоченность человечества проблемой борьбы с инфекционными болезнями наглядно представлена в решениях саммита «Группы восьми», состоявшегося в Санкт-Петербурге в 2006 г. [9]. Принятие Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации» и выделение необходимых для ее выполнения средств трудно переоценить. Подобная заинтересованность в достижении эпизоотологического благополучия населения по особо опасным инфекционным болезням должна привести к адекватному материально-техническому и финансовому обеспечению служб, ответственных за это благополучие. С другой стороны, глобальные социально-экономические реалии настоящего времени требуют от исполнителей программы и практических работников здравоохранения активного поиска наименее затратных способов достижения эпизоотологического благополучия населения.

Противочумными учреждениями России накоплен уникальный опыт борьбы с чумой и некоторыми другими природно-очаговыми инфекциями, важ-

нейшим результатом которого следует считать разработку стратегических основ эпизоотологического надзора за чумой и тактических приемов эпизоотологического мониторинга ее природных очагов [5]. Стержнем новой стратегии служит дифференциация энзоотичной по чуме территории по уровню эпидемиологической опасности отдельных ее участков (секторов). Эпидемиологическое районирование, выполненное по формально-территориальному принципу, отражает потенциальный риск заражения человека чумой в конкретных местах в периоды активизации природных очагов этой инфекции. Такой результат получен при анализе многолетней динамики явлений, влияющих на эпизоотический и эпидемиологический процессы на энзоотичных территориях [3, 7, 12]. Адекватная оценка участков по тем или иным критериям стала возможной при наличии длительных наблюдений, составляющих несколько десятков лет. Однако даже в этом случае оценка не всегда достигала стопроцентной однозначности. Тем не менее, разработка Регламента эпизоотологического обследования, предусматривающего исключение значительной части очаговой территории из плана регулярных посещений, позволила существенно сократить затраты на его проведение.

В последнее время на энзоотичной по чуме территории высокую актуальность приобретают опасные природно-очаговые инфекции бактериальной, вирусной, риккетсиозной и иной этиологии. Обнаруживаемое совпадение нозоареалов чумы и других опасных инфекций говорит о существовании там территориально сочетанных природных очагов [14]. Указанное обстоятельство, а также наличие специализированной противочумной службы открывает перспективу использования накопленного специалистами этой службы опыта для организации унифицированного надзора за другими природно-очаговыми инфекциями. Наиболее наглядным в этом отношении является регион Нижнего Поволжья, который на про-

тяжении ряда лет служит модельным полигоном для изучения сочетанных очагов чумы и других опасных инфекций. [1, 2, 4, 6, 10, 13, 15].

Первым и наиболее важным вопросом, возникающим при организации комплексного мониторинга, является необходимость дифференциации энзоотичной по чуме территории с учетом расположения на ней сочетанных природных очагов. Детали этой дифференциации еще предстоит разработать и применить на практике, однако уже сейчас можно сказать, что пространственная структура сочетанных очагов будет сложнее, а для ее определения необходимы ландшафтно-географические и эколого-эпизоотологические исследования в рамках Федеральной целевой программы.

Любой мониторинг представляет собой систему повторяющихся во времени и пространстве наблюдений, выполняемых с конкретной целью и в соответствии с определенной программой. Он характеризуется комплексностью применяемых способов слежения за объектами, территориями, процессами или явлениями и включает всестороннее изучение различных их состояний, определение причин происходящих флуктуаций, прогнозирование их глубины, направленности и возможного влияния на субъект наблюдения.

Основными объектами эпизоотологического мониторинга выступают возбудители инфекций, комплексы животных – носителей и переносчиков, а также эпизоотии. Основная его цель – определение текущего состояния факторов очаговости чумы и других опасных инфекций. В зависимости от дислокации, размеров, сезонных особенностей и кратности эпизоотических и эпидемических проявлений инфекций, степени их сочетанности, характера деятельности и численности населения в каждом конкретном очаге чумы и в соответствии с комплексным эпидемиологическим районированием разрабатывается свой Регламент обследования.

В качестве основных задач мониторинга выступают:

1. Поиск эпизоотий чумы и сочетанных с ней опасных инфекционных болезней разной этиологии, определение границ и интенсивности эпизоотического процесса.

2. Лабораторное исследование полевого материала, индикация и идентификация возбудителей природно-очаговых инфекций, определение их эпидемиологической значимости.

3. Изучение биоценотической и пространственной структур природных очагов инфекций.

4. Наблюдение за динамикой численности, экологией и размещением диких и синантропных животных – носителей и переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций.

5. Наблюдение за численностью и распределением домашних животных, имеющих эпидемиологическое значение.

6. Изучение влияния абиотических факторов на

состояние и активность природных очагов инфекций. Наблюдение за погодно-климатическими и фенологическими явлениями.

7. Наблюдение за численностью, перемещениями, хозяйственной деятельностью населения на энзоотичных и сопредельных с ними территориях.

8. Прогнозирование эпизоотической активности очагов, оценка риска заражения людей и развития эпидемических осложнений по чуме и другим инфекциям.

Следует заметить, что опыт эпизоотологического обследования сочетанных природных очагов противочумными учреждениями уже существует. Касается он небольшого набора инфекций, а в последнее время к ним добавились некоторые вирусные и риккетсиозные болезни. Однако мониторинг природных очагов этих болезней осуществляется пока без целенаправленного изучения их сочетанности, и лишь в настоящее время начата разработка общих принципов эпидемиологического надзора за ними.

В качестве предварительных рекомендаций по мониторингу сочетанных очагов можно привести следующие положения. Крупные массивы или отдельные секторы, где перспективен поиск эпизоотий чумы, туляремии, лептоспироза, бруцеллеза, Крымской геморрагической лихорадки (КГЛ), лихорадки Западного Нила (ЛЗН), Астраханской пятнистой лихорадки (АПЛ) и других инфекций могут обследоваться с повышенной интенсивностью. Серьезной проблемой в организации эпизоотологического обследования на сочетанные инфекции могут оказаться различия в сезонной активности очагов. В Нижнем Поволжье в весенний период целесообразно вести параллельное исследование полевого материала (мелкие млекопитающие, кровососущие членистоногие, объекты внешней среды) на чуму, туляремию, лептоспироз, бруцеллез, КГЛ, АПЛ. Летом и в начале осени осуществляют основные объемы исследований (мелкие млекопитающие, птицы, кровососущие членистоногие) на арбовирусные инфекции. Поздней осенью и зимой проводят обследование на чуму и туляремию.

Сроки и плотность эпизоотологического обследования различных по уровню эпидемической опасности участков природных очагов чумы и сочетанных с ней инфекций могут сильно различаться. В зависимости от типа активизации эпизоотического процесса по разным инфекциям в течение года на конкретных территориях (одновершинный, двухвершинный, трехвершинный) определяют количество обследовательских сезонов (весенний, летний, осенний и т. д.), для каждого из которых отдельно указывают сроки и продолжительность обследования. При необходимости сезон может быть разбит на два-три периода, разделенных интервалами произвольной длительности. Последовательность охвата территории, включая повторное взятие материала в том или ином секторе в течение сезона, определяется складывающейся эпизоотической обстановкой.

При распределении общего числа планируемых точек эпизоотологического обследования по территории не следует стремиться к их равномерности или к обязательному посещению каждого сектора. Участки, где наиболее вероятно обнаружение зараженных носителей, переносчиков, объектов окружающей среды, могут обследоваться со значительно большей плотностью и кратностью. В случаях малой вероятности обнаружения эпизоотических проявлений на конкретном участке в данное время, его исключают из плана обследования. На территориях (секторах), для которых по Регламенту достаточным является только визуально-рекогносцировочное обследование, сбор полевого материала возможен при определении границ эпизоотического участка или возникновении на них ситуации, характерной для возможного начала эпизоотического периода.

При проведении эпизоотологического обследования весь полевой материал, поступающий в лабораторию, должен исследоваться дифференцированно. Выбор тактики и наиболее экономичных и эффективных методик лабораторных исследований проводят на основе результатов многолетних данных, исходя из их информативности и целесообразности.

В очагах сочетанных инфекций, в которых носителями (резервуаром) возбудителя являются позвоночные животные: мелкие млекопитающие и птицы, ведут наблюдения за видовым разнообразием и состоянием их популяций. На постоянных пунктах (площадках, маршрутах, трансектах) учета определяют численность животных 1–3 раза в год, изучают особенности их биотопического размещения. В качестве единиц учета применяют относительный показатель попадания в орудия лова (в %), плотность нор, число особей на единицу площади, на стандартный отрезок маршрута и т. д. При учете птиц определяют также численность особей на маршруте или в единицу времени учета, количество особей в стае (агрегированность) и др. Для прогностических целей отслеживают генеративное и физиологическое состояние популяций животных, наблюдают за отклонениями в фенологических явлениях. Мелких зверьков добывают в орудия лова (капканы, давилки, живоловки, верши, цилиндры), птиц отлавливают сетями или отстреливают, затем исследуют на чуму, туляремию и другие инфекции. Обнаруженные в природе трупы животных: птиц и мелких млекопитающих (насекомоядных, грызунов, хищных, рукокрылых) обязательно доставляют в лабораторию.

В сочетанных очагах инфекционных болезней ведут наблюдения за популяциями кровососущих членистоногих – блох, иксодовых клещей, комаров. Сбор кровососущих членистоногих и учет их численности проводят в процессе регламентируемого оперативного эпизоотологического обследования секторов либо на стационарных участках наблюдений. Учеты численности блох (в очагах чумы) осуществляют непрерывно в ходе эпизоотологического обследования преимущественно путем сбора экто-

паразитов с поступающих в лабораторию зверьков. В определенные фенологические периоды осуществляют наблюдение за физиологическим состоянием популяций блох. Важное эпидемиологическое значение имеет также определение видового состава и обилия блох в жилище человека.

Иксодовые клещи являются основными переносчиками туляремии, КГЛ, АПЛ. Выступают как дополнительные переносчики, участвующие в циркуляции вируса ЛЗН. Численность клещей – переносчиков туляремии и чумы учитывают на отлавливаемых мелких млекопитающих, при осмотре ходов нор и гнезд, а в очагах туляремии организуют сбор клещей в природных биотопах. В очагах, где основным переносчиком вируса ККГЛ является клещ *Hyalomma marginatum* и где он участвует в переносе вируса ЛЗН, эпизоотологическое обследование в полупустынных и степных ландшафтах проводят в два этапа: весенне-летний и летне-осенний. Одновременно учитывают и другие виды иксодовых клещей. Разовые обследования сельскохозяйственных животных организуют, в первую очередь, в хозяйствах, неблагополучных по КГЛ. На территории очага клещей собирают в хозяйствах, расположенных в различных ландшафтных зонах в пределах ареала *H. marginatum*, особенно в местах, где выявлена повышенная концентрация иксодид.

Нападение иксодовых клещей на человека и сельскохозяйственных животных наиболее вероятно на пастбищах, краях лесополос, путях скотопргона и прилегающих к этим станциям нераспаханных участках. В этих станциях в первую очередь проводят массовые сборы и определяют численность клещей. Пастбища обследуют ранней весной до начала выпаса скота. Применяют различные способы сбора клещей: на флаг, волокушу, наблюдателя.

В очаге АПЛ основное внимание уделяют клещу *Rhipicephalus pumilio*, который является переносчиком возбудителя этого заболевания в Астраханской области. Возможно участие в сохранении возбудителя и других видов иксодовых клещей, в частности *R. sanguineus*, распространенного в этом регионе.

Наблюдения за популяциями комаров проводят в очагах лихорадки ЛЗН, а также при трансмиссивных вспышках туляремии. Резервуарами вируса в природе служат птицы околородного экологического комплекса, а среди переносчиков имеют значение комары родов *Culex*, *Coquillettidia*, возможно *Aedes*, *Anopheles*. Организуют наблюдения за сезонной динамикой численности комаров в населенных пунктах и природных биотопах.

Помимо указанных групп членистоногих в качестве переносчиков особо опасных заболеваний могут иметь значение слепни, гамазовые и краснотелковые клещи, вши грызунов (преимущественно при туляремии). Их сборы и учеты осуществляют по общепринятым методикам в зависимости от эпидемиологической ситуации в очаге и задач эпизоотологического обследования.

Одним из важных итогов мониторинга является

прогноз состояния природного очага на очередной период. Прогноз может быть кратко-, долго- и сверхдлгосрочным. Методы прогнозирования должны учитывать наряду с экологическими характеристиками популяций носителей и переносчиков, микробиологические и генетические особенности возбудителей инфекций. Формирование на энзоотичной по чуме территории сочетанных очагов зоонозных инфекций различной этиологии обуславливает необходимость разработки дифференцированных вероятностных прогнозов их активности, положительный опыт применения которых уже имеется [11].

Методические приемы обследования отдельных природных очагов особо опасных инфекций достаточно хорошо отработаны, их описание содержится в соответствующих методических указаниях и рекомендациях, поэтому они могут использоваться в неизменном виде. Главной задачей, стоящей перед исполнителями Федеральной целевой программы, является новая дифференциация территории природных очагов чумы Нижнего Поволжья по уровню эпидемической опасности отдельных секторов с учетом сочетанности различных инфекционных болезней. На основе комплексного эпидемиологического районирования будет разработана новая методология эпизоотологического мониторинга, совмещающая способы эколого-эпизоотологических наблюдений за компонентами сочетанных природных очагов инфекций.

Работа выполнена по Государственному контракту № 110-Д от 11.06.2009 г. в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Журавлев В.И. Эпидемиологические и экологические аспекты циркуляции арбовирусов на территории Астраханской области [автореф. дис. ... канд. мед. наук]. Саратов, 2002.
2. Краснова Е.М. Эпидемиологические особенности лихорадки Западного Нила в Волгоградской области и совершенствование ее профилактики [автореф. дис. ... канд. мед. наук]. Волгоград, 2001.
3. Кузнецов А.А. Совершенствование мониторинга за очагами чумы песчаночьего и крысиного типов на основе анализа эколого-эпизоотологических закономерностей их функционирования [автореф. дис. ... д-ра биол. наук]. Саратов, 2005.
4. Кузнецов А.А., Безмертный В.Е., Матросов А.Н., Кологоров А.И., Кабин В.В. Стратегия и тактика эпизоотологического мониторинга за природными очагами чумы Нижнего Поволжья. Противочумные учреждения России и их роль в обеспечении эпидемиологического благополучия населения страны: Матер. конф. М., 2004:36–8.
5. Кузнецов А.А., Кутырев В.В., Матросов А.Н., Топорков В.П. Совершенствование мониторинга за природными очагами чумы на основе анализа эколого-эпизоотологических закономерностей их функционирования. Пробл. особо опасных инф. 2004. 2(88):12–6.
6. Куклев Е.В., Минин Г.Д., Коробов Л.И., Степаненко А.Г., Фарвазова Л.А., Рожкова Е.В. и др. Природно-очаговые инфекции в Приволжском федеральном округе: структура и динамика

заболеваемости. Сообщение 5. Анализ заболеваемости туляремией с 1980 по 2002 год. Пробл. особо опасных инф. 2004; 2(88):22–4.

7. Матросов А.Н. Совершенствование эколого-эпизоотологического мониторинга и неспецифической профилактики в природных очагах чумы на территории российской Федерации [автореф. дис. ... д-ра биол. наук]. Саратов, 2007.

8. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Кривуля С.Д., Федоров Ю.М., Топорков В.П. Стратегия борьбы с инфекционными болезнями и санитарная охрана территорий в современных условиях. Пробл. особо опасных инф. 2006; 2(92):5–9.

9. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В. О научно-методическом обеспечении реализации решений стран «Группы восьми», принятых в 2006 г., в области борьбы с особо опасными инфекционными болезнями. Пробл. особо опасных инф. 2007; 2 (94): 5–10.

10. Попов Н.В., Калошина Л.А., Куклев Е.В., Корнеев Г.А., Кузнецов А.А., Матросов А.Н. и др. Современные аспекты стратегии и тактики мониторинга природных очагов чумы Российской Федерации. РЭТ-инфо. 2001. 2: 14–6.

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

12. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.; 2004. 192 с.

13. Санджиев В.Б.-Х., Подсвилов А.В., Князева Т.В., Яшкуллов К.Б., Попов Н.В., Сангаджиева Г.В. и др. О природной очаговости Крымской геморрагической лихорадки в Республике Калмыкия. Пробл. особо опасных инф. 2006; 1(91):28–30.

14. Ушаков В.А. Сочетанность природных очагов зоонозов: современное состояние проблемы (обзор литературы). Мед. паразитол. и паразитарн. бол. 2004; 3:43–8.

15. Щербакова С.А. Распространение и экология вирусов Батаи, Тягина и ИНКО (семейство *Bunyaviridae*) в Нижнем Поволжье [автореф. дис. ... канд. биол. наук]. Саратов, 1996.

Об авторах:

Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Князева Т.В., Поршаков А.М., Попов Н.В., Куклев Е.В., Щербакова С.А., Топорков В.П. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Осипов В.П. Астраханская противочумная станция. Астрахань.

A.A.Kuznetsov, A.N.Matrosov, V.P.Ossipov, T.V.Knyazeva, A.M.Porshakov, N.V.Popov, E.V.Kouklev, S.A.Scherbakova, V.P.Toporkov

Principles of Management of the Epizootiologic Monitoring of Combined Natural Foci of Plague and Other Dangerous Infectious Diseases in the Lower-Volga Region

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov; Astrakhan Plague Control Station

Based on the experience of the long-term epizootiologic survey in the natural foci of plague, determined were the principles of usage of the developed methodology of monitoring of the dangerous infectious diseases combined with plague. The methods of collection of the field material to identify the agents of different infections were suggested. Prospects of complex differentiation of territory according to the level of epidemic danger were considered. The tasks of further study of the areas, spatial and biocenotic structure of combined natural foci of plague and other dangerous infections were formulated.

Key words: combined natural foci of infections, plague, epizootiologic monitoring, epizootiologic survey.

Authors:

Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Knyazeva T.V., Porshakov A.M., Popov N.V., Kouklev E.V., Scherbakova S.A., Toporkov V.P. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Ossipov V.P. Astrakhan Plague Control Station. Astrakhan.

Поступила 20.10.09.

М.В.Пчелинцева, М.Н.Ляпин

НОРМАТИВНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ БИОБЕЗОПАСНОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКИХ БРИГАД*ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

Проведен анализ нормативно-методической документации, действовавшей на различных этапах, выделяемых в соответствии с решаемыми задачами, штатным расписанием и табелем оснащения специализированных противочумных бригад (СПЭБ). Обоснована необходимость создания отдельного нормативного документа, включающего требования по обеспечению биобезопасности (ББ) при функционировании СПЭБ. Определено направление дальнейшего совершенствования нормативно-методического обеспечения ББ в условиях практической реализации концепции модернизации, включающее разработку пакета инструктивно-методических документов, детализирующих выполнение основных положений Регламента и разработку системы управления, основанной на анализе риска.

Ключевые слова: обеспечение биобезопасности, СПЭБ, нормативная документация.

В настоящее время, в соответствии с решениями саммита стран «Группы восьми» (2006 г.) [5] и предпринимаемыми усилиями по укреплению международных сил оперативного реагирования на возникающие чрезвычайные ситуации в области здравоохранения [18], происходит модернизация российских специализированных противочумных бригад [37].

В ходе модернизации, для осуществления специфической индикации возбудителей инфекционных болезней в объектах окружающей среды, лабораторной диагностики возникших инфекционных болезней и санитарно-микробиологического контроля внешней среды, в практику функционирования СПЭБ внедрены мобильные модульные лаборатории (ММЛ) – на базе автотранспорта повышенной проходимости и/или пневмокаркасных систем, оснащенных современным высокотехнологичным оборудованием для лабораторных исследований [12, 37].

Важнейшее условие при проведении всех видов работ с возбудителями инфекционных болезней, закрепленное законодательно [20, 21, 28] и нормативно [1, 2, 30, 31] – обеспечение безопасности для персонала, населения и окружающей среды [22]. Данное положение является одним из основных принципов функционирования СПЭБ. Это означает, что происходящая модернизация должна учитывать современные тенденции в области безопасности при работе с патогенными биологическими агентами (ПБА), то есть обеспечивать необходимый уровень защиты персонала и окружающей среды, соответствующий как требованиям российских нормативных документов, так и требованиям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [12, 37, 40].

Нормирование как механизм государственного регулирования играет важную роль в обеспечении безопасности деятельности с использованием ПБА и отражает современный уровень знаний об опасности. Чем детальнее удастся охарактеризовать природу, имманентные механизмы и условия реализации

опасности, тем адекватнее определяется комплекс средств и мероприятий, направленных на достижение приемлемого уровня опасности, т.е. обеспечение безопасности.

Таким образом, накопление новых знаний об известных патогенах, появление или идентификация новых возбудителей инфекционных болезней, разработка и внедрение новых технологий лабораторных исследований, средств и методов защиты персонала и окружающей среды являются предметом научного анализа и основой для совершенствования нормативной документации по обеспечению биологической безопасности при работе с ПБА.

Целью настоящей обзорной работы явился анализ нормативно-методической документации, действовавшей на различных этапах, выделяемых в соответствии с решаемыми задачами, штатного расписания и табеля оснащения СПЭБ, а также определение направлений дальнейшего совершенствования обеспечения ББ в условиях практической реализации концепции модернизации.

Об обеспечении безопасной работы с ПБА можно судить по содержанию приказов, регламентировавших организацию деятельности СПЭБ с момента их создания; нормативной документации и специальных инструкций, обязательных для исполнения всеми учреждениями, производящими работы с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителями инфекционных заболеваний; научных публикаций, посвященных деятельности СПЭБ.

Специализированные противочумные бригады были сформированы в 1963 г. приказом Министерства Здравоохранения СССР № 466. Их функции первоначально ограничивались специфической индикацией бактериальных средств поражения в системе мер гражданской обороны. Соответственно этому направлению работы штат бригады составлял всего 8 человек [41].

Создание СПЭБ не сопровождалось выпуском

профильных инструктивно-нормативных документов по обеспечению ББ деятельности.

Среди доступных для изучения, действовавших на момент создания СПЭБ, отечественных нормативов, содержащих требования к безопасности проведения работ с каким-либо возбудителем инфекционной болезни, была «Инструкция о режиме работы с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителем чумы», созданная для противочумных учреждений в 1956 г. [8]. Так как в структурно-функциональном отношении СПЭБ являются производными системы противочумных учреждений [23], можно предположить, что требования Инструкции учитывались как обязательные и для СПЭБ.

Введенный Инструкцией «противоэпидемический режим» предусматривал выполнение общих требований, касающихся: получения разрешения на проведение работ с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителем чумы; требований допуска персонала, имеющего специальную подготовку; допуска лиц в помещения, где проводятся работы с заразным материалом; вакцинации и диспансеризации персонала; термометрирования; использования защитной одежды; обеззараживания; охраны лаборатории; соблюдения требований противопожарной, противохимической защиты и противовоздушной обороны; порядка работы в бактериологических лабораториях и лабораториях для зараженных животных; производственных отделах; алгоритма действий по ликвидации аварий, порядка изоляции и госпитализации заболевших сотрудников или допустивших аварию во время работы с заразным материалом; порядка работы в госпиталях или изоляторах; зоологической и паразитологической работы; требований, касающихся обсервации и дезинфекции в очагах и вскрытия трупов; выезда работников противочумных учреждений [8].

Наряду с условиями работы в стационарных лабораториях, в инструкции прописывались требования к организации и проведению исследований во временных противочумных подразделениях (эпидотряд, экспедиция), причем последние явно отличались, как менее строгие. Так, например, в стационарных условиях помещения лаборатории для экспериментов с животными должны были включать, как минимум, три комнаты, а во временных лабораториях было разрешено проводить исследования даже в одной комнате, площадь которой позволяла выделить отдельные рабочие места: для хранения полевого материала; зоологической обработки; первичной обработки паразитологического материала; вскрытия грызунов; содержания биопробных животных; «чистого» места с назначением предвскрыточной. Указывалось также, что бактериологическую лабораторию во временных учреждениях желательнее разворачивать в отдельной комнате, но при необходимости бактериологическую работу можно вести в той же комнате, что и вскрытие животных, при выделении отдельного постоянного

места и стола.

Инструкция о противоэпидемическом режиме содержала также методику безопасного удаления обеззараженных отходов в зависимости от нахождения на территории учреждения или в экспедиционных условиях, в малонаселенных или не населенных людьми местах [8].

Таким образом, действовавшая на момент создания СПЭБ Инструкция 1956 г., являлась единственным нормативным документом, прописывающим требования к организации и проведению работ с материалом, содержащим возбудителя чумы, который и в настоящее время оценивается как самый опасный патоген бактериальной природы. Инструктивное изложение содержания документа, высокая степень детализации требований, основанных на накопленном к тому времени опыте работы в учреждениях и в полевых условиях с заразным материалом, оказались востребованными в качестве основы обеспечения ББ при осуществлении деятельности СПЭБ.

Как известно, нормативная документация, а особенно инструктивная, не является долговечной. В дальнейшем происходила неоднократная смена основных отечественных инструктивно-нормативных документов, содержащих требования по обеспечению личной и общественной безопасности при работе с ПБА. Это было обусловлено следующими факторами:

- совершенствованием методов оценки опасности при работе с ПБА и накоплением научных знаний в области микробиологии, развитием системных подходов к созданию безопасных условий работы;
- повышением требований к инженерно-техническим системам обеспечения безопасности работ в микробиологических лабораториях;
- необходимостью обеспечения защиты от непреднамеренного выхода ПБА в окружающую среду, предотвращения доступа посторонних лиц в рабочие зоны и несанкционированного выноса опасных биологических агентов из лабораторий;
- появлением новых методов, средств и оборудования для лабораторных исследований и необходимостью регламентации безопасности их использования;
- тенденцией к унификации и стандартизации требований безопасного проведения работ с ПБА, в том числе с международными правилами.

Накопление научных знаний в области микробиологии и опыта работы с возбудителями инфекционных заболеваний, а также результаты целенаправленных исследований, проведенных за рубежом, позволили сделать выводы о том, что при создании безопасных условий необходимо учитывать особенности микроорганизма и проводимых процедур в плане их потенциальной опасности [29, 48]. Данное положение нашло отражение и в Инструкции по режиму работы с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителем чумы [8].

Так как возбудитель чумы способен вызывать за-

болевание, отличающееся особой тяжестью, высокой частотой летального исхода и возможностью эпидемического распространения, требования к режиму проведения работ с таким высокоопасным микроорганизмом легли в основу вступившей в действие в 1967 г. [9] и сменившей ее в 1975 г. «Инструкции по режиму работы с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителями чумы, холеры, сапа, мелиоидоза, натуральной оспы, сибирской язвы, туляремии и бруцеллеза» [7].

В дальнейшем под эгидой ВОЗ были сформированы рекомендации, согласно которым основой для национальной регламентации условий работы с ПБА является классификация микроорганизмов по степени их опасности – непосредственной опасности для персонала и опасности последствий попадания в окружающую среду [32]. В соответствии с международными рекомендациями, в 1979 г. в названии основного норматива по правилам безопасной работы с ПБА содержится указание на классификацию микроорганизмов, что отражается и в названии документа – «Инструкция о противоэпидемическом режиме работы с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителями инфекционных заболеваний I–II групп» [6].

Анализ отечественных нормативных документов показал, что с накоплением знаний о потенциальной опасности деятельности с использованием ПБА для персонала, населения и окружающей среды требования безопасности видоизменялись: повышались, дополнялись, или упразднялись некоторые положения. Однако круг регламентируемых вопросов оставался прежним, и наблюдалось наличие общих для всех Инструкций положений, что говорит об их принципиальном характере.

Неизменными оставались требования: о наличии разрешения на работу с ПБА для учреждения (подразделения), допуска персонала имеющего специальную подготовку; о вакцинации, диспансеризации, ежедневной термометрии персонала; о соблюдении особых правил поведения в лаборатории; о изоляции заболевших или совершивших аварию, или оказавшихся в зоне аварии; о использовании защитной одежды; об обязательном обеззараживании; об охране лаборатории. Принципиальным оставался подход к регламентации типа защитной одежды в зависимости от вида возбудителя и потенциальной опасности производимых работ.

Повышение требований в основном касалось инженерно-технической и организационной деятельности. Так, например, по сравнению с требованиями Инструкции 1956 г. [8], в последующих редакциях расширился обязательный набор помещений лаборатории, регламентировано наличие автоклавной для обеззараживания (1967 г.) [9]. Помещения для бактериологических исследований дополняются предбоксами (тамбурами). Блок для работы с инфицированными животными оснащается помещениями для одевания, снятия и обеззараживания защитных

костюмов. Вводится важное положение о снабжении блоков для работы с заразным материалом автономной системой приточно-вытяжной вентиляции с фильтрами тонкой очистки на выходе, а для обеззараживания воздуха помещений регламентируются бактерицидные лампы (1979 г.) [6]. Появляется регламентация проведения работ с наиболее опасными микроорганизмами (вирусы I группы) в лабораториях максимальной безопасности и основных условий их функционирования – наличие системы боксов-укрытий, исключающих непосредственный контакт сотрудников с заразным материалом, снабженных высокоэффективными защитными фильтрами для обеззараживания выходящего воздуха, установка проходного (двухдверного) автоклава с автоматической блокировкой дверей, наличие санпропускника на границе заразного отделения и чистой части лаборатории. Указаны правила работы в защитном боксе (1979 г.) [6].

В 1979 г. впервые в отечественной регламентации условий безопасной работы с ПБА появляется указание на деление помещений лаборатории на «заразную» и «незаразную» («чистую») зоны. Это позволило рассматривать зонирование подразделений как универсальный алгоритм для регламентации работ, связанных с использованием ПБА, независимо от принадлежности к группам опасности [22].

Важным организационным моментом стало появление в 1967 г. принципиально неизменного в последующих документах требования об обязательном контроле за осуществлением противоэпидемического режима работы с заразным материалом, или подозрительным на зараженность возбудителями ООИ в учреждении. В 1975 г. установлен специальный порядок его осуществления с участием специально формируемого органа – режимной комиссии [7].

Также к мероприятиям организационного характера, направленным на усиление контроля за деятельностью с использованием ПБА, следует отнести введение требований учета в специальных журналах движения ПБА, проведения обеззараживания, учета посещений заразного отделения лаборатории, входного контроля дезсредств, контроля работы автоклава [6, 7, 9].

Возможность непреднамеренного выхода ПБА в окружающую среду и преднамеренного использования возбудителей заболеваний человека, животных и растений, токсинов, оборудования и технологий в террористических и криминальных целях определили тенденцию к усилению мер физической защиты лаборатории, а также контроля за выполнением требований противоэпидемического режима [13, 19, 24].

Об усилении мер физической защиты лабораторий можно судить по повышению в Инструкции 1975 г. [7] требований к охране лаборатории и появлению новых – наличие сигнализации и решеток на окнах.

Следует, однако, отметить, что приведенные выше положения касались, в основном, стационар-

ных лабораторий, занятых исследованием материала, подозрительного или заведомо зараженного возбудителями I–II групп патогенности. В нестационарных условиях («эпидотряды, экспедиции») лаборатории могли размещаться в приспособленных и оборудованных соответствующим образом зданиях (палатках, юртах, вагонах-лабораториях, автолабораториях и др.), но все они должны обеспечивать соблюдение правил личной и общественной безопасности при работе» [6, 7, 8, 9]. Более подробных сведений не приводилось. Очевидно, что деятельность СПЭБ также следовало относить к нестационарным условиям.

Таким образом, можно констатировать, что на территории Советского Союза к началу восьмидесятых годов прошлого столетия действовавшая нормативная документация по обеспечению биологической безопасности при работе с патогенными микроорганизмами, в части касающейся стационарных лабораторий, в основном отвечала международным тенденциям в данной области. Нормативная документация, регламентирующая биологически безопасную деятельность СПЭБ, отсутствовала. Однако о том, что требования противоэпидемического режима выполнялись при работе СПЭБ, можно судить по анализу научных публикаций.

Наиболее подробно вопросы обеспечения биологически безопасного функционирования СПЭБ в зоне ЧС, вызванной землетрясением в Армении в 1988 г., при разрушенной инфраструктуре коммунального хозяйства и санэпиднадзора отражены в статье А.М.Кокушкина и соавт. [11].

В соответствии с действовавшей на время ликвидации последствий землетрясения нормативной документацией [6], учитывая, что в лабораториях проводилась работа с материалом, подозрительным на зараженность возбудителями инфекционных заболеваний I–II групп, лагерь развертывания СПЭБ охранялся подразделениями МВД СССР.

Соблюдение правил личной и общественной безопасности при работе обеспечивалось следующими решениями. Территория лагеря была разделена на две зоны. В «чистой» зоне поставлены палатки для жилья, изолятора, мочной, оперативного штаба и склада с имуществом. Там также находились электрогенераторы, емкости с топливом и питьевой водой. В «заразной» зоне были расположены две бактериологические лаборатории, оборудована площадка для санитарной обработки транспорта, яма для сбрасывания обеззараженных объектов. На территории развертывания подразделений противоэпидемических бригад выделены пути движения персонала и поступления материала. На границе «чистой» и «заразной» зон организован санитарный пропускник. Расположение жилых и производственных подразделений, развернутых в палатках УСБ-56 и УСТ-10, обусловлено требованиями противоэпидемического режима, а также конфигурацией выделенной площадки. Размещение подразделений для работы с ПБА в палатках предусмотрено положениями о не-

стационарных лабораториях действующей на тот момент Инструкции [6].

В соответствии с Инструкцией бактериологические лаборатории имели следующие помещения: в лаборатории зоонозных инфекций – для приема и обработки полевого материала, заражения и вскрытия биопробных животных, содержания биопробных животных, снятия и обеззараживания противочумных костюмов I типа, бактериологические, серологическая и люминесцентная секции; для снятия и надевания противочумных костюмов IV типа и верхней одежды.

В лаборатории кишечных инфекций на отдельных рабочих местах проводили исследования объектов внешней среды, материала от людей на наличие возбудителей острых кишечных инфекций, выявление кишечной палочки в пробах пищевых продуктов, смывах с рук и других объектов. Требование Инструкции по обеспечению поточности продвижения поступившего на исследование материала обеспечивалось поступлением проб из объектов внешней среды и материала от людей, разделенных по времени и рабочим местам. Это позволило организовать два потока исследований, обеспечивающих жесткий контроль, с одной стороны, за качеством питьевой воды и пищи, а с другой – за инфекционной заболеваемостью ОКИ [11].

В материалах, представленных авторами статьи [11], нет указаний на наличие автоклавной, как обязательного помещения для заразного отделения, но, согласно действовавшей Инструкции [6], обеззараживание, кроме автоклавирования, можно было проводить кипячением, обработкой дезинфицирующими растворами, сжиганием.

Приведенные выше данные описывают реальную практическую картину функционирования СПЭБ, показывающую, что в вопросах обеспечения биобезопасности использовались положения действующих нормативных документов, сочетающих требования к стационарным (в меньшей степени) и к нестационарным (в большей степени) лабораториям, предназначенным для работы с материалом, зараженным возбудителями инфекционных болезней I–II групп патогенности. Полученные результаты, на наш взгляд, прямо указывают на необходимость создания отдельного документа, регламентирующего биологически безопасную сферу деятельности СПЭБ.

Положительный опыт работы по нормализации санитарно-эпидемиологической ситуации в районах, пострадавших от землетрясения, продемонстрировал эффективность использования СПЭБ в условиях ЧС, характеризующихся разрушением коммунальной инфраструктуры и структуры санэпиднадзора – задача, которая ранее не выставлялась. С целью дальнейшего повышения готовности противочумных учреждений к работе в чрезвычайных ситуациях был издан приказ № 35 от 31.01.1991 г. «О совершенствовании работы СПЭБ противочумных учреждений Минздрава СССР» [36].

Согласно утвержденному приказом Положению, СПЭБ являлась подвижным формированием и предназначалась для противоэпидемического обеспечения населения страны, включая случаи ухудшения санитарно-гигиенического состояния в экстремальных ситуациях, возникающих в результате стихийных бедствий. В зависимости от конкретной ситуации и возлагаемых задач предусматривалось использование СПЭБ как в полном, усиленном, так и ограниченном составе [36], что, очевидно, привело впоследствии к идее полифункциональности и модульности СПЭБ.

Вопросы обеспечения биобезопасности в документе не нормировались. Указывалось лишь, что при тренировочных занятиях личного состава бактериологического отделения должна осуществляться практическая отработка различных вариантов функционирования отделения с учетом оснащения рабочих мест, расстановки персонала, обеспечения противоэпидемического режима в различных приспособляемых для этой цели помещениях и палатках. На начальника СПЭБ возлагался контроль за соблюдением требований противоэпидемического режима [36]. Следовательно, учитывая то, что другого нормативного документа не существовало, регламентация работы СПЭБ осуществлялась в соответствии с требованиями действовавшей на тот период Инструкции 1979 г. [6].

В то же время информацию о состоянии обеспечения ББ можно получить при анализе табеля оснащения СПЭБ [36]. В нем предусматривалось наличие защитного оборудования (боксов максимальной защиты 7БП 10С, бокса складного защитного для биопробных животных, приспособления для безопасного пипетирования (баллончики); спецодежды и средств индивидуальной защиты (комбинезоны, лабораторная одежда из бактерицидной ткани, противочумный костюм, изолирующие средства индивидуальной защиты); клеенчатых мешков для упаковки инфицированной одежды; средств и оборудования для проведения обеззараживания (кипятильник дезинфекционный, облучатель бактерицидный настенный, дезсредства, репелленты, аппаратура и предметы для дезинфекции и дератизации); средств санитарной обработки персонала; средств специфической профилактики и терапии для совершивших аварию при работе с ПБА или заболевших; средств, необходимых для физической защиты ПБА от кражи и непреднамеренного использования (пломбиры, навесные замки, печати); средств регистрации учета движения заразного материала (журналы движения заразного материала, исследования биопробных животных, исследования воды на холеру, исследования грызунов, исследования объектов внешней среды, исследования эктопаразитов, учета анализов больных, учета выделенных культур, этикетки, бланки паспорта культуры, направления материала на исследование). Связь обеспечивалась наличием радиостанции, энергоснабжение – дизельной электростанцией. Для проведения микробиологических ис-

следований, в случае отсутствия приспособленных помещений, предусматривались специализированные палатки [36].

Таким образом, анализ табеля оснащения указывает на тенденцию к повышению обеспечения уровня безопасности работ с ПБА, о чем свидетельствует включение в перечень оборудования боксов безопасности, что, безусловно, приближает условия работы персонала к требованиям, предъявляемым к стационарным лабораториям. При этом личный состав отработывал и другие варианты развертывания лабораторий в приспособленных помещениях и палатках в зависимости от особенностей эпидемической обстановки, этиологии вспышек и поставленных задач. Перечень средств индивидуальной защиты соответствовал таковому для работы в стационарных лабораториях.

Поскольку комплектование личным составом производилось из числа персонала работающего в ПЧУ и при необходимости дополнялось специалистами других медицинских учреждений, можно полагать, что критерии допуска сотрудников к работе с ПБА в составе СПЭБ были аналогичны критериям, выставленным в нормативном документе и применяемым в противочумных учреждениях.

Обобщая представленный материал за тридцатилетний период, основываясь на содержании действовавших инструкций о противоэпидемическом режиме при работе с патогенными микроорганизмами и приказов о создании и совершенствовании деятельности СПЭБ, можно сделать следующее заключение. Создание СПЭБ не сопровождалось изданием нормативного документа, регламентирующего биологически безопасную деятельность. Формально развертываемые лаборатории СПЭБ не упоминаются как стационарные, что вполне логично, но также формально эти лаборатории не перечисляются в списках временных. Тем не менее, в изданных приказах содержится указание на выполнение требований противоэпидемического режима. В практических же условиях, на примере работы в зоне землетрясения, для обеспечения биологически безопасной деятельности применялись положения требований, относящихся как к стационарным лабораториям, так и временным. По сути, выполнялись принципы обеспечения безопасности, а способы и средства могли при этом различаться.

Международный опыт работы с возбудителями инфекционных болезней, представленный в том числе и в национальных руководствах ряда стран (США, Канада) [27, 48], был обобщен в виде рекомендаций ВОЗ по биологической безопасности для микробиологических лабораторий [32, 33]. Термин «biosafety» – биологическая безопасность, прочно вошел в понятийный аппарат деятельности, связанной с использованием патогенных биологических агентов в микробиологических лабораториях [13]. Введенные на территории бывшего Советского Союза в 70-х годах прошлого столетия государствен-

ные стандарты [4, 25], содержащие определение о том, что биологическую опасность представляют микро- и макроорганизмы, способные нанести вред здоровью человека, также способствовали постепенному вытеснению отечественной формулировки «свод правил противоэпидемической работы» или «противоэпидемический режим».

В документе ВОЗ 1993 г. (русскоязычный перевод издан в 1994 г.) [32], помимо распределения различных инфекционных микроорганизмов по группам опасности, дается классификация лабораторий с учетом их назначения, конструкции, используемого оборудования и мер безопасности. Приводится сопоставление групп опасности с уровнями биобезопасности, а также требования к четырем различным уровням биобезопасности, по следующим основным параметрам: изоляция лаборатории; герметичные камеры для обеззараживания; особенности устройства вентиляции; обработка сточных вод; автоклавирование; использование боксов биологической безопасности. Рекомендации ВОЗ предназначались для национальных систем здравоохранения различных государств с целью распространения передового опыта и стремления к унификации и стандартизации обеспечения ББ при работе в микробиологических лабораториях.

В 1994 г. вступили в действие санитарные правила (СП) «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности» 1.2.011-94 [3], сменившие Инструкцию о противоэпидемическом режиме [6], которые впервые содержали в названии термин «безопасность» и были составлены с учетом классификации патогенных для человека микроорганизмов по группам. Отечественный нормативный документ также содержал классификацию микробиологических лабораторий, однако она несколько отличалась от предложенной ВОЗ. Например, требования к планировке, внутренней отделке, оформлению помещений и оснащению оборудованием варьировали в зависимости от поставленных задач среди пяти типов стационарных лабораторий, выделяемых в нормативном документе. Важным в методологическом отношении явилось введение зонирования помещений, а в ряде случаев и территории учреждений, предусматривающего выделение трех зон – «чистой», «условно-заразной» и «заразной». Не вдаваясь в детали, можно сказать, что в целом санитарные правила соответствовали рекомендациям ВОЗ. В меньшей степени отвечали рекомендациям временные лаборатории, требования к которым были менее жесткими [3].

Внесение изменений в основные нормативы по обеспечению безопасности при работе с ПБА, в том числе и терминологических, нашли свое отражение в регламентации деятельности СПЭБ. В Положении 1996 г. [34] впервые указано, что одной из основных задач СПЭБ в чрезвычайном режиме является развертывание подразделений в приспособляемых помещениях или палатках с учетом требований биологической безопасности.

В случае оснащения СПЭБ палатками для развертывания лабораторной базы, стало возможно применение положений о временных лабораториях СП 1.2.011-94 [3]. В СП указано, что в нестационарных условиях лаборатории могут размещаться в приспособленных и оборудованных соответствующим образом зданиях, палатках, юртах, вагонах-лабораториях, автолабораториях и др. При этом необходимо стремиться к наиболее полной изоляции помещений временных лабораторий от внешней среды, а также использованию для оснащения пылевлагодонепроницаемых, устойчивых к действию дезинфектантов материалов. В одной общей комнате, разделенной легкими перегородками или пленкой (тканью), могут быть организованы следующие рабочие места: для хранения добытых грызунов и другого полевого материала; их зоологической обработки; первичной обработки паразитологического материала; вскрытия грызунов; содержания биопробных животных; снятия и обеззараживания защитной одежды. Необязательным становилось условие наличия предбокса для бактериологической комнаты. Санитарный пропускник допускалось размещать в одном помещении, где оборудовались отдельные места для хранения личной и рабочей одежды [3].

Таким образом, требования к помещениям и оборудованию для временных лабораторий регламентировались положениями общего характера, не противоречащими предъявляемым к стационарным лабораториям, но менее жесткими, без инструктивной детализации. Было учтено наличие изоляции, зонирования, возможность обеззараживания поверхностей. Реализация общих принципов осуществлялась средствами и оборудованием, предусмотренным в таблице оснащения СПЭБ.

Итак, в основных документах по организации деятельности СПЭБ было установлено обязательное требование по обеспечению ББ работ, учтены средства и оборудование, необходимые для обеспечения ББ. Однако детально требования биологически безопасной деятельности СПЭБ с учетом вариантов функционирования в различных ситуациях, применяемых технологий, средств и оборудования ни в основных документах по организации деятельности СПЭБ, ни в отдельном нормативном документе не определены.

Необходимость создания норматива, обобщающего и одновременно отражающего особенности функционирования СПЭБ в условиях ЧС (в том числе, затрагивающего вопросы обеспечения ББ), поддерживалась рядом ученых. Так, в ходе анализа проведения ликвидаций чрезвычайных эпидемических ситуаций А.М.Кокушкин и А.Ф.Касьян [10] пришли к выводу о том, что, несмотря на специфические особенности, возникающие в каждой конкретной ЧС эпидемического характера, требующие оперативных неординарных решений, разработка стратегии и тактики для типовых ситуаций позволяет сократить время принятия организационных решений и

предотвратить возможные ошибки. Заключительным этапом ликвидации ЧС должен быть анализ адекватности проведенных мероприятий и эффективности отдельных этапов, а в дальнейшем корректировка нормативных документов и скорейшее их включение в программы подготовки личного состава. Учитывая экстремальную обстановку, складывающуюся при ЧС, ученые предложили привлекать к работе в СПЭБ специалистов, имеющих опыт организации необходимых мероприятий и практической работы по выполнению комплекса лабораторных и эпидемиологических исследований, а также психологически, теоретически подготовленных и материально оснащенных для работы в сложных условиях.

Результаты проведенного анализа использования СПЭБ в зонах ЧС, в процессе противоэпидемического обеспечения спасательно-восстановительных работ в условиях разрушенной системы территориального здравоохранения [10], внедрение нового специального оборудования для лабораторного исследования [41, 26], определили необходимость разработки методических документов по вопросам деятельности СПЭБ [17, 26].

В методических указаниях по организации и проведению работы СПЭБ в чрезвычайных ситуациях [26] в функциональные обязанности личного состава входили положения, связанные с обеспечением ББ: обязательное специальное обучение; практическая подготовка по вопросам безопасной работы с материалом, зараженным возбудителями инфекционных болезней; ответственность за обеспечение ББ при осуществлении деятельности; укомплектование СПЭБ средствами, необходимыми для обеспечения ББ персонала и окружающей среды. В документе детально освещены некоторые вопросы физической защиты подразделений СПЭБ (охрана в зоне конфликтных ЧС, вопросы безопасности при круглосуточной работе, наличие удостоверений у персонала, запрет доступа посторонних лиц в «заразную» и «условно-заразную» зоны). Также представлена примерная схема размещения функциональных групп бактериологического отделения СПЭБ с описанием отнесения помещений к «заразной», «условно-заразной» и «чистой» зонам, путей движения материала. Обеспечение безопасности работы с микроорганизмами I–II групп патогенности, согласно ссылке, указанной в данном документе, должно было осуществляться в соответствии с СП 1994 г.

Итоги рассмотрения опыта работы СПЭБ в зоне ЧС позднее нашли отражение в методическом руководстве по специальной подготовке СПЭБ для работы в ЧС [17]. В тематическом плане предусмотрена теоретическая и практическая подготовка личного состава по вопросам развертывания подразделений в приспособляемых помещениях или палатках с учетом требований ББ; организации и проведения дезинфекционных, дезинсекционных и дератизационных мероприятий в бактериологических (вирусологических) лабораториях в зоне ЧС; медицинского

обеспечения и психологической подготовки личного состава для работы в ЧС.

Приказ о деятельности СПЭБ (1996 г.) ввел понятие «биологическая безопасность», вместо используемых ранее «противоэпидемический режим» или «режим работы с заразным материалом» [34], что отразило тенденции развития нормативной документации в данной области. Однако отдельного документа, регламентирующего требования безопасности работ с ПБА в рамках выполняемых СПЭБ задач, в том числе в условиях ЧС, не существовало. Регламентация ББ осуществлялась в соответствии с требованиями действовавших санитарных правил по безопасности работ с ПБА [3], способы и средства, выполнения которых были обусловлены имеющимся оснащением и условиями развертывания/размещения СПЭБ. В методических документах по организации работы СПЭБ в условиях ЧС и подготовке личного состава более детально были отражены лишь некоторые вопросы обеспечения ББ функционирования СПЭБ.

Необходимость отдельной регламентации обеспечения биобезопасного функционирования СПЭБ наиболее остро возникла после 2003 г., что было вызвано, с одной стороны, расширением задач СПЭБ, а с другой – изменением требований нормативной документации по безопасности работ с ПБА.

В 2003 г. издан очередной приказ о совершенствовании организации работы СПЭБ противочумных учреждений [35]. Его введение было вызвано изменениями в структуре подчиненности, а также выставлением новых задач, согласно которым требовалось осуществлять индикацию возбудителей инфекционных болезней независимо от их природы в объектах окружающей среды [41].

Согласно таблице оснащения выполнение лабораторных исследований предполагалось проводить в приспособляемых помещениях или палатках, а также на базе автолабораторий АЛ-3 или АЛ-4 с учетом требований биобезопасности [35]. Как и в более ранних документах детальных требований по обеспечению ББ вышедший приказ не содержал.

Обеспечение биобезопасности должно было осуществляться в соответствии с принятыми в 2003 г. санитарно-эпидемиологическими правилами «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» 1.3.1285-03 [1], однако новая редакция правил содержала изменения, затрудняющие выполнение некоторых требований средствами и оборудованием, присутствующим в таблице оснащения СПЭБ [35].

В соответствии с тенденцией к унификации санитарных правил с международными, действующими в области биобезопасности [19, 22], произошло изменение структуры документа: разукрупнение, введение новых подразделов (требования к медицинскому наблюдению за персоналом; дополнительные требования к диагностическим, экспериментальным и максимально изолированным лабораториям;) ликвидация ряда подразделов, в том числе, что особо

важно, положения о временных лабораториях. Кроме того, изложение материала было представлено в виде основных положений с детализацией в документах иерархически стоящих ниже. В результате введения универсального алгоритма – деление на две зоны («чистая» и «заразная») для работы с ПБА, независимо от группы опасности [22], изменилось зонирование подразделений, учреждения – исключена «условно-заразная» зона.

Унификация СП 1.3.1285-03 2003 г. с международными рекомендациями определила возрастание и конкретизацию требований к инженерным системам микробиологических лабораторий. Их основными особенностями стали: наличие перепада давлений между зонами и постоянного направленного потока воздуха в сторону «заразной зоны»; обработка жидких стоков; обработка отходов путем автоклавирования через двухдверный автоклав; установка вентиляции с фильтрами тонкой очистки воздуха на выходе из лаборатории; применение боксов биобезопасности 2-го и 3-го классов [1, 19]. Учитывая крупные габариты оборудования, трудности, связанные с его перемещением и монтажом, отсутствие герметизации помещений, реализация изложенных выше требований в лабораториях, разворачиваемых в палатках или приспособляемых помещениях, представляются практически невыполнимыми.

Необходимость создания отдельного нормативного документа, регламентирующего биологически безопасную деятельность СПЭБ, становится очевидной [15, 16, 39, 45].

Современный этап организации деятельности СПЭБ связан с решением саммита стран «Группы восьми» 2006 г. Главы Государств приняли обязательство укреплять существующие сети по борьбе с последствиями стихийных бедствий и техногенных катастроф путем использования команд быстрого реагирования. К таким формированиям в Российской Федерации относятся и СПЭБ противочумных учреждений Роспотребнадзора.

Практическая реализация решений Санкт-Петербургского саммита «Группы восьми» (2006 г.) стала возможной с принятием 21 мая 2007 г. Распоряжения Правительства Российской Федерации № 642-р, предусматривающего финансирование мероприятий по модернизации СПЭБ, сформированных на базе ФГУЗ «Научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора [38]. В процессе модернизации СПЭБ усилия были направлены на создание высокотехнологичных мобильных модульных лабораторий (ММЛ), отвечающих по критериям ББ современным национальным и международным требованиям [40].

В соответствии с международными требованиями уровень биологической безопасности лаборатории для проведения работ с возбудителями инфекционных болезней должен отвечать определенным критериям [33]. В отечественной нормативной документации не выделяются уровни безопасности лабо-

раторий. Требования к ее обеспечению для ПБА I–II групп прописываются относительно видов микроорганизмов и характера выполняемых работ, а также дифференцируются по видам деятельности: диагностическая; экспериментальная; производственная [1, 30]. Выполнение поставленных перед СПЭБ задач, решаемых в рамках лабораторных исследований, относится к диагностическому виду деятельности. Анализ перечня возбудителей инфекционных болезней, выявляемых в лабораториях СПЭБ, в сопоставлении с регламентированными алгоритмами и методами исследований материала [40], показал, что уровень безопасности ряда лабораторий, если судить по требованиям для стационаров, должен соответствовать BSL-3 по классификации ВОЗ.

В тоже время, задачи, выставляемые перед СПЭБ, наличие отдельных модулей и возможная тактика их самостоятельного применения, ограничения габаритов помещений лабораторий, в первую очередь базирующихся на автошасси, проблематичность оснащения крупногабаритным оборудованием и другие не менее важные и острые вопросы, приводят к заключению о невозможности полного соответствия ММЛ требованиям, предъявляемым к стационарным лабораториям.

Как показали результаты ретроспективного исследования основных национальных документов, опыт практической работы стационарных и временных лабораторий, включая использование СПЭБ, регламентация требований ББ присутствовала всегда, изменения касались только того какими способами, в каком объеме и какими средствами они осуществлялись.

В действующих СП, ББ определена как «система медико-биологических, организационных и инженерно-технических мероприятий и средств, направленных на защиту работающего персонала, населения и окружающей среды от воздействия патогенных биологических агентов» [1]. Наиболее консервативным в этой системе является медико-биологический элемент, изменения в котором могут быть связаны с появлением новых средств лечения либо профилактики, что происходит нечасто. Организационный компонент отличается наибольшей зависимостью от «человеческого фактора», поэтому там, где это возможно при обеспечении ББ предпочтение отдается инженерно-техническим мероприятиям и средствам. Анализ оснащения ММЛ и их функционального назначения, показал, что, комплекс инженерно-технических средств, используемый в ММЛ на базе автошасси, в большей степени отвечает требованиям BSL-3, нежели пневмокаркасные модули, в которых ведущую роль играет организационный компонент обеспечения безопасности.

Результаты сравнительного анализа основных отечественных нормативных документов [1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 30, 31], зарубежных руководств и стандартов [27, 46, 48, 49], а также международных рекомендаций в области обеспечения ББ в лабораторных

условиях [32, 33, 47] позволили выделить главные принципы обеспечения биобезопасности и, с учетом специфики деятельности, применить их при подготовке Регламента (стандарта) функционирования СПЭБ при ликвидации медико-санитарных последствий чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера [40], утвержденного приказом Роспотребнадзора № 330 от 22 ноября 2007 г.

Вступивший в силу Регламент не только закрыл возникший пробел в нормативной документации. В нем впервые за время существования СПЭБ с системных позиций изложены положения о функционировании в виде стандартных требований. Данный подход позволил унифицировать вопросы обеспечения ББ и поставить их в одном ряду с требованиями действующих СП, предъявляемыми к стационарным лабораториям. Так, для подразделений СПЭБ стало обязательным наличие санитарно-эпидемиологического заключения о наличии условий для проведения работ с микроорганизмами возбудителями инфекционных болезней, что подтверждает легитимность деятельности в соответствии с законодательством Российской Федерации. Как в стационарных, так и в лабораториях СПЭБ следует, в соответствии с СП и Регламентом, разрабатывать пакет инструктивно-методических документов, детализирующих способы и средства выполнения требований нормативной документации в процессе работы.

Наличие общих требований в изученных нормативных документах и рекомендациях в области ББ, показывает, что соблюдение содержащихся в них основных принципов обеспечивает безопасные условия для персонала, населения и окружающей среды. Тем не менее, процесс реализации базовых требований должен быть детально отражен в документах инструктивного и методического характера, учитывающих конкретные задачи, функции, оснащение, используемые технологии, штат и объем проводимых исследований для каждой ММЛ, как в составе СПЭБ, так и при выполнении отдельных самостоятельных задач [15, 16, 45]. Современные тенденции осуществления этого, определяемые международно поддерживаемым направлением, называемым «управление биориском», методологически основаны на анализе риска [13, 14, 47, 48, 49].

Анализ риска включает мониторинг, нацеленный на выявление, описание опасностей при работе с ПБА, регистрацию инцидентов и аварий и введение информации в базу данных для последующего анализа с целью коррекции мероприятий, при которых риск для персонала и окружающей среды будет приемлемым [42, 43, 44, 49].

Таким образом, проведенный анализ нормативно-методической документации по обеспечению ББ функционирования СПЭБ позволяет сделать следующие выводы:

Создание СПЭБ не сопровождалось выпуском профильного нормативного документа по обеспечению ББ деятельности. Учитывая условия разверты-

вания в палатках или приспособленных помещениях, ББ обеспечивалась выполнением требований, предъявляемых в соответствии с действовавшими нормативами к «временным противочумным учреждениям». Последние отличались меньшей жесткостью по сравнению с требованиями, предъявляемыми к стационарным лабораториям.

Эволюция нормативного обеспечения ББ сопровождалась повышением требований в большей степени к дизайну лабораторий, инженерно-техническим мероприятиям и средствам, что в условиях функционирования СПЭБ не всегда оказывалось возможным, приводя к потере таких значимых качеств, как мобильность и оперативность. Отсутствие соответствующего оборудования, обеспечивающего биобезопасность, компенсировалось за счет организационных мероприятий. Возрастала степень несоответствия условий функционирования СПЭБ действующей нормативной документации. Очевидной стала необходимость создания отдельного нормативного документа, регламентирующего работу СПЭБ с патогенными микроорганизмами.

Анализ отечественной нормативной документации и мировых тенденций в области обеспечения биологической безопасности позволил выделить основные положения и применить их при подготовке Регламента (стандарта) функционирования СПЭБ при ликвидации медико-санитарных последствий ЧС природного и техногенного характера.

Вступивший в силу Регламент позволил унифицировать вопросы обеспечения ББ при работе СПЭБ, поставив их в одном ряду с требованиями действующих СП, предъявляемыми к стационарным лабораториям.

Дальнейшие направления совершенствования биологически безопасной деятельности СПЭБ включают: разработку пакета стандартных операционных процедур, других инструктивно-методических документов, детализирующих выполнение основных положений Регламента; разработку системы управления, основанной на мониторинге опасностей при работе с ПБА, включающей создание специализированной базы данных об инцидентах и авариях при работе с ПБА, что будет являться основой для оценки биориска и принятия решений по поддержанию условий проведения работ с ПБА, при которых риск для персонала и населения будет приемлемым.

Работа выполнена по Государственному контракту № 109-Д от 11.06.2009 г. в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). Санитарно-эпидемиологические правила. СП 1.3.1285–03. Бюл. нормат. и метод. документов госсанэпиднадзора 2003; 3(13):45–144.
2. Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.2322–08.

Утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 28 января 2008 г. N 4.

3. Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности: Санитарные правила СП 1.2.011-94. М.: Информационно-издательский центр Госкомэпиднадзора России. 152 с.

4. Биологическая безопасность. Общие требования. ГОСТ 12.1.008-76.

5. Борьба с инфекционными болезнями. Документы саммита «Группы восьми». Санкт-Петербург, 16 июля 2006года. <http://g8russia.ru/docs/10/html>.

6. Инструкция о противоэпидемическом режиме работы с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителями инфекционных заболеваний I-II групп». Саратов; 1979.

7. Инструкция о противоэпидемическом режиме работы с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителями чумы, холеры, сапа, мелиоидоза, натуральной оспы, сибирской язвы, туляремии и бруцеллеза. Алма-Ата, 1975.

8. Инструкция о режиме работы с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителем чумы. Саратов; 1956.

9. Инструкция по режиму работы с материалом, зараженным или подозрительным на зараженность возбудителями чумы, холеры, сапа, мелиоидоза, натуральной оспы, сибирской язвы, туляремии и бруцеллеза (для противочумных учреждений, отделов особо опасных инфекций санитарно-эпидемиологических станций и институтов и других противоэпидемических и лечебно-профилактических учреждений). М., 1967.

10. Кокушкин А.М., Касьян А.Ф. Проблемы ликвидации чрезвычайных эпидемических ситуаций: В кн. Матер. науч.-практ. конф., посв. 100-летию образования противочумной службы России. Саратов; 1997. Т. 1. С. 71-2.

11. Кокушкин А.М., Кологоров А.И., Бережнов А.З. и др. Профилактика инфекционных заболеваний в зоне стихийного бедствия. В кн.: Природно-очаговые инфекции и их профилактика. Саратов; 1991. С. 148-55.

12. Кутырев В.В., Федоров Ю.М., Топорков А.В. и др. Укрепление глобальной сети по предупреждению и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций: модернизация специализированных противоэпидемических бригад (СПЭБ) противочумных учреждений. Пробл. особо опасных инф. 2006; 2(92):10-4.

13. Ляпин М. Н., Ежов И. Н., Дроздов И. Г., Кутырев В. В. Эволюция взглядов на проблему биобезопасности и формирование области специальных знаний. Мол. медицина 2006; 3:14-9.

14. Ляпин М.Н., Ежов И.Н., Пчелинцева М.В., Костиокова Т.А. Биологическая безопасность: к вопросу оценки риска: В кн. Матер. VIII Межгос. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ. Саратов; 2007. С. 247-8.

15. Ляпин М.Н., Ежов И.Н., Топорков А.В. Требования к обеспечению биобезопасности в мобильных микробиологических лабораториях: В кн. Матер. IX съезда Всерос. науч.-практ. об-ва эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. М.; 2007. Т. 3. С. 124.

16. Ляпин М.Н., Пчелинцева М.В., Ежов И.Н. Теоретические и практические аспекты нормирования обеспечения биобезопасности работ мобильных модульных лабораторий специализированных противоэпидемических бригад: В кн. Матер. VIII Межгос. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ. Саратов; 2007. С. 249-50.

17. Методическое руководство по специальной подготовке специализированных противоэпидемических бригад для работы в чрезвычайных ситуациях. М.; 1999.

18. Международные медико-санитарные правила. Женева: ВОЗ; 2005. 73 с.

19. Нетесов С.В., Дроздов И.Г. Новые международные инициативы в области усиления правил биобезопасности и физической защиты лабораторий, работающих с инфекционными агентами. Мол. медицина 2006; 3:9-14.

20. О лицензировании отдельных видов деятельности. Федеральный закон от 8 августа 2001 г. N 128-ФЗ.

21. О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения. Федеральный закон от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ.

22. Онищенко Г.Г., Дроздов И.Г., Малоюкова Т.А., М.Н. Ляпин и др. Нормирование как элемент системы обеспечения безопасности работ с биологическими агентами I-II групп патогенности. Пробл. особо опасных инф. 2005; 2(9):5-11.

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

24. Онищенко Г.Г., Пальцев М.А., Зверев В.В., Иванов А.А., Киселев В.И. и др. Биологическая безопасность. М.: ОАО «Издательство «Медицина»; 2006. 304 с.

25. Опасные и вредные производственные факторы. Классификация. ГОСТ 12.0.003-78.

26. Организация и проведение работы специализированными противоэпидемическими бригадами в чрезвычайных ситуациях. МУ 3.1.957-00. М.: Минздрав России; 2000. 53 с.

27. Основы биологической безопасности в лабораториях. Руководство. Третье изд. Министерство здравоохранения. Департамент народонаселения и здравоохранения. Центр готовности и реагирования на чрезвычайные ситуации. Канада; 2004. 180 с.

28. Основы государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2010 г. и дальнейшую перспективу. Пр-2194 от 04.12.03.

29. Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях. М.: Медицина; 1987. 256 с.

30. Порядок выдачи санитарно-эпидемиологического заключения о возможности проведения работ с возбудителями инфекционных заболеваний человека I-IV групп патогенности (опасности), генно-инженерно-модифицированными микроорганизмами, ядами биологического происхождения и гельминтами. Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.2.1318-03. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России; 2003. 39 с.

31. Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности. Санитарные правила СП 1.2.036-95. М.: Информационно-издательский центр Госкомсанэпиднадзора России; 1996. 80 с.

32. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях. Второе изд. Женева: ВОЗ; 1994. 146 с.

33. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях. Третье изд. Женева: ВОЗ; 2004. 190 с.

34. Приказ Госкомэпиднадзора России от 29.03.1996 г. № 44 «Об организации специализированных противоэпидемических бригад».

35. Приказ МЗ России от 12.08.2003 № 400 «О совершенствовании организации работы СПЭБ противочумных учреждений».

36. Приказ МЗ СССР от 31.01.1991 г. № 35 «О совершенствовании работы специализированных противоэпидемических бригад (СПЭБ) противочумных учреждений Минздрава СССР».

37. Приказ Роспотребнадзора от 20.07.07 г. № 225 «О совершенствовании организации работы специализированных противоэпидемических бригад, сформированных на базе ФГУЗ «Научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора».

38. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 21.05.2007 № 642-р.

39. Пухов Ю.М., Москвитина Э.А., Прометной В.И. Организация работы специализированной противоэпидемической бригады в различных режимах функционирования: В кн. Мат. VIII Межгос. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ. Саратов; 2007. С. 97-9.

40. Регламент (стандарт) функционирования специализированных противоэпидемических бригад (СПЭБ) при ликвидации медико-санитарных последствий чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера. Утв. приказом Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 22.11.2007 г. № 330.

41. Старшинов В.А., Карнаухов И.Г. Оптимизация работы специализированных противоэпидемических формирований в чрезвычайных ситуациях. Пробл. особо опасных инф. 2003; 86:42-8.

42. Хохлов Н.В. Управление риском: Уч. пособие для вузов. М.: ЮНИТИ-ДАНА; 2001. 239 с.

43. Черкасский Б.Л. Риск в эпидемиологии. М.: Практическая медицина; 2007. 480 с.

44. Чернова Г.В., Кудрявцев А.А. Управление рисками. М.: ТК Велби, Изд-во Проспект; 2003. 160 с.

45. Шарова И.Н., Красовская Т.Ю., Кутырев И.В., Чекашов В.Н., Шилов М.М., Матросов А.Н. и др. Опыт использования мобильной лаборатории при проведении эпизоотологического обследования территории Саратовской области: В кн.: Матер. VIII Межгос. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ. Саратов; 2007. С. 141-3.

46. Biological agents: Managing the risks in laboratories and healthcare premises. Advisory Committee on Dangerous Pathogens. Department of health. <http://www.hse.gov.uk/biosafety/biological-agents.pdf>.

47. Biorisk management. Laboratory biosecurity guidance. WHO; September 2006. 41 p.

48. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. www.cdc.gov/od/ohs/biosfty/bmbf5/BMBL_5th_Edition.pdf.

49. Laboratory biorisk management standard CWA 15793:2008. www.biorisk.eu.

Об авторах:

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

M.V.Pchelintseva, M.N.Lyapin

**Normative Provision of Biosafety
of the Specialized Anti-Epidemic Teams Functioning**

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Analyzed were normative and methodical documents which were in force at different stages determined as regards current tasks, staff schedule and the equipment table of the specialized anti-epidemic teams (SAET).

Substantiated was the necessity to develop the new regulatory document, comprising requirements of biosafety provision of the specialized anti-epidemic teams functioning. Determined was the way of further improvement of normative and methodical provision of biosafety under conditions of practical realization of the conception of SAET modernization. It included the development of the set of regulatory documents specifying the fulfillment of the main provisions of the Standing Order and elaboration of management system based on risk analysis.

Key words: biosafety provision, SAET, normative documentation.

Authors:

Pchelintseva M.V., Lyapin M.N. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 22.06.09.

М.Г.Ростовцев¹, Н.А.Кол², А.Ф.Чульдун², Ю.А.Калуш²

РЕЗУЛЬТАТИВНОСТЬ ВЫЯВЛЕНИЯ ЭПИЗООТИЙ ЧУМЫ ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ РАЗЛИЧНОГО ПОЛЕВОГО МАТЕРИАЛА В ТУВИНСКОМ ПРИРОДНОМ ОЧАГЕ (КАРГИНСКИЙ МЕЗООЧАГ)

¹ФГУЗ «Тувинская противочумная станция»,

²Тувинский институт комплексного освоения природных ресурсов СО РАН, Кызыл

На основе анализа многолетних данных, полученных в Каргинском мезоочаге Тувинского природного очага чумы, определена информативность различных биологических объектов для выявления культур чумы. Подробно изучена динамика эпизоотического процесса по данным исследования массового материала трех основных типов. Полученные результаты дали возможность определить и уточнить оптимальные сроки сбора того или иного полевого материала для лабораторного исследования.

Ключевые слова: Тувинский природный очаг чумы, эпизоотологический мониторинг, сроки сбора полевого материала.

В 1964 г. в Туве был открыт природный очаг чумы [8]. С тех пор в республике практически ежегодно регистрируются эпизоотии чумы в Монгун-Тайгинском и Овюрском районах (юго-западная Тува). За 42 года мониторинга (с 1965 по 2006) сотрудниками Тувинской противочумной станции зарегистрировано около 1,5 тыс. культур этой инфекции. Тувинский природный очаг чумы, вероятно, является северной частью единого очага, расположенного на территории Монголии [8, 11], и представляет непосредственную угрозу населению, проживающему на его территории [10].

При поиске эпизоотий лабораторному исследованию подвергались органы теплокровных носителей возбудителя чумы; эктопаразиты, обнаруженные в шерстном покрове зверьков; блохи, собранные в природе из входов нор и при разборе гнезд грызунов и зайцеобразных; а также трупы мелких млекопитающих, найденные на территории очага. В целях оптимизации эпизоотологического мониторинга природного очага чумы нами предпринята попытка оценить результативность исследования массового полевого материала в различные периоды (по датам сбора) среднестатистического эпизоотического сезона.

Общие сроки активизации эпизоотического процесса в Каргинском мезоочаге чумы в настоящее время достаточно хорошо известны [3, 5, 6, 7, 12, 13, 14]. Однако отсутствует статистическая оценка информативности исследования разных животных, участвующих в процессе, и характера изменения этой информативности. В связи с этим целью нашей работы было детальное определение оптимальных сроков исследования различного полевого материала.

Материалы и методы

Территория Тувинского природного очага чумы разделяется на шесть относительно самостоятельных мезоочагов [3]. Для анализа нами выбран Каргинский мезоочаг, где получен наиболее репрезентативный

материал. На его территории с 1964 по 2006 год выделено наибольшее количество культур чумы (982), а эпизоотии регистрируются почти ежегодно.

Первичные данные обо всех культурах чумы, выделенных с 1965 по 2006 год на территории этого мезоочага, были внесены в таблицу Excel. Информация в табл. 1 представляет собой вид материала, из которого выделен возбудитель, дату и подробный адрес его сбора. Из табл. 1 с помощью программной выборки были выделены записи, относящиеся к различным объектам лабораторного исследования.

В качестве единицы измерения частоты активизации эпизоотического процесса выбрано количество результативных дней, приходящихся на каждую календарную дату за период работы с 1965 по 2006 год. Под результативным днем подразумевается календарный день работы зоологической группы, в течение которого была выделена одна или более культур чумы. Эта единица измерения уже успешно апробирована для анализа временной изменчивости структуры Каргинского мезоочага чумы [5, 13].

Результаты и их обсуждение

1. Неравноценность полевого материала для обнаружения возбудителя чумы

Общее количество результативных дней в Каргинском мезоочаге за 42 года наблюдений (1965–2006) составляет 376. В эти дни в Каргинском мезоочаге были выделены 895 культур чумы. Вычленение и суммирование результативных дней, полученных при исследовании различного материала, показало его неравноценность при эпизоотологическом обследовании этого мезоочага.

Как и предполагалось, наибольшее количество результативных дней дало исследование на чуму эктопаразитов, собранных с основного носителя возбудителя – длиннохвостого суслика (*Spermophilus undulatus* Pallas, 1778). Вторым по эффективности было исследование органов длиннохвостого суслика,

третьим – эктопаразитов из входов его нор.

Так как исследование второстепенных носителей [монгольская (*Ochotona pricei* Thomas, 1911) и даурская (*Ochotona daurica* Pallas, 1776) пищухи, тушканчик прыгун (*Allactaga sibirica* Forster, 1778), плоскочерепная полевка (*Alticola strelzowi* Kastschenko, 1899)], трупов мелких млекопитающих и блох из гнезд оказалось гораздо менее результативным при поиске эпизоотий, то в нашей работе основное внимание уделено трем наиболее результативным способам поиска возбудителя чумы.

2. Предварительное сглаживание временных рядов для различных видов полевого материала

Для получения трендов использовали данные о количестве результативных дней по каждому из объектов поиска возбудителя чумы. Исходные данные предварительно обрабатывали, используя метод сглаживания динамического ряда по 3 точкам [1]. Предварительная обработка исходного числового ряда была направлена на решение следующих задач (всех или части из них): снизить влияние случайной составляющей в исходном числовом ряду, т. е. приблизить его к тренду; представить информацию, содержащуюся в числовом ряду, в таком виде, чтобы существенно снизить трудность математического описания тренда. Основным методом решения этих задач является процедура сглаживания статистического ряда.

Процедура сглаживания направлена на минимизацию случайных отклонений точек ряда от некоторой гладкой кривой предполагаемого тренда процесса [2, 4]. Наиболее распространен способ осреднения уровня по некоторой совокупности окружающих точек, причем эта операция перемещается вдоль ряда точек, в связи с чем обычно называется скользящая средняя. В самом простом варианте сглаживающая функция линейна, и сглаживающая группа состоит из предыдущей и последующей точек. В нашем случае к первому значению последовательности чисел применили формулу:

$$S_1 = \frac{(5 * X_1 + 2 * X_2 - X_3)}{6}, \tag{1}$$

Конечное значение последовательности чисел рассчитывалось по формуле

$$S_k = \frac{(-X_{k-2} + 2 * X_{k-1} + 5 * X_k)}{6}, \tag{2}$$

К остальным значениям последовательности чисел применили формулу

$$S_{n+1} = \frac{(X_n + X_{n+1} + X_{n+2})}{3}, \tag{3}$$

где S_i – сглаженные значения ряда, X_i – значения исходного ряда.

Сглаживание даже в простом линейном варианте является во многих случаях весьма эффективным средством выявления тренда при наложении на эмпирический числовой ряд случайных помех и ошибок измерения. Для рядов со значительной амплитудой помехи имеется возможность проводить многократное сглаживание исходного числового ряда. Число последовательных циклов сглаживания было выбрано в зависимости от вида исходного ряда, от степени предполагаемой его зашумленности помехой и цели, которую преследует сглаживание. В данном случае было применено 26-кратное сглаживание (рис. 1).

Для максимальных значений трендов хода эпизоотий по результатам исследования различного полевого материала определены даты их наибольшей значимости для поиска эпизоотий чумы в мезоочаге (табл. 1).

Незначительное количество культур чумы получено от второстепенных носителей, в основном от монгольской пищухи. Эпизоотии чумы в популяциях этого зайцеобразного регистрировались в период с 1965 по 1969 год. После 70-го года случаи выделения чумы от особей монгольской пищухи единичные.

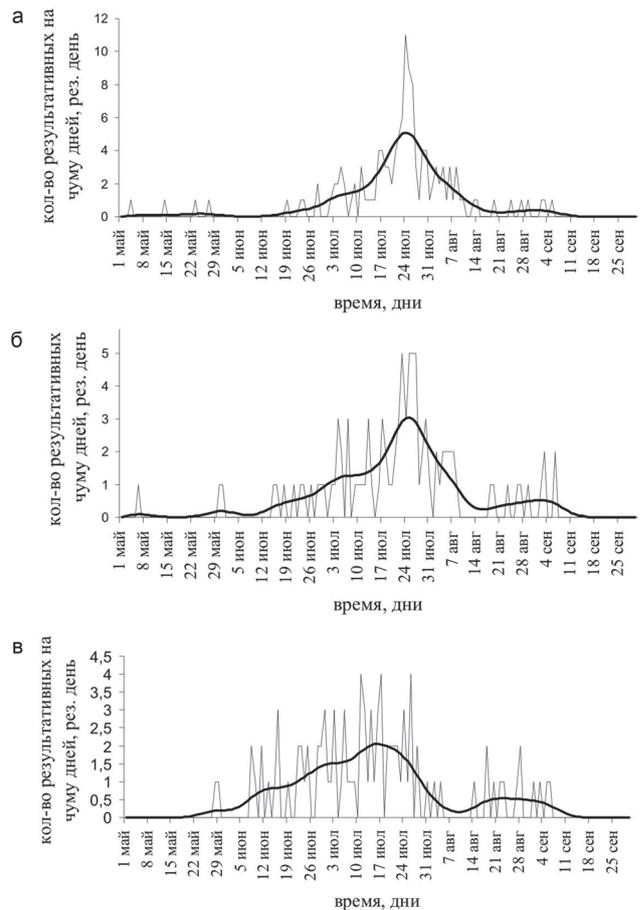


Рис. 1. Среднемноголетний ход эпизоотического процесса в Каргинском мезоочаге чумы (1965–2006 гг.) по результатам исследования различного полевого материала:

- исходный ряд, — после процедуры сглаживания;
- а – эктопаразиты, собранные с длиннохвостого суслика;
- б – органы длиннохвостого суслика;
- в – блохи из входов нор (исходные и сглаженные ряды)

Таблица 1

Даты максимальных значений сглаженных трендов среднемноголетнего хода эпизоотий чумы в Каргинском мезоочаге и суммы результативных дней при исследовании различного полевого материала

Объекты поиска возбудителя чумы	Дата максимального значения тренда	Сумма результативных дней
Эктопаразиты, собранные с длиннохвостого суслика	24 июля	130
Органы длиннохвостого суслика	25 июля	97
Блохи из входов нор длиннохвостого суслика	16 июля	93
Трупы и собранные с них эктопаразиты	25 июля	26
Блохи из гнезд грызунов и зайцеобразных	27 июля	10
Эктопаразиты, собранные с второстепенных носителей	26 июня	9
Органы второстепенных носителей	3 июля	11

Даты максимумов трендов хода сезонного эпизоотического процесса, когда культуры чумы выделялись от второстепенных носителей и их эктопаразитов, приходится на начало лета: от блох – 26 июня; от органов теплокровных – 3 июля.

3. Математические модели хода сезонного эпизоотического процесса для трех основных объектов поиска возбудителя чумы

Для трех основных видов полевого материала, используемого для поиска возбудителя чумы (эктопаразиты, собранные с длиннохвостого суслика; органы длиннохвостого суслика; блохи из входов нор), сглаженные ряды аппроксимировали суммой трех гауссовских распределений (4).

$$Y = a_1 * \exp(-(\frac{X - b_1}{c_1})^2) + a_2 * \exp(-(\frac{X - b_2}{c_2})^2) + a_3 * \exp(-(\frac{X - b_3}{c_3})^2), \tag{4}$$

где Y – значения количества результативных дней с чумой, X – номер дня обследовательского сезона с

Таблица 2

Параметры модели суммы трех гауссиан для трех основных объектов поиска чумы

Коэффициент модели	Эктопаразиты, собранные с длиннохвостого суслика	Органы длиннохвостого суслика	Блохи из входов нор
a ₁	1,3	1,2	1,25
a ₂	4,4	2,2	1,36
a ₃	0,35	0,49	0,55
b ₁	72	72,5	62
b ₂	86	87	80,5
b ₃	123	123,8	118
c ₁	17	24	23
c ₂	9,5	9,05	10,2
c ₃	9,34	11,05	13

1 мая по 30 сентября (1–153-й день). Параметры модели a₁, a₂, a₃, b₁, b₂, b₃, c₁, c₂, c₃ суммы гауссовских распределений для основных объектов поиска чумы представлены в табл. 2. Коэффициент детерминации R² этого уравнения и исходного не сглаженного ряда составляет: для эктопаразитов, собранных с длиннохвостого суслика, – 0,7; для органов длиннохвостого суслика – 0,6; для блох из входов нор – 0,5.

Полученные тренды (рис. 2) хорошо выявляют сезонные особенности течения эпизоотического процесса. При этом заметно, что тренды трех основных объектов исследования сдвинуты во времени. Даты максимума для эктопаразитов, собранных с длиннохвостого суслика, – 24 июля, для органов длиннохвостого суслика – 25 июля, для блох из входов нор – 16 июля. Начало активизации эпизоотического процесса в июле совпадает по времени с моментом среднемноголетнего начала расселения молодняка длиннохвостого суслика и предположительно описывает влияние расселения на ход эпизоотий. По наблюдениям зоологов [15], именно в этот промежуток времени увеличивается активность молодых зверьков по поиску свободных нор, которые зачастую населены инфицированными чумой эктопаразитами. С этим природным явлением непосредственным образом и связано резкое возрастание интенсивности эпизоотий в Каргинском мезоочаге Тувинского природного очага чумы.

Также заметно, что осенний пик имеет невысокую сглаженную форму и приходится на конец августа. Детальный анализ записей, отражающих количество рабочих дней, проведенных зоо группами в мезоочаге с 10 августа по 30 сентября, показал, что это явление вполне объективно и не зависит от действий руководителя зоо группы, то есть от субъективного фактора. Если основной пик достаточно хорошо объясняется жизнедеятельностью основного носителя, в частности, сезонным ходом его миграционной активности, то причина второго осеннего пика в настоящее время не ясна.

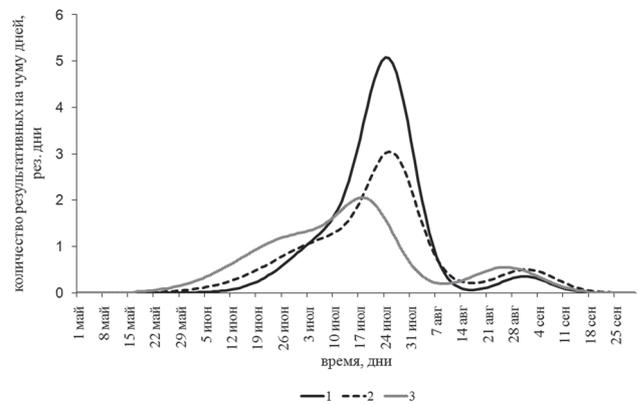


Рис. 2. Графики математической модели хода эпизоотического процесса, выявляемого по результатам исследования различного полевого материала:

1 – эктопаразиты, собранные с длиннохвостого суслика; 2 – органы длиннохвостого суслика; 3 – блохи из входов нор

Выяснилось, что кривые, характеризующие частоту регистрации возбудителя чумы (рис. 2), отличаются между собой не только абсолютными значениями максимумов и временем их проявления, но и величиной коэффициента эксцесса. Эксцесс характеризует относительную остроконечность или сглаженность распределения по сравнению с нормальным распределением. Высокий коэффициент эксцесса для кривых, относящихся к лабораторному исследованию органов длиннохвостого суслика (1,44) и эктопаразитов его шерсти (1,39), еще раз косвенно подтверждает положительное влияние июльского расселения этого грызуна на частоту регистрации чумы. Коэффициент эксцесса кривой для блох, собранных из входов нор, напротив, меньше и равен 1,01, что говорит о сглаженности хода эпизоотического процесса, выявленного по этому материалу.

4. Значение полученных результатов

Полученные результаты имеют не только теоретическое, но и практическое значение. Еще в 1972 г. Г.С.Летов в своей работе [9] показал, что наиболее продуктивным способом поиска микроочагов чумы в начале лета является сбор блох из входов нор длиннохвостого суслика. Наша работа подтверждает его предположение и дает более детальную картину эпизоотического процесса при использовании различной тактики поиска возбудителя чумы. Нами конкретизированы границы отрезков времени, в течение которых необходимо существенно увеличивать сбор того или иного полевого материала при поиске микроочагов чумы в Каргинском мезоочаге.

Сбор блох из входов нор длиннохвостого суслика предпочтителен с 4 июня по 13 июля, с 14 июля по 17 августа основную роль должен играть отлов и очес особей основного носителя. В то же время зоогруппам, осуществляющим эпизоотологическое обследование, вплоть до 29 июля не следует полностью отказываться от сбора блох из входов нор, так как материал, полученный этим способом до указанной даты, все еще дает неплохие результаты по поиску чумы в данном мезоочаге.

В целом полученная картина отражает ход переноса чумного микроба в цепи его передачи от переносчика к основному носителю: от блох из входов нор (максимум 16 июля) к эктопаразитам шерсти длиннохвостого суслика (максимум 24 июля) и от них к длиннохвостому суслику (максимум 25 июля). В конце августа – начале сентября этот процесс повторяется со значительно меньшей интенсивностью.

Таким образом, в результате статистического анализа многолетних данных, собранных в Каргинском мезоочаге Тувинского природного очага чумы, было установлено, что наибольшее количество результативных дней дало исследование эктопаразитов, собранных с длиннохвостого суслика, органов зверька и блох из входов его нор; первым выявляет активизацию Каргинского мезоочага исследование блох из входов нор (максимум 16 июля); вторым – эктопара-

зитов, собранных с суслика (максимум 24 июля); третьим – органов длиннохвостого суслика (максимум 25 июля); математическая модель трех основных тактических приемов выявления эпизоотического процесса может быть представлена в виде суммы трех гауссовских распределений и описывает три различных биологических процесса. Один – с плавным длительным течением, второй – кратковременный и интенсивный и третий (осенняя активизация) – наименьший.

Начиная с 2006 г. результаты анализа были непосредственно внедрены в практику работы Тувинской противочумной станции. На основании полученных данных изменена тактика обследования Каргинского мезоочага, в том числе изменены показатели территориально-календарного плана полевых работ. До 2006 г. зоогруппы на протяжении всего сезона одновременно проводили как отлов суслика, так и сбор блох из входов его нор. Этот процесс был трудоемок и, как выяснилось, не всегда оправдан. С 2006 г. эпизоотологическое обследование стали проводить в два тура. Во время первого тура для быстреего выявления эпизоотии делают упор на сбор блох из входов нор основного носителя. Во втором туре преимущественно проводят отлов и исследование длиннохвостого суслика и собранных с него эктопаразитов. Использование такой тактики позволило улучшить качество эпизоотологического обследования, а также снизило антропогенный пресс на популяцию длиннохвостого суслика.

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований проект № 07-05-96812 р_енисей_a.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Андерсон Т.*, перевод Журбенко И.Г., Носко В.П., редактор Беляев Ю.К. Статистический анализ временных рядов. М.: Мир; 1976. 744 с.
2. *Баранов В.А.* Общие вопросы методологии и научного прогнозирования. Харьков; 1992. 230 с.
3. *Вержущий Д.Б., Окунев Л.П., Попков А.Ф., Иннокентьева Т.И., Косилко С.А., Базанова Л.П.* и др. Методические рекомендации по эпизоотологическому обследованию Тувинского природного очага чумы. Иркутск; 2004. 19 с.
4. *Зенкин А.И.* О математических методах прогнозирования. М.; 1987. 90 с.
5. *Кол Н.А., Ростовцев М.Г., Чульдун А.Ф.* Оптимизация сроков эпизоотологического обследования Каргинского мезоочага Тувинского природного очага чумы. Бюл. Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. Иркутск; 2008. 6(64): 25–9.
6. *Крюков И.Л.* Взаимосвязь сезонной жизнедеятельности длиннохвостого суслика и блохи *Ceratophyllus tesquorum* в Тувинском природном очаге чумы. В кн.: Совр. асп. профилактик. зоонозных инф.: Тез. докл. к Всесоюз. науч. конф. специалистов противочумн. учрежд. Иркутск; 1984. Ч. 1. С. 85–7.
7. *Кузнецов В.И., Крюков И.Л., Саржинский В.А.* Материалы к эпизоотологической характеристике Монгун-Тайги. Докл. Иркут. противочумн. ин-та Сибири и Дальн. Вост. Кызыл, 1969; 8:25–8.
8. *Летов Г.С.* Хархира-Монгунтайгинский участок Алтайского очага чумы. Пробл. особо опасных инф. 1969; 2(6):37–45.
9. *Летов Г.С., Летова Г.И., Мамонтова Э.В.* К вопросу о методике эпизоотологической разведки в Туве. Пробл. особо опасных инф. 1972; 2(24):132–6.
10. *Онищенко Г.Г., Кутырев В.В.*, редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.; 2004. 192 с.
11. *Равдоникас И.О.* К истории становления очага чумы

Каргинской котловины. Докл. Иркут. противочумн. ин-та Сибири и Дальн. Вост. Чита, 1974; 10:54–6.

12. Родионов А.А., Феоктистов А.З. Современное состояние Тувинского природного очага чумы. Докл. Иркут. противочум. ин-та Сибири и Дальнего Востока. Чита, 1974; 10:51–4.

13. Ростовцев М.Г., Хомушку Е.Ч., Калуш Ю.А., Чульдун А.Ф. Новый подход к оценке сезонной активности Каргинского участка очаговости Тувинского очага чумы. Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН. Иркутск, 2004; 1(2): 157–60.

14. Устюжина И.М., Равдоникас И.О., Устюжин Ю.А. и др. Некоторые итоги изучения Тувинского природного очага чумы (1964–1974 гг.). Сообщение 2. Биоценотическая структура очага: Тез. докл. науч. конф. Междунар. и нац. аспекты эпиднадзора при чуме. Иркутск; 1975. Вып. 1. С 52–7.

15. Шилова С.А., Шилов И.А., Левина Л.Е., Родионова Е.И. Некоторые черты пространственно-экологической структуры популяции длиннохвостого суслика (*Citellus undulatus* Pall.) и попытки ее направленного изменения. Зоол. журн. 1979; 58(7):1042–6.

Об авторах:

Ростовцев М.Г. Тувинская противочумная станция. 667000, Республика Тыва, г. Кызыл, ул. Калинина, 5а.

Кол Н.А., Чульдун А.Ф., Калуш Ю.А. Тувинский институт комплексного освоения природных ресурсов СО РАН. 667007, Республика Тыва, г. Кызыл, ул. Интернациональная, 117-а. E-mail: Natachakol@yandex.ru

M.G.Rostovtsev, N.A.Kol, A.F.Chouldum, Ju.A.Kalush

Effectiveness of Plague Epizootics Detection upon Investigation of Different Field Material in Tuvinian Natural Focus (Karginsk Mesofocus)

Tuvinian Plague Control Station; Tuvinian Institute for Complex Exploration of Natural Resources, SB of the RAS, Kyzyl

Informational value of different biological objects in view of plague agent detection was determined on the basis of analysis of long-term data received in Karginsk' mesofocus of Tuvinian natural plague focus. The dynamics of epizootic process was studied in detail based on the investigation of mass material of three basic types. The results received enabled to determine and clarify the optimal terms of gathering of various field material for laboratory investigations.

Key words: Tuvinian plague natural focus, epizootiologic monitoring, terms of gathering of field material.

Authors:

Rostovtsev M.G. Tuvinian Plague Control Station. 667000, Tuva Republic, Kyzyl, Kalinina St., 5a.

Kol N.A., Chouldum A.F., Kalush Ju.A. Tuvinian Institute for Complex Exploration of Natural Resources, SB of the RAS. 667000, Tuva Republic, Kyzyl, Internationalnaya St., 117-a. E-mail: Natachakol@yandex.ru

Поступила 01.06.09.

В.А.Спиридонов, В.Н.Андрус, В.В.Елизаров

ЭФФЕКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ СРЕДСТВ ПРИ ОБЕЗЗАРАЖИВАНИИ ПОВЕРХНОСТЕЙ И ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ, КОНТАМИНИРОВАННЫХ ПОТЕНЦИАЛЬНО ОПАСНЫМИ БИОЛОГИЧЕСКИМИ АГЕНТАМИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПРИРОДЫ КАТЕГОРИИ А

ФГУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт»

Изучалась эффективность использования кислород- и хлорсодержащих средств, а также композиций на основе ЧАС при обеззараживании поверхностей и изделий медицинского назначения, контаминированных возбудителями чумы, туляремии и сибирской язвы. Предлагается расширить перечень средств, предназначенных для обеззараживания объектов, контаминированных биологическими агентами бактериальной природы категории А изученными препаратами.

Ключевые слова: потенциально опасные биологические агенты бактериальной природы категории А, дезинфицирующие средства.

В целях реализации мероприятий по комплексному направлению обеспечения биологической безопасности федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)», утвержденной постановлением Правительства Российской Федерации от 27 октября 2008 г. № 791 предусмотрено создание оперативного резерва препаратов и средств для ликвидаций последствий биотерроризма. Важная роль в нем отводится современным дезинфицирующим средствам, относящимся к кислород- и хлорсодержащим препаратам, а также композициям на основе четвертично-аммонийных соединений (ЧАС).

Материалы и методы

В работе использовали следующие тест-штаммы потенциально опасных биологических агентов бактериальной природы категории А, обладающие типичными культурально-морфологическими и биохимическими свойствами: *Y. pestis* (штаммы EV, 231A), *Francisella tularensis* (штаммы 15, O-402), *Bacillus anthracis* (штаммы СТИ-1, 81/1), полученные в коллекционном центре ФГУЗ ВолгоградНИПЧИ Роспотребнадзора. Предварительные исследования проводили на вакцинных, а окончательные – на вирулентных штаммах исследованных микроорганизмов.

При подготовке к опытам суспензии лиофилизированных культур возбудителей чумы и туляремии высевали на пробирки со скошенным селективным агаром (агар Хоттингера, pH 6,8, и туляреминый агар), инкубировали 24 и 48 ч при $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ и $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$, соответственно, готовили маточную суспензию, содержащую $2 \cdot 10^9$ КОЕ/мл данного микроорганизма и использовали в последующих опытах.

Суспензию из лиофилизированных культур возбудителя сибирской язвы инкубировали при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ от 5 до 7 сут на агаре Хоттингера (pH 7,2), затем выдерживали 7–12 сут при темпера-

туре $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$ для максимального накопления спор. Процесс спорообразования контролировали микроскопией мазков на 7, 10, 12-е сутки. При наличии в мазках $(90 \pm 5)\%$ спор культуру считали пригодной для проведения последующих исследований.

Использованные штаммы возбудителей чумы и туляремии по устойчивости к табельным дезинфицирующим средствам (фенол 1:70 и 0,1 % хлорамин), а споры возбудителя сибирской язвы – к текучему пару и 10 % растворам фенола и хлорамина соответствовали требованиям инструкции [2]. Эффективность обеззараживания различных объектов оценивали в соответствии с официальными методами испытания дезинфекционных средств [2].

При проведении испытаний использовали *хлорсодержащие препараты*:

Хлорапин – действующее вещество натриевая соль дихлоризоциануровой кислоты (Na-соль ДХИЦК) в количестве 87 %, выпускается в виде гранул и таблеток. Содержание активного хлора (АХ) – 56,0 % [1];

Ди-хлор – таблетки содержат Na-соль ДХИЦК (84,0 %), а так же адипиновую кислоту (8,0 %), углекислый натрий (8,0 %). Средство хорошо растворимо в воде. При растворении 1 таблетки выделяется $(1,52 \pm 0,12)$ г АХ [1];

Пресефт – выпускается в таблетках и гранулах, содержит Na-соль ДХИЦК в количестве 50 %. Содержание АХ в таблетках – 28,8–35,5 %, в гранулах – 27,9–34,1 % [1].

Кислородсодержащие препараты:

ПФК-М – средство (композиция на основе пероксосолявата фторида калия) представляет собой белый кристаллический порошок (возможен желтоватый или сероватый оттенок) со слабым специфическим запахом, хорошо растворимый в воде. В своем составе содержит ПФК-1 – 48,0 %, фторид аммония – 23,5 %, янтарную кислоту – 23,5 %, анионный ПАВ – 5,0 %. Содержание пероксида водорода – 15,5 % в качестве ДВ [1];

Дезинбак супер – порошок или таблетки белого цвета массой 1,0 г и 3,5 г ($\pm 5\%$), растворимые в воде. Средство содержит стабилизированную смесь пероксидного соединения и катамина АБ, а также другие функциональные добавки. ДВ – пероксидное соединение [1].

Композиции на основе четвертично-аммониевых соединений:

НИКА-НЕОДЕЗ – прозрачная жидкость от бесцветного до желтого цвета. Содержит в своем составе в качестве действующих веществ комплекс двух ЧАС алкилдиметилбензиламмония хлорид и п-алкилэтилбензиламмония хлорид 9,5 % и полигексаметиленгуанидина гидрохлорид 6 %, а также поверхностно-активные вещества, кондиционирующие добавки, воду, рН 1 % водного раствора средства – $3,0 \pm 0,5$ [1];

ДИАБАК – прозрачная жидкость от голубого до фиолетового цвета с запахом отдушки, содержит алкилдиметилбензиламмоний хлорид (11,0 %) в качестве действующего вещества, функциональные добавки, активаторы формулы, ингибитор коррозии, а также другие компоненты [1];

МИСТРАЛЬ – прозрачная жидкость от светло-голубого до синего цвета со слабым цитрусовым запахом, хорошо смешивается с водой. В качестве ДВ – N,N-бис-(3-аминопропил) додециламин (амин) – 7,5 %, а также вспомогательные компоненты, отдушка, краситель и вода до 100 %. Показатель активности водородных ионов (рН) 1 % раствора – $10,6 \pm 0,6$ [1];

БРИЛЛИАНТ – прозрачная бесцветная жидкость, вспенивается при взбалтывании. Содержит в своем составе в качестве ДВ – 0,9 % алкилдиметилбензиламмоний хлорида, 0,8 % глутарового альдегида и функциональные компоненты, рН средства – 3,5–4,3 [1].

Срок хранения испытуемых дезсредств 2–5 лет. Срок годности рабочих растворов от 2 до 5 сут.

Все перечисленные средства по степени воздействия на организм в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 относятся к 3-му классу умеренно опасных веществ при введении в желудок и к 4-му классу малоопасных соединений при нанесении на кожу, при ингаляции умеренно опасны (3-й класс по степени летучести). В виде концентрата и в рабочих растворах они оказывают местно-раздражающее действие на кожу и слизистые оболочки [1].

В качестве тест-объектов применяли: кафель, керамику, линолеум, окрашенное дерево и металл, подкладную клеенку; изделия медицинского назначения из пластика, стекла, силикона, резины и металла (ножницы, скальпели, корнцанги, пинцеты, шпатели, экстракционные щипцы). Для органического загрязнения поверхностей, санитарно-технического оборудования и изделий медицинского назначения добавляли 40 % инактивированную лошадиную сыворотку (НЛС).

Эффективность испытанных средств в отношении *B. anthracis* штамма 81/1 оценивали биопробой на белых мышках.

В качестве нейтрализаторов использовали 0,25–1,0 % растворы тиосульфата натрия, а также универсальный нейтрализатор.

Результаты и обсуждение

Данные по эффективности использования изученных кислород- и хлорсодержащих средств, а также композиций на основе ЧАС при обеззараживании поверхностей и изделий медицинского назначения, контаминированных возбудителями чумы, туляремии и сибирской язвы представлены на рис. 1 и 2. Для простоты сравнения полученных результатов

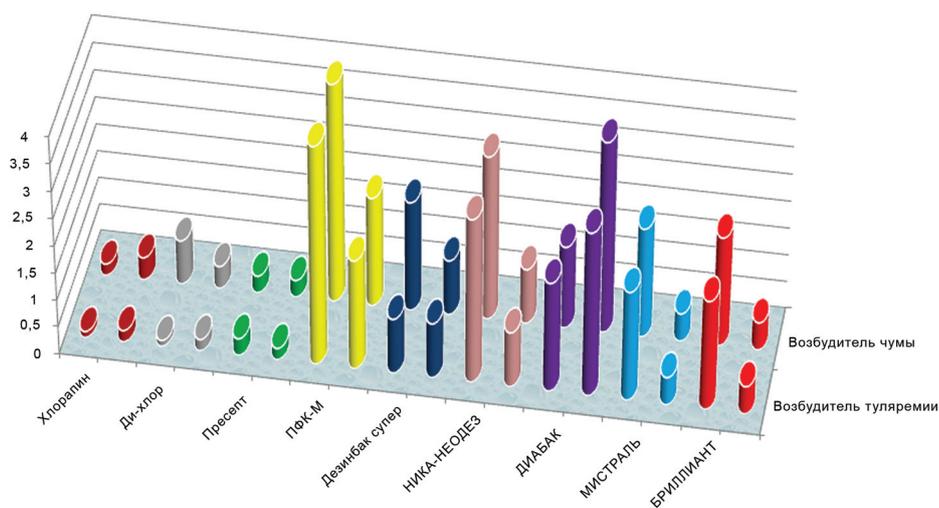


Рис. 1. Эффективность дезинфицирующих средств при обеззараживании поверхностей и изделий медицинского назначения, контаминированных возбудителями туляремии и чумы:

нечетная колонка графика – рабочая концентрация дезсредства для обработки поверхностей и жесткой мебели, четная – для обработки изделий медицинского назначения

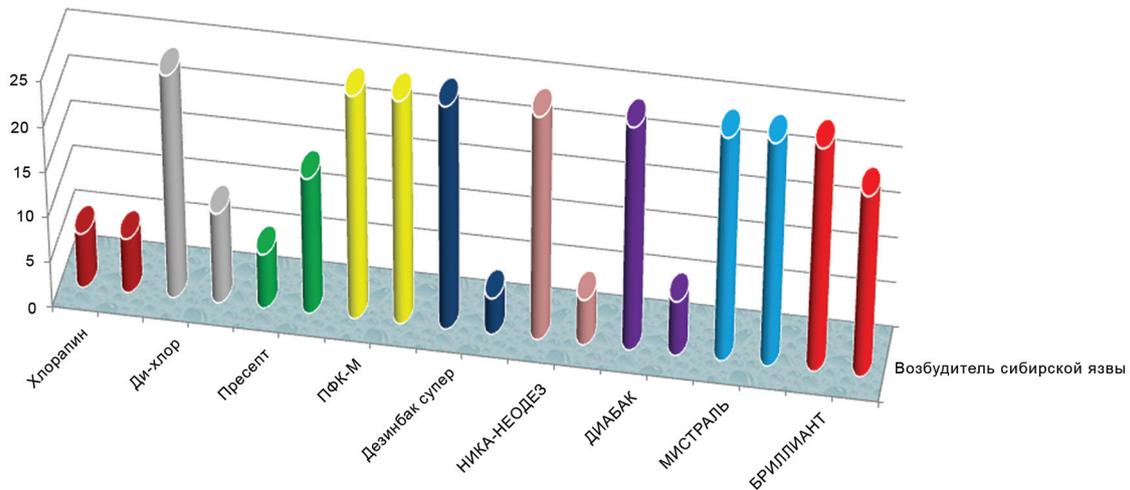


Рис. 2. Эффективность дезинфицирующих средств при обеззараживании поверхностей и изделий медицинского назначения, контаминированных возбудителем сибирской язвы:

нечетная колонка графика – рабочая концентрация дезсредства для обработки поверхностей и жесткой мебели, четная – для обработки изделий медицинского назначения

концентрации дезсредств на графиках представлены в процентном соотношении по препарату.

Показано, что при обеззараживании поверхностей и жесткой мебели возбудители чумы и туляремии погибают при 60-минутной экспозиции при концентрации средств (по препарату) от 0,1 до 0,8 % для хлорсодержащих средств, от 1,0 до 4,0 % для окислителей и 1,5–3,0 % композиций на основе ЧАС. Большинство изученных препаратов не эффективны против возбудителей сибирской язвы, лишь средства Пресепт и Хлорапин вызвали гибель спор при 120-минутной экспозиции в 6,0 % концентрации.

Контаминация загрязненных возбудителями чумы и туляремии изделий медицинского назначения наступала через 60 мин при действии 0,2–0,4 % концентраций хлорсодержащих средств, концентрации кислородсодержащих средств при этом были выше и составляли 1,0–4,0 %.

Обработка изделий медицинского назначения, контаминированных спорами сибирской язвы, проводилась при 18 °С и требовала значительных увеличений концентраций дезинфектантов и времени экспозиции – 90–120 мин (рис. 2). Однако в случае с препаратом МИСТРАЛЬ увеличение концентрации до 20–35 % и экспозиции до 120 мин не давало положительного эффекта. Препарат ПФК-М обладал спороцидным эффектом только при концентрации 31 % (5 % по ДВ) при повышении температуры раствора до 22 °С и времени экспозиции 90 мин.

При обработке поверхностей и жесткой мебели эффективными оказались только хлорсодержащие препараты: Хлорапин и Пресепт, время экспозиции воздействия которых было увеличено до 120 мин, а концентрация до 6,0 % по ДВ. Остальные испытываемые препараты обладали только споростатическим эффектом даже в концентрациях, превышающих

20–35 % при экспозиции 120 мин и увеличении температуры рабочих растворов до 50 °С.

Проведенные исследования позволяют расширить перечень средств, предназначенных для обеззараживания объектов, контаминированных биологическими агентами бактериальной природы категории А изученными препаратами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бинго Гранд [Электронный ресурс]. <http://www.infodez.ru>.
2. Единые инструктивно-методические указания 02.11.85 по изучению и отбору новых средств: Утв. зам. нач. Главного сан.-эпид. управления Министерства здравоохранения СССР. 1968. 14 с.

Об авторах:

Спиридонов В.А., Андрус В.Н., Елизаров В.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

V.A.Spiridonov, V.N.Andrus, V.V.Elizarov

The Efficiency of Some Disinfectants in Decontamination of Surfaces and Items of Medical Purpose Contaminated with Potentially Dangerous Biological Agents of Bacterial Nature of A Category

Volgograd Research Anti-Plague Institute

Studied was the efficiency of oxy- and chloride-containing preparations and QAC based compositions in disinfecting of surfaces and medical purpose items contaminated by the agents of plague, tularemia and anthrax. The investigated preparations were proposed to be included in the list of disinfectants, used for disinfection of objects, contaminated with biological agents of bacterial nature of A category.

Key words: potentially dangerous biological agents of bacterial nature of A category, disinfectants.

Authors:

Spiridonov V.A., Andrus V.N., Elizarov V.V. Volgograd Anti-Plague Research Institute. 400131, Volgograd, Golubinskaya St., 7.

Поступила 29.06.09.

М.А.Турцева¹, У.А.Кресова¹, А.Н.Матросов², В.Н.Чекашов², А.М.Поршаков², С.А.Яковлев²,
И.Н.Шарова², Т.Ю.Красовская², А.А.Кузнецов², Т.В.Князева², Т.В.Мокроусова², С.А.Щербакова²,
В.Г.Котоманова¹, О.А.Сантылова¹

НОВЫЕ ДАННЫЕ О РАСПРОСТРАНЕНИИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ И ПЕРЕНОСИМЫХ ИМИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫХ ИНФЕКЦИЙ В САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

¹ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Саратовской области»,

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

Расширение ареалов и увеличение численности клещей рода *Ixodes* приводит к распространению возбудителя иксодового клещевого боррелиоза на территории Саратовской области. Существует потенциальная опасность активизации природных очагов туляремии, формирования очагов клещевого энцефалита, Крымской геморрагической лихорадки, резервуарами и переносчиками которых являются иксодовые клещи, обитающие на территории области.

Ключевые слова: иксодовые клещи, иксодовый клещевой боррелиоз, туляремия.

Ситуация по природно-очаговым инфекциям, резервуарами и переносчиками возбудителей которых являются кровососущие членистоногие, в Российской Федерации остается сложной. В последние годы отмечается увеличение заболеваемости клещевыми инфекциями: риккетсиозами, Крымской геморрагической лихорадкой, иксодовым клещевым боррелиозом (ИКБ), клещевым энцефалитом (КЭ), а также туляремией и др. [5, 7, 8, 9]. Отчасти это объясняется расширением ареалов и увеличением численности переносчиков. Саратовская область представляет собой территорию, куда происходит расселение иксодовых клещей: с севера – представителей лесной фауны, с юга – полупустынных и пустынных комплексов.

Природные очаги ИКБ и КЭ широко распространены в лесной зоне умеренного климатического пояса России. Их нозоареалы во многих регионах совпадают [2, 3], что связано с распространением общих для них переносчиков – клещей *Ixodes ricinus* и *I. persulcatus*, а также носителей, каковыми в европейской части России являются рыжая полевка *Clethrionomis glareolus* и мыши рода *Apodemus* [15]. Заболевания людей ИКБ и КЭ ранее в основном отмечались на территории Урала, Западной Сибири, Волго-Вятского региона. В настоящее время природные очаги ИКБ зарегистрированы на сопряженных с Саратовской областью территориях Пензенской, Ульяновской, Самарской и Оренбургской, а КЭ – Оренбургской, Ульяновской и Самарской областей [6, 10]. На территории Саратовской области иксодовые клещи участвуют в циркуляции возбудителей туляремии, ИКБ, арбовирусных инфекций [4, 11, 13, 14]. При этом многие вопросы современного состояния популяций иксодовых клещей и их эпидемиологическое значение в регионе остаются недостаточно изученными.

Материалы и методы

В настоящей работе представлены материа-

лы энтомологических наблюдений, полученные в апреле–мае 2009 г. при проведении совместной экспедиции ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Саратовской области» и ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». С целью выявления возбудителей ИКБ, КЭ, туляремии были обследованы в Левобережье Пугачевский, в Правобережье – Хвалынский, Вольский, Балтайский, Базарно-Карабулакский и Новобураский районы Саратовской области, наиболее близко расположенные к неблагополучным по клещевым инфекциям соседним областям. Иксодовых клещей собирали на флаг. Места сборов были приурочены к поймам рек, ручьев, озер, кромкам крупных лесных массивов смешанных и широколиственных лесов. Координаты пунктов обследования фиксировали на местности с помощью портативного навигатора Garmin GPS, обеспечивающего их точную географическую привязку. За период работ было собрано и исследовано 3907 клещей, пройдено 147,5 флаго-километров (фл./км). Определение видовой принадлежности клещей и экспресс-диагностику подготовленных проб методами ПЦР и ИФА на наличие возбудителей ИКБ, КЭ, туляремии проводили в мобильной лаборатории эпидразведки и индикации непосредственно на местах сбора материала. Аликвоты проб помещали в сосуд Дьюара для последующего изучения в условиях стационарной лаборатории РосНИПЧИ «Микроб». Исследовано 209 проб эктопаразитов. Клещей рода *Ixodes* в пробу объединяли от 1 до 11 экз., родов *Dermacentor* и *Rhipicephalus* – от 1 до 50.

Кроме того, для анализа были использованы результаты учетов и исследований клещей ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Саратовской области» за период 2006–2008 гг. Сборы составили 6800 клещей из 27 районов области и зеленой зоны Саратова. При этом ежегодное обследование проводили лишь в 14 районах области и Саратове. В остальных районах, в том числе и обследованных в 2009 г., за исключе-

Таблица 1

Индексы доминирования (в %) различных видов иксодовых клещей на территории Саратовской области в сборах 2006–2009 гг.

Виды	2006*		2007*		2008*		2009**		Всего	
	n	ИД	n	ИД	n	ИД	n	ИД	n	ИД
<i>D. marginatus</i>	849	46,4	1159	56,0	1634	56,3	2103	53,8	5745	53,7
<i>D. reticulatus</i>	833	45,5	560	27,1	1016	35,0	1618	41,4	4027	37,6
<i>D. species</i>	0	0,0	2	0,1	1	0,03	0	0,0	3	0,02
<i>I. ricinus</i>	76	4,2	41	2,0	114	4,0	131	3,4	362	3,4
<i>I. persulcatus</i>	2	0,1	1	0,05	0	0,0	36	0,9	39	0,4
<i>I. species</i>	0	0,0	0	0,0	0	0,0	8	0,2	8	0,07
<i>Rh. rossicus</i>	3	0,2	303	14,6	104	3,6	10	0,3	420	3,9
<i>Rh. species</i>	0	0,0	2	0,1	0	0,0	0	0,0	2	0,01
<i>H. scupense</i>	68	3,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0	68	0,6
<i>H. marginatum</i>	0	0,0	0	0,0	32	1,1	0	0,0	32	0,3
Итого	1831	100,0	2068	100,0	2901	100,0	3906	100,0	10706	100,0

* Сборы с растительности и животных.

** Сборы с растительности.

нием Пугачевского, это были разовые сборы клещей. Материал исследовали на наличие возбудителя ИКБ методом ПЦР, для выявления туляремийного антигена в клещах использовали серологический метод реакции объемной агломерации (РОА).

Результаты и обсуждение

К настоящему времени на территории Саратовской области выявлено 12 видов иксодовых клещей 5 родов: *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*. Наиболее распространены в природных биотопах клещи *Dermacentor margi-*

natus, *D. reticulatus*, *Rhipicephalus rossicus*, *Ixodes ricinus*. Виды *Dermacentor niveus*, *Ixodes crenulatus*, *I. persulcatus*, *Haemaphysalis punctata*, *Hyalomma marginatum* отмечены только в отдельные годы в единичных экземплярах. Клещи *H. scupense* присутствовали в сборах с крупных домашних животных, а *Rhipicephalus schulzei* и *I. laguri* связаны с малым сусликом. За последние 4 года при эпизоотологическом обследовании Саратовской области было собрано 10706 экз. клещей 10 видов (табл. 1).

Саратовская область располагается в границах лесостепной, степной и полупустынной природных зон (рис. 1). Количество видов иксодовых кле-

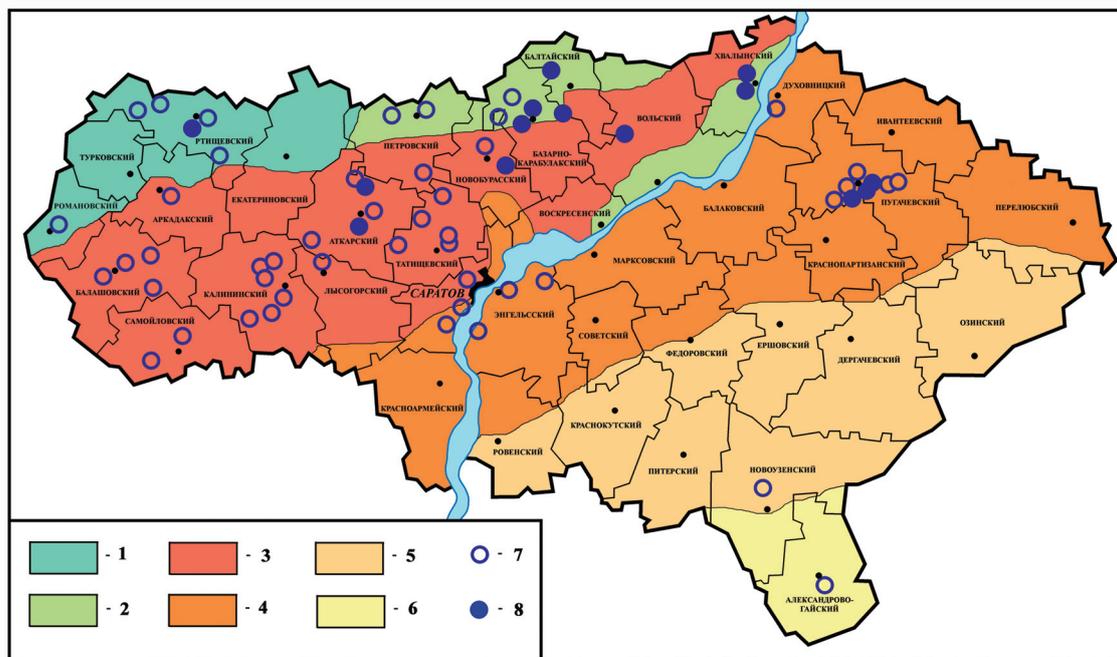


Рис. 1. Находки клещей рода *Ixodes* и положительных проб на иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) в различных природных зонах Саратовской области в 2002–2009 гг.:

Природные зоны и подзоны (по Лазаревой и др., 1996): 1 – луговая степь зоны лесостепей, 2 – лесолугостепь зоны лесостепей; 3 – северная степь зоны степей, 4 – типичная степь зоны степей, 5 – сухая степь зоны степей; 6 – полупустынная зона. Места находок клещей: 7 – с отрицательным и 8 – с положительным результатом на ИКБ

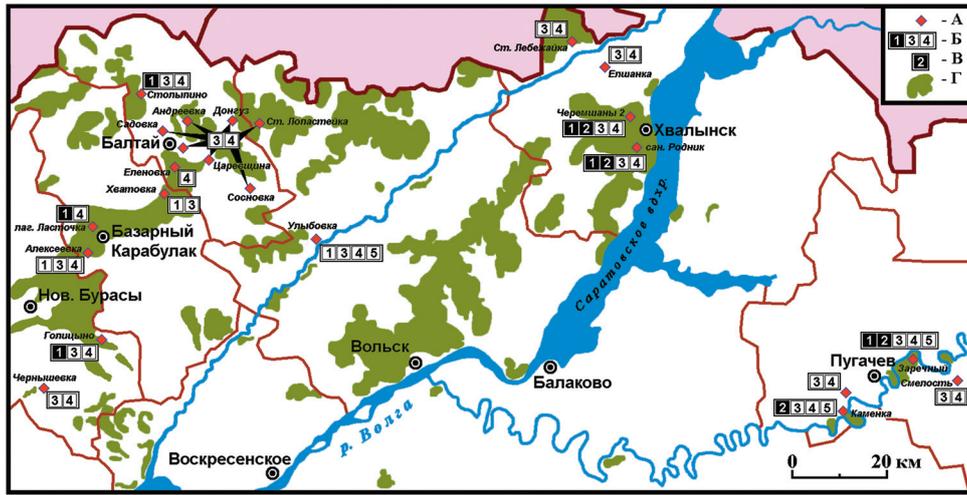


Рис. 2. Места сбора иксодовых клещей и обнаружения положительных проб на наличие возбудителя иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ) в северной части Саратовской области весной 2009 г.:

A – места сбора клещей; B – видовой состав сбора (1 – *I. ricinus*; 2 – *I. persulcatus*; 3 – *D. marginatus*; 4 – *D. reticulatus*; 5 – *Rh. rossicus*); B – виды клещей, зараженные ИКБ; Г – лесные массивы

щей (биоразнообразии), их численность и характер распределения в каждой из этих зон различаются. Повсеместно эти клещи распространены по территории неравномерно.

В апреле–мае 2009 г. нами была обследована территория северной части Саратовской области (рис. 2) в границах лесостепной и степной зон, где сбор иксодовых клещей проводился в четырех типах биотопов (табл. 2).

Пастбищные иксодовые клещи *D. marginatus* и *D. reticulatus* распространены во всех природных зонах и типах биотопов, по количеству явно преобладают над другими видами, достигая 95 % от общих сборов. Эти массовые виды клещей активно нападают на человека, паразитируют на домашних животных и на территории области являются переносчиками возбудителя туляремии [11, 14].

Клещи *D. marginatus* наиболее многочисленны. Средний индекс доминирования вида в сборах по области составил 53,7 %. Вид зарегистрирован в 16 районах Правобережья и зеленой зоне Саратова (ИД 59,0 %) и 11 районах Левобережья (ИД 41,0 %). В

2009 г. в северной части области он преобладал над другими видами – ИД 53,8 %. Оптимальными местами обитания являются открытые участки интразональных биотопов во всех ландшафтных зонах: луга и поймы рек, озер, ильменей, лиманов, берегов каналов и водотоков, поросших злаками, рудеральной или мезофильной растительностью. Высокая концентрация этих клещей приурочена также к опушкам и кромкам лесных массивов, обочинам железных и автомобильных дорог. В интразональных биотопах степной зоны отмечен максимальный индекс доминирования этого вида в сборах (табл. 2). Средняя численность *D. marginatus* весной 2009 г. составила 14,2 экз. на 1 фл./км с максимальными показателями в степных биотопах – 22,1 и по кромкам пойменных лесов – 23,5 экз. на 1 фл./км.

Клещи *D. reticulatus*, по данным многолетних сборов, составляют в среднем в Правобережье 59,6 %, в Левобережье – 40,4 %. Места обитания этих клещей приурочены к открытым участкам с обильной травянистой растительностью (заросли бурьяна, тростника), разреженными кустарниковыми зарос-

Таблица 2

Индексы доминирования (ИД) и обилия (ИО) иксодовых клещей в разных типах биотопов северной части Саратовской области весной 2009 г.

Вид клещей	ИД (в %) и ИО (экз. на 1 фл./км) по типам биотопов								Всего по территории	
	смешанные сухие леса		широколиственные леса				степные участки			
			пойменные		плакорные					
ИД	ИО	ИД	ИО	ИД	ИО	ИД	ИО	ИД	ИО	
<i>I. ricinus</i>	0,9	0,2	2,1	0,9	7,1	1,7	0,1	0,1	3,4	0,9
<i>I. persulcatus</i>	0,0	0,0	1,6	0,7	1,4	0,3	0,0	0,0	0,9	0,2
<i>I. species</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,1	0,0	0,0	0,2	0,1
<i>D. marginatus</i>	66,9	12,2	53,7	23,5	24,8	6,0	90,0	22,1	53,8	14,2
<i>D. reticulatus</i>	32,2	5,9	42,1	18,5	65,9	15,8	9,9	2,4	41,4	11,0
<i>Rh. rossicus</i>	0,0	0,0	0,5	0,2	0,3	0,1	0,0	0,0	0,3	0,1
Итого	100,0	18,3	100,0	43,8	100,0	24,0	100,0	24,6	100,0	26,5

лями и молодой порослью деревьев. Весной 2009 г. в северной части области средний ИД равнялся 41,4 % и был несколько ниже, чем у предыдущего вида. Они преобладали в широколиственных плакорных лесах (ИД 65,9 %). Средний индекс обилия этого вида составил 11,0 экз. на 1 фл./км при максимальных показателях численности по опушкам и кромкам широколиственных пойменных и плакорных лесов – 18,5 и 15,8 экз. на 1 фл./км соответственно. Достаточно низкая численность наблюдалась в степных биотопах и сухих смешанных лесах.

Клещ *Rh. rossicus* является обычным, но малочисленным видом. Распределение его по территории крайне неравномерное. Находки регистрируются в 13 районах Левобережья, 6 районах Правобережья и на территории Саратова. В степной зоне Левобережья он распространен широко (80,7 % от общих сборов по области), а в Правобережье – лишь на степных участках, примыкающих к Волге, и в лесопосадках (19,3 %). В полупустынной зоне является обычным обитателем, но здесь, как и в сухой степи, распространение его ограничено поймами рек, по берегам которых произрастает кустарниковая растительность. В 2006–2008 гг. в общих сборах индекс доминирования вида составил 6,0 % (в 2007 г. достигал 74,0 %), в северных районах области в 2009 г. находки его были малочисленными (ИД 0,3 %). Наиболее агрессивным по отношению к животным и человеку становится в июне–июле.

В последние годы в области наблюдается расширение ареала и нарастание численности клещей рода *Ixodes*, имеющих большое эпидемиологическое значение. По данным В.Ф. Давидович [1], *I. ricinus* в области был редок и встречался только в 4 районах лесостепной зоны Правобережья. К 2005 г. вид был обнаружен еще в 6 районах Правобережья и 5 районах Левобережья. Клещи были более многочисленны в районах Правобережья, чем Левобережья, где в сборах присутствовали единичные особи данного вида. Места обитания клеща *I. ricinus* приурочены к поймам рек, оврагам и лесным опушкам [11]. В 2006–2008 гг. до 93 % клещей *I. ricinus* также были собраны в районах Правобережья и лишь 6,9 % – Левобережья. При этом к территории распространения клещей прибавилось 4 района Правобережья и 2 – Левобережья. Весной 2009 г. *I. ricinus* впервые был зарегистрирован нами в Балтайском, Вольском и Базарно-Карабулакском районах. Помимо расширения ареала, происходит постепенное увеличение численности клещей на освоенных ими ранее территориях. Так, в Пугачевском районе, где вид был редким, в настоящее время он характеризуется как обычный: в пойменном лесу р. Большой Иргиз в апреле 2009 г. было собрано 89 экз. (68 %) клещей *I. ricinus*.

Полученные материалы свидетельствуют о том, что клещи *I. ricinus* встречаются во всех ландшафтно-географических зонах области (рис. 1). Наиболее заселена этими клещами зона лесостепи и подзона

типичной степи (за счет преобладания вида в интразональной пойме реки Большой Иргиз Пугачевского района).

Клещи *I. persulcatus* впервые были обнаружены на территории Пугачевского района в 2004 г. и впоследствии встречались крайне редко. Весной 2009 г. нами было собрано 36 экз. этого вида в Пугачевском и Хвалынском районах. Средний индекс доминирования составил 0,9 % при индексе обилия 0,2 экз. на 1 фл./км, максимально – 4 экз. на 1 фл./км (табл. 2). Оптимальными для них биотопами являются заросли кустарниковой и древесной растительности в широколиственных лесах.

По результатам лабораторных исследований клещей *I. ricinus* в 2002–2008 гг. этот вид активно участвует в циркуляции боррелий в природных биоценозах Ртищевского, Аткарского, Новобурасского, Турковского и Пугачевского районов. По материалам апреля–мая 2009 г. при исследовании 131 экз. клещей этого вида, объединенных в 48 проб, РНК возбудителя ИКБ была обнаружена нами в 17 пробах (36,4 %) на территории 6 обследованных районов севера области (табл. 3). Достаточно высокой оказалась доля положительных на боррелиоз проб от *I. persulcatus* – 61,5 %. Исследование других видов на ИКБ, а также всех видов собранных клещей на КЭ дало отрицательный результат. Таким образом, широкое распространение *I. ricinus* во всех природных зонах области, в том числе и в полупустынной, куда клещи проникают по интразональным элементам ландшафта, а также отмечаемое расширение ареала *I. persulcatus* являются одним из факторов укоренения клещевых инфекций на территории Саратовской области. В первую очередь, как очевидно, это касается ИКБ (рис. 1).

Таблица 3

Результаты исследования клещей рода *Ixodes* на наличие РНК возбудителя иксодового клещевого боррелиоза весной 2009 г.

Район	Вид клещей	Собрано клещей	Исследовано проб	Из них положительных	
				абс.	%
Пугачевский	<i>I. ricinus</i>	89	18	12	66,6
	<i>I. persulcatus</i>	23	8	5	62,5
	<i>Ixodes</i> (нимфы)	8	2	1	–
	Всего	120	28	18	64,3
Хвалынский	<i>I. ricinus</i>	17	5	1	–
	<i>I. persulcatus</i>	13	5	3	–
	Всего	30	10	4	40,0
Новобурасский	<i>I. ricinus</i>	11	11	2	18,2
	Всего	11	11	2	18,2
Базарно-Карабулакский	<i>I. ricinus</i>	11	11	1	9,09
	Всего	11	11	1	9,09
Балтайский	<i>I. ricinus</i>	2	2	1	–
	Всего	2	2	1	–
Вольский	<i>I. ricinus</i>	1	1	–	–
	Всего	1	1	–	–
Итого		175	63	26	41,3

Переносчиками туляремии в Саратовской области выступают клещи *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *Rh. rossicus*. В 2003–2004 гг. были выделены культуры туляремии (9 штаммов) от иксодовых клещей и выявлен туляремийный антиген в Хвалынском, Балаковском, Самойловском, Алгайском, Новоузенском районах и зеленой зоне Саратова [11, 12]. В последующие 2006–2008 гг. от клещей ежегодно обнаруживали только антиген туляремийного микроба в различных титрах (от 1:20 до 1:640). Такие находки были в Пугачевском, Краснопартизанском, Ровенском, Новоузенском, Энгельском, Советском, Татищевском, Петровском, Вольском, Аткарском и Ртищевском районах. Самые высокие титры антигена (1:320, 1:640) выявляли в пробах суспензий клещей в Саратовском районе (2008 г.) и зеленой зоне Саратова (2006 г.) соответственно. При исследовании на наличие ДНК возбудителя туляремии 3907 клещей (209 проб), собранных весной 2009 г., получен отрицательный результат. Таким образом, в последние годы отмечается низкая активность очагов туляремии, но постоянные находки антигена в клещах свидетельствуют об устойчивой циркуляции возбудителя в природных биоценозах.

Сложившаяся ситуация по распространению иксодовых клещей – потенциальных переносчиков инфекций в Саратовской области требует дальнейшего изучения ареалов, численности и инфицирования этих членистоногих, а также установления их эпидемиологического значения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Давидович В.Ф. Экологические факторы природной очаговости туляремии в Саратовской области [автореф. дис. ... канд. мед. наук]. Саратов; 1968. 18 с.
2. Коренберг Э.И. Иксодовые клещевые боррелиозы: основные итоги изучения и профилактики в России. В кн.: Клещевые боррелиозы: Матер. науч.-практ. конф. Ижевск; 2002. С. 165–72.
3. Лобзин Ю.В., Усков А.Н., Козлов С.С. Лайм-боррелиоз (иксодовые клещевые боррелиозы). СПб; 2000. 156 с.
4. Матросов А.Н., Чекашов В.Н., Красовская Т.Ю., Шарова И.Н., Кутырев И.В., Щербакова С.А. и др. Результаты эколого-эпизоотологического обследования в природных очагах зоонозов в левобережье Саратовской области. В кн.: Зоол. исслед. регионов России и сопредельных территорий: Матер. 2-й Междунар. науч. конф. Нижний Новгород; 2007. С. 172–6.
5. Мусина А.А. Эколого-эпидемиологические аспекты клещевых инфекций на юге Тюменской области [автореф. дис. ... канд. биол. наук]. Тюмень; 2009. 20 с.
6. Нафеев А.А., Фефилова Е.В. Причины, влияющие на заболеваемость иксодовым клещевым боррелиозом. Мед. паразитол. и паразитарн. бол. 2009; 3:42–4.
7. Онищенко Г.Г., Ефременко В.И., Бейер А.П., Брюханова Г.Д., Грижебовский Г.М., Евченко Ю.М. и др. Обстановка по Крымской геморрагической лихорадке в Южном Федеральном округе. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2006; 4 (прил.):5–12.
8. Ошерович А.М., Калошина Л.А., Кюрегян А.А. Заболеваемость клещевым энцефалитом и геморрагической ли-

хорадкой с почечным синдромом в России. Мед. паразитол. и паразитарн. бол. 2001; 3:36–8.

9. Сиротина Е.П., Дроздова В.Ф., Зубова Н.Ю., Бессонова В.Ф. Новые клещевые инфекции в Липецкой области. В кн.: Акт. аспекты паразитарных забол. в совр. период. Тюмень; 2008. С. 180–1.
10. Скачков М.В., Яковлев А.Г., Плотникова О.А., Мамедова Н.М., Назаренко С.В., Петрищева Г.В. Роль различных видов иксодовых клещей как переносчиков возбудителей клещевого энцефалита и боррелиозов в Оренбургской области. Мед. паразитол. и паразитарн. бол. 2007; 3:27–30.
11. Турцева М.А. Спонтанные микроценозы некоторых видов иксодовых клещей (*Ixodidae*) и слепней (*Tabanidae*) [автореф. дис. ... канд. биол. наук]. Саратов; 2005. 20 с.
12. Турцева М.А., Котоманова В.Г., Сантылова О.А., Сауринова О.Л. Особенности экологии *Rhipicephalus rossicus* (Yakimov et Kohl-Yakimova, 1911) в Саратовской области. Энтомологические и паразитологические исследования в Поволжье. Саратов; 2007. 6: 99–102.
13. Турцева М.А., Федорова З.П., Данилов А.Н., Баракин А.А. Иксодовые клещи (*Ixodidae*) и их роль в сохранении туляремии в Саратовской области. В кн.: Совр. пробл. общей, медицинской и ветеринарной паразитол.: Тр. IV Междунар. науч. конф. Витебск; 2004. С. 364–6.
14. Федорова З.П. Туляремия в Саратовской области [автореф. дис. ... канд. мед. наук]. Саратов; 1995. 26 с.
15. Gorelova N.B., Korenberg E.I., Kovalevskii Y.V., Shcherbakov S.V. Small mammals as reservoir hosts for Borrelia in Russia. Zbl. Bakt. 1995; 282(3):315–22.

Об авторах:

Турцева М.А., Кресова У.А., Котоманова В.Г., Сантылова О.А. Центр гигиены и эпидемиологии в Саратовской области. 410031, Саратов, ул. Б. Горная, 69. E-mail: gorses@rol.ru
 Матросов А.Н., Чекашов В.Н., Поршаков А.М., Яковлев С.А., Шарова И.Н., Красовская Т.Ю., Кузнецов А.А., Князева Т.В., Мокроусова Т.В., Щербакова С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

М.А. Turtseva, U.A. Kresova, A.N. Matrosov, V.N. Chekashov, A.M. Porshakov, S.A. Yakovlev, I.N. Sharova, T.Yu. Krasovskaya, A.A. Kuznetsov, T.V. Knyazeva, T.V. Mokrousova, S.A. Scherbakova, V.G. Kotomanova, O.A. Santylova

The New Data on Distribution of Ixodic Ticks and Agents of Natural-Focal Infections Transferred by Them in Saratov Region

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

The expansion of areas and increase of the number of *Ixodes* ticks lead to distribution of ixodic tick-borne borreliosis agent in the territory of Saratov region. There exists the potential danger of activation of the natural foci of tularemia, formation of tick-borne encephalitis and Crimean hemorrhagic fever foci, their reservoirs and vectors being the ixodic ticks inhabiting the territory of the region.

Key words: ixodic ticks, ixodic tick-borne borreliosis, tularemia.

Authors:

Turtseva M.A., Kresova U.A., Kotomanova V.G., Santylova O.A. Center of Hygiene and Epidemiology in Saratov Region. 410031, Saratov, B. Gornaya St., 69. E-mail: gorses@rol.ru
 Matrosov A.N., Chekashov V.N., Porshakov A.M., Yakovlev S.A., Sharova I.N., Krasovskaya T.Yu., Kuznetsov A.A., Knyazeva T.V., Mokrousova T.V., Scherbakova S.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 05.11.09.

**И.Н.Шарова, И.Г.Карнаухов, Е.С.Казакова, Д.А.Щербаков, М.В.Пчелинцева,
В.Н.Чекашов, А.М.Поршаков, А.Н.Глазков, С.А.Щербакова,
А.В.Топорков, В.В.Кутырев**

РАЗРАБОТКА МОБИЛЬНОЙ ЛАБОРАТОРИИ ИНДИКАЦИИ ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫХ И ДРУГИХ ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

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

Определены и обоснованы основные характеристики мобильной лаборатории индикации для осуществления эпизоотологического мониторинга особо опасных и других природно-очаговых инфекций (функциональные возможности, тип базового транспортного средства, производственная мощность, штат специалистов, предполагаемый уровень биологической безопасности, степень автономности).

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

В соответствии с Международными медико-санитарными правилами (2005 г.) и санитарно-эпидемиологическими правилами «Санитарная охрана территории Российской Федерации» (2008 г.) важной составляющей частью мероприятий, обеспечивающих надежную санитарную охрану территории Российской Федерации, является система национального эпидемиологического надзора, включающая осуществление эпизоотологического мониторинга за состоянием и активностью природных очагов инфекционных болезней [3, 17, 20, 22]. В соответствии с приказами Роспотребнадзора от 17.03.2008 г. № 88 «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней» и от 08.05.2008 г. № 152 «О совершенствовании организации и проведении мероприятий по профилактике чумы», функции мониторинга природных очагов особо опасных и других инфекционных болезней бактериальной и вирусной природы возложены на учреждения противочумной системы и ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах РФ [18, 19].

Эпизоотологическое наблюдение в природных очагах чумы и других опасных природно-очаговых инфекций проводится силами специальных подразделений – сезонными противоэпидемическими отрядами или бригадами, которые обеспечивают необходимый комплекс эпизоотологического обследования на закрепленной за ними территории. Для автономной работы подразделения оборудуются бактериологическими лабораториями. При организации лаборатории в полевых условиях трудно выполнить все требования биологической безопасности, предъявляемые к лабораторным помещениям. Материал для проведения диагностических исследований часто доставляется в стационарные лаборатории, находящиеся на значительном удалении от обследуемой территории, что снижает оперативность и эффективность анализа. Использование мобильной лаборатории на базе автошасси в этих

случаях могло бы обеспечить необходимое качество лабораторной диагностики, соблюдение требований биологической безопасности работы, увеличение объема и повышение эффективности эпизоотологического обследования природных очагов опасных инфекционных болезней, в том числе и сочетанных, а также более рациональное использование кадрового состава противочумных станций и отделений, центров гигиены и эпидемиологии в современных условиях.

В РосНИПЧИ «Микроб» имеется положительный опыт использования мобильной лаборатории при эпизоотологическом мониторинге. С 2007 г. в мобильной лаборатории эпидразведки и индикации на базе автомашины «Газель» в полевых условиях проводятся диагностические исследования материала, собранного в ходе эпизоотологического обследования территорий Саратовской области и других регионов Российской Федерации [1, 2, 23, 24]. Однако, обеспечивая высокую эффективность экспресс-диагностики, соблюдение требований биологической безопасности лабораторных и зоолого-паразитологических работ, мобильная лаборатория эпидразведки и индикации на базе автомашины «Газель» не имеет условий для проведения бактериологического анализа – «золотого стандарта» лабораторной диагностики, позволяющего определить таксономическую принадлежность, свойства и степень эпидемической опасности циркулирующего на данной территории возбудителя.

Исходя из задач лабораторной службы, решаемых в ходе эпизоотологического обследования территории природных очагов, таких как лабораторные исследования (индикация, бактериологический анализ) биологического полевого материала и объектов окружающей среды на наличие возбудителей природно-очаговых инфекций, а также участие в проведении экстренных противоэпидемических мероприятий по выявлению, локализации и ликвидации очагов опасных инфекционных болезней бактериальной и

вирусной этиологии, возникших вследствие активизации природных очагов инфекций, мобильная лаборатория индикации для осуществления эпизоотологического мониторинга особо опасных и других природно-очаговых инфекций (далее – мобильная лаборатория) должна соответствовать следующим требованиям:

1. Представлять собой передвижную лабораторную базу, направляемую в различные участки природных очагов инфекций с целью эпизоотологического обследования территории, состоящую из двух модулей.

Целесообразно размещение первого модуля на базовом шасси типа КамАЗ-43118, повышенной проходимости, монтаж второго – на базе трехосного прицепа типа СЗАП-8305 или аналогичного по характеристикам, так как в случае использования одного модуля невозможно обеспечить необходимый набор рабочих помещений, разместить лабораторное оборудование, обязательное для выполнения всех процедур при проведении лабораторной диагностики в мобильной лаборатории в ходе эпизоотологического обследования территории.

Мобильная лаборатория может использоваться как противочумными станциями Роспотребнадзора при проведении эпизоотологического обследования природных очагов чумы и других инфекционных болезней, так и другими учреждениями Роспотребнадзора при осуществлении эпидемиологического надзора за природно-очаговыми инфекциями, в том числе вирусной этиологии.

2. Работа лаборатории должна осуществляться в автономном режиме, для чего модули следует оборудовать системами энергообеспечения, вентиляции, кондиционирования и обогрева, водоснабжения, оснастить приборами навигации и связи.

Работа мобильной лаборатории может проводиться в условиях полной или частичной автономии. В условиях полной автономии к мобильной лаборатории придаются один или два автомобиля повышенной проходимости типа «УАЗ» или «Газель» для перевозки штатного состава и последующей работы зоо групп, которые осуществляют сбор и доставку полевого материала. Также необходим грузовой автомобиль повышенной проходимости для доставки пневмокаркасных модулей, обеспечивающих хозяйственно-жилую инфраструктуру (жилая палатка, кухня, столовая), их оснащения, запасов продовольствия, топлива, воды и т.п.

Работа в условиях частичной автономии подразумевает возможность дислокации мобильной лаборатории в населенных пунктах, наличие возможности размещения и питания личного состава в стационарных помещениях, а также возможность подключения лаборатории к стационарным электросетям.

3. В соответствии с действующими на территории Российской Федерации нормативно-методическими документами [4–16], регламентирующими осуществление эпизоотологического мониторинга,

мобильная лаборатория должна выполнять следующие функции и иметь соответствующие рабочие места и приборную базу, обеспечивающие:

- сортировку, первичную обработку полевого материала: очес грызунов, разбор гнезд, вскрытие грызунов;

- энтомологическое исследование: определение вида, пола, фаз развития и пр. эктопаразитов (блох, клещей), составление пулов для проведения лабораторного анализа;

- подготовку проб для бактериологического, иммуносерологических, молекулярно-генетических исследований;

- исследование проб полевого материала с использованием следующих методов: полимеразной цепной реакции (ПЦР), иммуно-ферментного анализа (ИФА), метода флуоресцирующих антител (МФА), серологических методов, бактериологического анализа;

- дезинфекцию и мойку посуды, используемой при подготовке проб (ступки, стаканы и пр.), подготовку и розлив питательных сред, обеззараживание автоклавированием объектов, контаминированных ПБА, после проведения исследований.

Лаборатория должна обеспечивать диагностические исследования биологического полевого материала и объектов окружающей среды на наличие возбудителей особо опасных и других природно-очаговых инфекций, таких как чума, туляремия, лептоспироз, высокопатогенный грипп птиц, риккетсиозы, лихорадка Западного Нила, Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ), геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), клещевой энцефалит (КЭ), других арбовирусных инфекций, обусловленных вирусами Батаи, Калифорнийской серогруппы, Синдбис, Дхори. В случае необходимости, в мобильной лаборатории возможно также проведение исследований клинического материала на наличие вышеперечисленных инфекций.

На территории Российской Федерации установлена природная очаговость инфекционных болезней, вызванных в основном возбудителями бактериальной природы I–IV групп патогенности (опасности) и/или возбудителями вирусной природы II–IV групп патогенности. В этих условиях контакт персонала с материалом, содержащим вирусы I группы патогенности, имеет малую вероятность, так как они неэндемичны/неэнзоотичны для данной территории.

Согласно п. 2.14.3. СП 1.3.1285-03 [21] любой материал считается потенциально опасным в отношении возможного содержания возбудителей природно-очаговых болезней, свойственных той ландшафтной зоне, в пределах которой он собран. Учитывая вышеизложенное и в соответствии с требованиями СП 1.3.1285-03 считаем достаточным для мобильной лаборатории при проведении эпизоотологического обследования обеспечение уровня биологической безопасности BSL-2 согласно классификации ВОЗ. В связи с этим помещение мобильной лаборатории

должно отвечать следующим требованиям и быть оборудовано:

- санпропускником с душем;
- системой вентиляции, снабженной фильтрами тонкой очистки (НЕРА-фильтрами);
- боксами биологической безопасности II класса защиты;
- автоклавом для деконтаминации биологических отходов;
- бактерицидными облучателями в рабочих помещениях лаборатории;
- выполнение внутренней облицовки стен и потолка рабочих помещений мобильной лаборатории должно быть произведено из материала с гладкой, устойчивой к действию моющих и дезинфицирующих средств поверхностью, с гидроизоляцией стыков панелей; покрытие пола – из современного материала, устойчивого к действию моющих и дезинфицирующих средств, позволяющего загерметизировать стыки между полами и стенами;
- выполнение поверхностей рабочих столов из нержавеющей стали.

В лаборатории должно быть предусмотрено наличие:

- емкостей для сбора сточных вод с возможностью проведения химической дезинфекции;
- оборудования для дезинфекционной обработки;
- аварийной звуковой сигнализации;
- аварийных аптечек и аптечек экстренной профилактики.

В помещениях, где проводят работу с ПБА, обязательно использование средств индивидуальной защиты в соответствии с предполагаемым уровнем биологической опасности работ.

Для проведения исследований (в соответствии с выполняемыми функциями) в штатную структуру мобильной лаборатории должны входить: 3 врача-бактериолога, 1 врач-вирусолог, 1 зоолог, 1 паразитолог, 3 лаборанта с обязанностями дезинфектора, 1 инженер, 1 водитель с обязанностями дезинфектора. Предполагаемая производительная мощность мобильной лаборатории: до 30 проб в сутки объектов окружающей среды (вода, ил, субстрат гнезд и др.), до 100 проб биологического материала (до 30 экз. птиц, до 100 экз. грызунов, 200 экз. клещей, до 500 экз. комаров, блох).

Разработка и внедрение в практику мобильных лабораторий, укомплектованных современным высокотехнологичным оборудованием и отвечающих вышеуказанным требованиям, позволит расширить спектр, повысить качественный уровень лабораторных исследований и гарантировать соблюдение требований биологической безопасности при работе с ПБА в полевых условиях, что в конечном итоге усилит потенциал учреждений Роспотребнадзора, обеспечивающих санитарно-эпидемиологическое благополучие населения Российской Федерации.

Работа выполнена по Государственному контрак-

ту № 112-Д от 11.06.2009 г. в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Красовская Т.Ю., Шарова И.Н., Чекашов В.Н. и др. Алгоритм комплексного исследования полевого материала на наличие возбудителей природно-очаговых бактериальных и вирусных инфекций в условиях мобильной лаборатории индикации и эпидразведки. 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. Саратов; 2007. С. 234–5.
2. Матросов А.Н., Чекашов В.Н., Красовская Т.Ю. и др. Результаты эколого-эпизоотологического обследования в природных очагах зоонозов в левобережье Саратовской области. В кн.: Зоологические исследования регионов России и сопредельных территорий: Матер. II Междунар. науч. конф. Нижний Новгород; 2007. С. 172–6.
3. Международные медико-санитарные правила (2005 г.). Женева: ВОЗ; 2006.
4. Методические указания по организации и проведению эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации. МУ 3.1.3.2355-08.
5. Методические указания «Эпидемиологический надзор за туляремией» МУ 3.1.2007-05.
6. Методические указания «Эпидемиология, диагностика и профилактика заболеваний лептоспирозами» МУ 3.1.1128-02.
7. Методические указания «Организация и проведение профилактических и противоэпидемических мероприятий против Крымской геморрагической лихорадки» МУ 3.1.3.2488-09.
8. Методические указания «Организация эпидемиологического надзора за клещевым риккетсиозом» МУ 3.1.1755-03.
9. Методические указания по клинике, диагностике и лечению клещевого энцефалита. Приложение 1 к приказу Минздрава СССР № 141 от 09.04.90 г.
10. Методические указания «Организация и проведение лабораторной диагностики заболеваний, вызванных высокоvirulentными штаммами вируса гриппа птиц типа А (ВГПА), у людей». МУК 4.2.2136-06.
11. Методические рекомендации «Организация мониторинга заносов и распространения гриппа птиц в природных условиях на территории Российской Федерации» МР № 01/15701-8-34 от 2008 г.
12. Методические указания «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих-переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций». МУ 3.1.1027-01.
13. Методические указания «Методические указания по отлову, учету и прогнозу численности мелких млекопитающих и птиц в природных очагах зоонозов». МУ 3.1.1029-01.
14. Методические указания «Эпидемиологический надзор за лихорадкой Западного Нила в Астраханской области, специфическая диагностика заболевания, меры общественной и личной профилактики» МУ 3.1.3.002-2000.
15. Методические рекомендации «Выявление циркуляции арбовирусов. Методы вирусологических и серологических исследований. Клинико-эпидемиологические характеристики малоизученных арбовирусных инфекций. Подходы к мониторингу природных очагов арбовирусов». М., 1991.
16. Методические рекомендации «Применение культурального антигена для серодиагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом с помощью метода флюоресцирующих антител». М., 1984.
17. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Кривуля С.Д., Федоров Ю.М., Топорков В.П. Санитарная охрана территории Российской Федерации: современное нормативно-методическое, организационное и научное обеспечение. Пробл. особо опасных инф. 2007; 1(93):5–11.
18. Приказ Роспотребнадзора от 17.03.2008 г. № 88 «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней».
19. Приказ Роспотребнадзора от 08.05.2008 г. № 152 «О совершенствовании организации и проведении мероприятий по профилактике чумы».
20. Санитарно-эпидемиологические правила «Санитарная охрана территории Российской Федерации» СП 3.4.2318-08.
21. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» СП 1.3.1285-03.
22. Топорков А.В., Топорков В.П., Шиянова А.Е., Кутырев В.В. Чрезвычайная ситуация в области санитарно-эпидемиоло-

гического благополучия населения как унифицированный объект надзора и оперативного реагирования в рамках современной стратегии борьбы с инфекционными болезнями. Пробл. особо опасных инф. 2009; 2(100):5–11.

23. Шарова И.Н., Красовская Т.Ю., Кутырев И.В. и др. Опыт использования мобильной лаборатории при проведении эпизоотологического обследования 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. Саратов; 2007. С. 141–3.

24. Шарова И.Н., Кутырев И.В., Куклев В.Е. и др. Полевые испытания мобильной лаборатории эпидразведки и индикации на базе автомашины ГАЗ 27057. Сообщение I. Полевые испытания мобильной лаборатории эпидразведки и индикации на территории Саратовской области, Ставропольского края и Кабардино-Балкарской Республики. Пробл. особо опасных инф. 2009; 2(100):30–7.

Об авторах:

Шарова И.Н., Карнауков И.Г., Казакова Е.С., Щербakov Д.А., Пчелинцева М.В., Чекашов В.Н., Поршаков А.М., Глазков А.Н., Щербakova С.А., Топорков А.В., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

I.N.Sharova, I.G.Karnaukhov, E.S.Kazakova, D.A.Scherbakov, M.V.Pchelintseva, V.N.Chekashov, A.M.Porshakov, A.N.Glazkov, S.A.Scherbakova, A.V.Toporkov, V.V.Kutyrev

Development of Mobile Indication Laboratory for Carrying out the Epizootiological Monitoring of Natural-Focal and Other Dangerous Infectious Diseases

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

Determined and substantiated were the main characteristics of mobile indication laboratory in view of carrying out epizootiologic monitoring of natural-focal and other dangerous infectious diseases (functional capabilities, type of basic means of transport, production capacity, technical staff, proposed biosafety level and independence degree).

Key words: mobile laboratory, epidemiologic surveillance, indication, express-diagnostics, epizootiologic monitoring.

Authors:

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

Поступила 14.09.09.

А.А.Борздов, В.И.Ефременко, И.Ю.Борздова, О.В.Логвиненко, А.И.Бондаренко

**ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ
ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПУТЯХ ВВЕДЕНИЯ ИМ ИНТАКТНЫХ ЛИПОСОМ**

ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»

Проведена оценка состояния иммунитета (факторов естественной резистентности, клеточного и гуморального), а также изучена функциональная и ферментативная активность нейтрофилов крови при различных путях введения (пероральное и внутрибрюшинное) экспериментальным животным интактных липосом, сформированных из липидов, выделенных из свиного головного мозга. Показано, что независимо от способа введения, липосомы оказывают длительное стимулирующее действие на иммунокомпетентные клетки, более выраженное при внутрибрюшинном введении препарата.

Ключевые слова: липосомы, естественный иммунитет, фагоцитоз, лимфоциты.

В решении проблемы направленного транспорта биологически активных соединений в отдельные органы, ткани и клетки макроорганизма значительная роль отводится нанокапсулам – липосомам как контейнерам направленного действия для доставки лекарственных средств [1, 3, 14, 21].

Способность липосом обеспечивать доставку лекарств внутрь клетки предопределяет их успешное использование при лечении многих заболеваний, в том числе и инфекционных [5, 8, 11, 12, 18, 21].

При оценке действия различных липосомальных препаратов важно учитывать их способность влиять на клеточные и гуморальные факторы иммунитета макроорганизма, так как липосомы, в первую очередь, имеют тропность к клеткам ретикулоэндотелиальной системы и иммунокомпетентным клеткам [3, 6]. Компоненты бислойной мембраны липосом при нахождении, пероральном и парентеральном путях введения активно взаимодействуют с клеточными системами макроорганизма и включаются в метаболические процессы, вызывая при этом обратимые изменения их функционального состояния, а также биохимических и цитохимических показателей [9, 10].

Однако многие механизмы их влияния на иммунную систему организма до конца еще не изучены и ограничиваются единичными сообщениями [2, 4].

Целью данного исследования явилось изучение некоторых показателей естественного иммунитета у экспериментальных животных при различных путях введения (пероральном и внутрибрюшинном) интактных липосом, мембрана которых была сформирована из фосфолипидов и липидов, выделенных из свиного головного мозга, которые были представлены фосфатидилхолином, фосфатидилэтаноламином, фосфатидилсерином, фосфатидилинозидом, сфингомиелином, цереброзидом и холестерином.

Липосомы получали методом встряхивания. Формирование липосом, поперечный размер которых достигал 300–800 нм, контролировали при

электронно-микроскопическом исследовании. Концентрация липидов в полученном препарате липосом составила 35 мг в 1 мл фосфатного буфера, рН 7,2.

Для изучения действия липосом на иммунологические показатели использовали беспородных белых мышей обоих полов массой 18–20 г, выращенных в питомнике СтавНИПЧИ. Экспериментальных животных разделили на 4 группы. Животным 1-й и 2-й групп однократно перорально через зонд вводили по 1,0 мл 0,85 % NaCl, рН 7,2 (контрольная группа – 50 мышей) и по 1 мл взвеси липосом (опытная группа – 50 мышей), 3-й и 4-й группам животных (по 50 мышей) вышеуказанные препараты однократно инъецировали внутрибрюшинно по 1 мл.

После декапитации животных исследование иммунологических характеристик крови проводили в динамике на 5, 7, 14, 21, 28-е сутки после введения препаратов. Состояние естественного иммунитета оценивали по уровню общего комплемента, фагоцитарной активности нейтрофилов крови и изучению кластеров дифференцировки иммунокомпетентных клеток.

Реакцию комплемента проводили в 1 % агарозном геле с использованием коммерческого комплемента, нативных эритроцитов барана и коммерческой гемолитической сыворотки. Диаметр кольца лизиса эритроцитов барана учитывали при помощи линейки для серологических реакций. Лимфоциты выделяли в градиенте плотности фиколл-верографин [15, 19]. При определении клеток, экспрессирующих CD⁺ антиген, использовали Fits conjugate производства Coltag laboratories.

Для изучения фагоцитарной активности макрофагов крови животных использовали тест, основанный на регистрации количества клеток, способных к поглощению объектов фагоцитоза. Учитывались все типы фагоцитирующих клеток (нейтрофилы, эозинофилы, моноциты). В качестве объекта фагоцитоза использовали пекарские дрожжи, предварительно

тщательно отмытые в 0,85 % растворе NaCl, pH 7,2. Реакцию проводили в спонтанном и индуцированном состояниях. Для стимуляции полиморфно-ядерных лейкоцитов использовали пирогенал коммерческий. Приготовленные мазки фиксировали в метиловом спирте и окрашивали методом Романовского-Гимза, подсчет проводили в 100 клетках.

При выявлении в нейтрофилах крови лизосомальных катионных белков (КБ) использовали методику В.Е.Пигаревского [16]. В местах наличия КБ отмечалось окрашивание гранул в зеленый цвет. Миелопероксидазу (МПО) в этих же клетках крови определяли по методу Р.Лилли [7]. Активность пероксидазы выявлялась в клетках миелоидного ряда в виде желтовато-коричневых гранул.

Содержание КБ и МПО определяли полуколичественным методом с последующим определением среднего цитохимического показателя. Основой метода является определение степени интенсивности реакции по количеству окрашенного вещества цитоплазмы.

Полученные данные обрабатывали статистически по методике И.А.Ойвина [13] с определением показателей М (средних величин), m (их ошибок) и достоверности различий. Последний определяли с помощью критерия Стьюдента. При уровне статистической значимости $P < 0,05$ результаты считались достоверными.

Нам представлялось интересным проследить динамику изменения фагоцитарной активности нейтрофилов, так как нарушение функций нейтрофильных гранулоцитов крови, являющихся активными фагоцитами, является одной из причин летального исхода при бактериальных инфекциях. Наоборот, благоприятный исход при многих заболеваниях наблюдается в результате выраженного фагоцитарного ответа. Зависимость фагоцитоза от физического состояния организма представляет собой реальную основу для использования фагоцитарных реакций в качестве ин-

дикатора для оценки состояния естественного иммунитета организма.

В эксперименте изучали факторы естественной резистентности организма, включающие фагоцитарную активность нейтрофильных гранулоцитов при пероральном и внутривнутрибрюшинном введении экспериментальным животным липосом. В ходе проведенных исследований было показано, что уровень фагоцитарной активности нейтрофилов крови белых мышей в спонтанном и индуцированном состояниях при пероральном и внутривнутрибрюшинном введении интактных липосом был достоверно выше, чем в группах контрольных животных ($P < 0,05$).

Увеличение уровня фагоцитарной активности нейтрофилов (рис. 1) как в спонтанном, так и в индуцированном состоянии у экспериментальных животных, по сравнению с показателями контрольных групп, отмечали уже на 5-е сутки наблюдения: при пероральном введении индуцированный фагоцитоз составил $(93,0 \pm 1,4) \%$; спонтанный – $(90,0 \pm 0,4) \%$; контрольные показатели – $(91,0 \pm 0,4) \%$ и $(82,0 \pm 2) \%$ соответственно; при внутривнутрибрюшинном введении индуцированный фагоцитоз соответствовал $(95,0 \pm 0,8) \%$; спонтанный – $(94,0 \pm 0,8) \%$; контроль – $(92,0 \pm 0,4) \%$ и $(84,0 \pm 2) \%$ соответственно.

На 14-е сутки исследования фагоцитарная активность нейтрофилов во всех группах животных достигала максимальных значений: при пероральном введении липосом в спонтанном состоянии – $(94,0 \pm 1,3) \%$; в индуцированном – $(98,0 \pm 1,5) \%$; у контрольной группы – $(86,0 \pm 2) \%$ и $(90,0 \pm 3,7) \%$ соответственно. При внутривнутрибрюшинном введении липидных везикул в спонтанном состоянии – $(95,0 \pm 0,8) \%$; в индуцированном – $(99,0 \pm 2) \%$; контрольная группа в спонтанном состоянии – $(87,0 \pm 3) \%$; в индуцированном – $(92,0 \pm 0,6) \%$.

К 21–28-м суткам наблюдения во всех группах животных отмечали незначительное снижение уровня фагоцитарной активности нейтрофилов. Однако, по сравнению с величинами контрольных групп, показатели были выше: при пероральном введении липосом показатель индуцированного фагоцитоза соответствовал $(95,0 \pm 1,8) \%$; спонтанного – $(92,0 \pm 1,1) \%$; показатели контроля – $(92,0 \pm 2,5) \%$ и $(85,0 \pm 3) \%$ соответственно. При внутривнутрибрюшинном введении липосом – $(96,0 \pm 0,4) \%$ (индуцированный фагоцитоз), $(92,0 \pm 0,1) \%$ (спонтанный фагоцитоз). Контрольные группы животных имели показатели – $(92,0 \pm 0,8) \%$ и $(86,0 \pm 2) \%$ соответственно.

В литературе имеются данные об использовании изменений показателей функционально-метаболической активности нейтрофилов для диагностики иммунологического статуса макроорганизма, оценки тяжести протекающих в организме бактериальных и вирусных инфекций [17]. При оценке функционально-метаболических изменений в нейтрофилах крови экспериментальных животных были использованы цитохимические методы исследования и изучены наиболее важные представители микро-

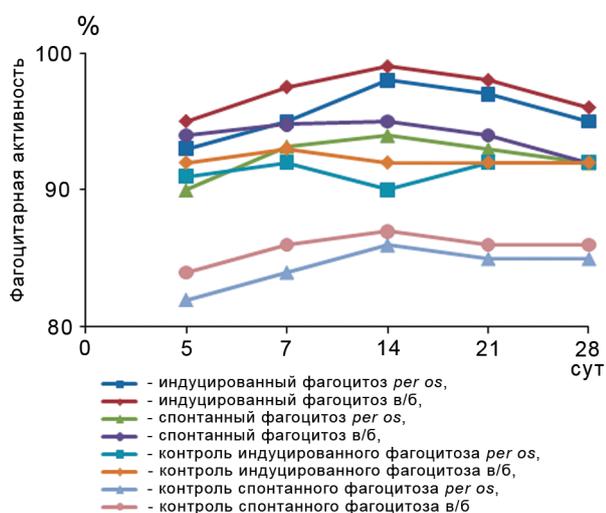


Рис. 1. Изменение фагоцитарной активности нейтрофилов крови животных при разных путях введения интактных липосом

бицидной системы, непосредственно участвующие в стадии киллинга фагоцитированных объектов – КБ и МПО.

Динамика изменения активности исследуемых цитохимических показателей была следующей (рис. 2). При пероральном и внутрибрюшинном введениях липосомального препарата отмечали достоверное ($P < 0,05$) увеличение количественного содержания КБ и МПО в нейтрофилах крови по сравнению с аналогичными показателями в контрольных группах животных.

При пероральном введении интактных липосом на 5-е сутки наблюдения содержание КБ ($1,12 \pm 0,04$) и активность МПО ($0,99 \pm 0,06$) превышали показатели контрольной группы ($0,81 \pm 0,07$ и $0,94 \pm 0,03$ соответственно). Содержание КБ при пероральном способе введения достоверно повышалось на 7–14-е сутки – $1,18 \pm 0,06$; МПО на 21–28-е сутки – $1,21 \pm 0,12$. При внутрибрюшинном введении препарата максимальное содержание КБ ($1,19 \pm 0,04$) и активность МПО ($1,12 \pm 0,07$) отмечали в ранние сроки наблюдения – на 5-е сутки, что достоверно ($P < 0,05$) превышало данные контрольных групп ($0,85 \pm 0,04$ и $0,96 \pm 0,04$ соответственно). В последующие сроки наблюдения с 7-х до 28-х суток эти показатели в опытных группах имели тенденцию к снижению (КБ – $0,9 \pm 0,03$; МПО – $0,99 \pm 0,03$), однако превышали данные контрольных групп животных.

В эксперименте изучали уровень общего комплемента в сыворотке крови белых мышей. Введение интактных липидных везикул как при пероральном, так и при внутрибрюшинном поступлении в организм сопровождалось повышением уровня общего комплемента в сыворотке крови во все сроки наблюдения по сравнению с показателями у контрольной группы (таблица). Максимальные числовые значения общего комплемента определялись на 5-е сутки после введения липосом при всех путях введения

($298,0 \pm 22$ – пероральное; $240,0 \pm 21$ – внутрибрюшинное). В последующие сроки исследования, начиная с 7-х суток и до конца эксперимента (28-е сутки), прослеживалась тенденция к постепенному снижению уровня исследуемого показателя ($220,0 \pm 22$ – пероральное; $198,0 \pm 11$ – внутрибрюшинное), однако до конца эксперимента искомый показатель статистически значимо превышал данные в контрольной группе ($P < 0,05$).

В ходе проведенного эксперимента было выявлено, что введение животным интактных липосом сопровождалось увеличением количества клеток, экспрессирующих CD3 антиген. На 5-е сутки наблюдения количество CD3+ клеток при пероральном введении препарата соответствовало ($38,0 \pm 2,6$) %; при внутрибрюшинном – ($42,0 \pm 2,4$) %; контрольные группы – ($38,0 \pm 1,6$) % и ($39,0 \pm 0,8$) % соответственно. Как следует из данных таблицы, максимальные показатели выявлялись на 14-е сутки от начала опыта, затем происходило постепенное снижение до значений ($38,0 \pm 3,8$) % и ($40,0 \pm 1,2$) % соответственно. Через 28 сут от начала введения липидных везикул при разных путях их поступления количество CD3+ клеток достоверно не отличалось от данных контрольных групп животных ($P > 0,05$).

При изучении уровня динамики изменений количества CD4+ клеток в крови животных установлено, что при пероральном введении в их организм липосом колебания показателей CD4+ клеток носили волнообразный характер со снижением их уровня в более отдаленные сроки опыта (28-е сутки) до показателей в контрольной группе животных – ($22,0 \pm 1,9$) % и ($22,0 \pm 1,2$) % соответственно. При внутрибрюшинном введении количество CD4+ клеток имело тенденцию к постепенному снижению к окончанию эксперимента, однако к 28-м суткам контрольные величины оставались ниже по сравнению с данными в опытной группе – ($23,0 \pm 1,4$) % и ($24,0 \pm 1,2$) % соответственно ($P > 0,05$). Максимальное количество CD4+ клеток при пероральном и внутрибрюшинном введениях отмечалось на 5-е сутки от начала опыта – ($32,0 \pm 1,2$) %.

Динамика изменения в крови экспериментальных животных CD8α+ клеток при разных способах введения фосфолипидных везикул носила волнообразный характер. На 5-е сутки исследования показатели имели максимальное значение – ($25,0 \pm 1,5$) % (пероральное введение), ($23,5 \pm 1,2$) % (внутрибрюшинное введение). На 7-е сутки отмечали тенденцию к снижению количества CD8α+ клеток до ($19,0 \pm 1$) % при пероральном способе введения по сравнению с результатами контрольной группы – ($20,0 \pm 1,3$) %. К 14-м суткам наблюдения исследуемые показатели незначительно увеличивались, а к 21-м суткам – понижались вновь. К концу опыта при пероральном введении препаратов в группе контрольных животных количество CD-8α+ клеток в крови было выше – ($20,0 \pm 1,3$) %, чем в опытной – ($19,8 \pm 1,1$) %. При внутрибрюшинном поступлении препарата к окончанию

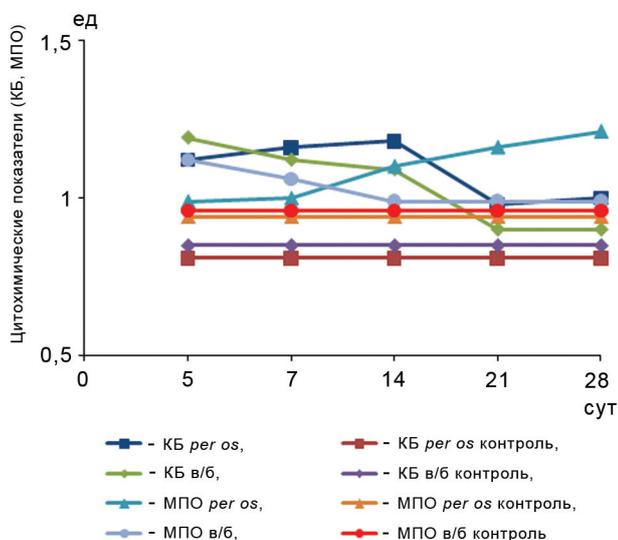


Рис. 2. Динамика цитохимических показателей крови животных при разных путях введения интактных липосом

Динамика показателей клеточных и гуморальных факторов иммунитета у экспериментальных животных при разных путях введения липосом

Показатели	Путь введения	Сроки наблюдения, сут					Фоновое значение показателей
		5-е	7-е	14-е	21-е	28-е	
Комплемент	<i>per os</i>	298,0±22	175,0±15	246,0±25	225,0±23	220,0±22	175,0±15
	в/б	240,0±21	182,0±12	200,0±5	200,0,14	198,0±11	182,0±12
CD-3+	<i>per os</i>	38,0±2,6	38,0±1,6	47,0±,2	46,4±3,9	38,0±3,8	38,0±1,6
	в/б	42,0±2,4	45,0±3	50,0±4	47,0±2,6	40,0±1,2	39,0 ±1,6
CD-4+	<i>per os</i>	32,0±1,2	26,0±1,4	22,4±1,1	24,0±1,8	22,0±1,9	22,0±1,2
	в/б	35,0±1,4	34,0±1,2	28,0±1,4	26,0±1,1	24,0±1,2	23,0±1,4
CD-8α+	<i>per os</i>	25,0±1,5	19,0±1,2	19,6±1,2	19,4±2	19,8±1,1	20,0±1,3
	в/б	23,5±1,2	22,3±1,4	21,5±1,2	20,0±1,2	20,1±0,8	20,0±0,4
CD-19+	<i>per os</i>	14,0±0,4	15,0±0,8	18,1±0,6	18,02±0,8	18,2±0,84	18,0±0,58
	в/б	11,0±0,8	22,0±0,6	20,0±0,4	20,0±0,6	20,0±0,4	19,0±0,6

эксперимента количество CD8α+ клеток значимо не отличалось от данных контрольных групп (таблица). Однако во всех опытных группах введение липидных везикул не сопровождалось достоверным увеличением количества клеток, экспрессирующих CD-8α антиген, по сравнению с контрольными величинами ($P > 0,05$).

Из данных таблицы следует, что при пероральном и внутрибрюшинном введении липосом на 5-е сутки наблюдения отмечали достоверное снижение в крови экспериментальных животных количества CD19+ клеток до (14,0±0,4) % и (11,0±0,8) % по сравнению с результатами, полученными от контрольных групп животных ($P < 0,05$). На 14–28-е сутки наблюдений при пероральном введении препарата уровень исследуемых величин находился в пределах контрольных показателей, при внутрибрюшинном поступлении липосом максимальное количество CD19+ клеток регистрировалось на 7-е сутки опыта – (22,0±0,6) %, в последующие сроки эксперимента полученные результаты недостоверно превышали показатели в контрольной группе. Начиная с 14-х суток, во всех опытных группах цифровые значения CD19+ клеток статистически недостоверно превышали данные контроля ($P > 0,05$).

Таким образом, независимо от способа введения (пероральное и внутрибрюшинное) экспериментальным животным фосфолипидных липосом, они оказывали стимулирующие действие на иммунокомпетентные клетки, регистрируемое до 28-х суток (срок наблюдения). В связи с этим можно предположить, что к этому моменту ферментные системы нейтрофилов оставались в активном состоянии. При этом статистически достоверно увеличивался уровень фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови белых мышей в спонтанном и индуцированном состояниях с одновременным повышением активности микробицидных систем (КБ и МПО) нейтрофилов крови животных, непосредственно участвующих в стадии киллинга фагоцитирующих объектов, что указывает на присутствие иммуномодулирующего эффекта липосом.

В ходе проведенных исследований также показано, что липидные везикулы при однократном пероральном и внутрибрюшинном введении повышали в крови экспериментальных животных уровень некоторых клеточных (CD3+ и CD4+) и гуморальных (комплемент) факторов иммунитета на длительный срок (28 сут), однако не оказывали заметного влияния на количественный уровень CD8α+ и CD19+ клеток. При внутрибрюшинном введении липосом изменение исследуемых в эксперименте показателей происходило в более ранние сроки, по сравнению с пероральным их поступлением, и носило более выраженный характер.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамов К.С., Скидан И.Н., Гуляев А.Е., Северин С.Е., Гальперина С.Э. Некоторые аспекты направленного транспорта лекарств в организме с помощью полимерных наночастиц. *Клин. исследования лекарственных средств в России*. 2001; 2:18–21.
2. Борздов А.А., Логвиненко О.В., Борздова И.Ю., Ефременко В.И. Оценка иммуногенности интактных липосом по показателям гуморального и клеточного иммунитета. *Мед. вестник Сев. Кавказа*. 2008; 3(11):6–11.
3. Ефременко В.И. Липосомы (получение, свойства, аспекты). Ставрополь; 1999. 263 с.
4. Ефременко Д.В., Борздов А.А., Борздова И.Ю., Кочарян А.С. Влияние липосом – потенциальных транспортеров лекарственных препаратов на морфологические и иммунологические показатели у экспериментальных животных. *Вестн. Рос. воен.-мед. акад. СПб*; 2008; 2(22) (Приложение):154–5.
5. Исмаилова Г.К., Жилченко Е.Б., Ефременко Д.В., Головченко Т.В., Малецкая О.В., Одинец А.В. и др. Эффективность применения липосомальных форм антибиотиков при лечении некоторых инфекционных заболеваний в эксперименте. *Вестн. Волгоград. гос. мед. ун-та. Волгоград*; 2007; 1:64–7.
6. Кузякова Л.М., Ефременко В.И. Медикаментозное преодоление анатомических и клеточных барьеров с помощью липосом. Ставрополь; 2000. 169 с.
7. Лилли Р. Патологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир; 1969. 645 с.
8. Малецкая О.В. Научно-экспериментальное обоснование путей повышения эффективности этиотропной терапии бруцеллеза [автореф. дис. ... д-ра мед. наук]. Ростов-н/Д; 2004.
9. Мисетова Е.Н. Метаболические изменения в крови при различных способах введения липосом [автореф. дис. ... канд. мед. наук]. Ростов-н/Д; 2003.
10. Мисетова Е.Н., Ефременко В.И., Таран Т.В., Жилченко Е.Б. Влияние липосом на функциональную активность полиморфноядерных лейкоцитов. В кн.: *Матер. VIII съезда Всерос. науч.-практ. об-ва эпидемиол., микробиол. и паразитол.* М.; 2002. Т. 2. С. 205–6.
11. Оверченко В.В. Лечение сибирской язвы у экспериментальных животных свободными и липосомальными формами антибиотиков и иммуномодуляторов [автореф. дис. ... канд. мед.

наук]. Ростов-н/Д; 2002.

12. *Одинец А.В.* Влияние липосомальных форм антибиотиков на патогенные свойства *Treponema pallidum*, паразитирующей в организме экспериментальных животных [автореф. дис. ... канд. мед. наук]. Ставрополь; 2008.

13. *Ойвин И.А.* Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований. Патол. физиология. 1960; 4:76–85.

14. *Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Уткин Д.В.* Правовые и теоретические предпосылки применения нанотехнологии и наноматериалов в диагностике, профилактике и лечении особо опасных инфекционных болезней. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2008; 6:93–7.

15. *Пастер Е.У., Овод В.В., Позур В.К.* Иммунология (практикум). Киев: Высшая школа; 1989. 302 с.

16. *Пигаревский В.Е., Мазинг Ю.А.* К методике применения лизосомально-катионного теста в лабораторной диагностической практике. Лаб. дело. 1981; 10:7–11.

17. *Ракитина Е.Л.* Изучение факторов естественной резистентности у детей и взрослых при различной патологии. В кн.: Здоровье: соц. и мед.-биол. аспекты исслед. Ставрополь; 2005. С. 86–90.

18. *Таран Т.В.* Биотехнология получения лекарственных и иммуногенных липосомальных композиций, используемых в лечении экспериментальных особо опасных инфекций и получения сырья для производства медицинских иммунобиологических препаратов [автореф. дис. ... д-ра мед. наук]. Ставрополь; 2004.

19. *Яришин А.А.* Межклеточная кооперация при иммунном ответе. Выбор клеткой ответа. Иммунология. 1999; 1:17–26.

20. *Abra R.M., Bankert R.B., Chen F. et al.* Naocarriers with gentamicin to treat intracellular pathogens. J. Liposome Res. 2002; 12:1–3.

21. *Asai T., Shimizu K., Kondo M. et al.* Anti-neovascular therapy by liposomal DPP-CNDAC targeted to angiogenic vessels. FEBS Lett. 2002; 520:167–70.

Об авторах:

Борздов А.А., Ефременко В.И., Борздова И.Ю., Логвиненко О.В., Бондаренко А.И. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru

A.A.Borzdov, V.I.Efremenko, I.Yu.Borzdova, O.V.Logvinenko, A.I.Bondarenko

Analysis of Some Immunological Blood Indices of Experimental Animals when Administering Them Intact Liposomes in Different Ways

Stavropol Anti-Plague Research Institute

State of immunity (cellular and humoral, natural resistance factors) was evaluated, functional and enzymatic activity of blood neutrophils was studied in experimental animals under administration of intact liposomes in different ways (*per os* and *intra peritoneum*). The liposomes were formed out of the lipids isolated from porcine brains. The liposomes were shown to produce prolonged stimulating effect upon immunocompetent cells at any way of administration, this effect being more pronounced when preparations were injected *intra peritoneum*.

Key words: liposomes, natural immunity, phagocytosis, lymphocytes.

Authors:

Borzdov A.A., Efremenko V.I., Borzdova I.Yu., Logvinenko O.V., Bondarenko A.I. Stavropol Anti-Plague Research Institute. 355035, Stavropol, Sovetskaya St., 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru

Поступила 18.05.09.

Л.М.Куклева, Г.А.Ерошенко

МЕЖКЛЕТОЧНАЯ КОММУНИКАЦИЯ QUORUM SENSING
У ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ РОДА YERSINIA

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

В обзоре рассмотрены ключевые элементы системы *quorum sensing* у грамотрицательных бактерий, а также суммированы имеющиеся в литературе данные об особенностях функционирования системы межклеточной коммуникации у трех патогенных иерсиний – *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*.

Ключевые слова: патогенные иерсинии, система межклеточной коммуникации, сигнальные молекулы, воздействие *quorum sensing* на жизнедеятельность и вирулентные свойства.

В последние годы накоплены многочисленные данные, свидетельствующие о способности бактерий осуществлять координированную деятельность, наличие которой раньше считалось прерогативой многоклеточных организмов [19]. Взаимодействие отдельных клеток в бактериальной популяции необходимо для ее выживания в меняющихся экологических условиях, а также для установления симбиотических или паразитических взаимоотношений с многоклеточными организмами – животными и растениями [45].

Координированная деятельность клеток и постоянный обмен информацией между бактериями в популяции осуществляется с помощью специализированных химических молекул – аутоиндукторов, названных так из-за способности стимулировать свой собственный синтез [12]. Сигнальные молекулы – аутоиндукторы свободно диффундируют через клеточные мембраны и обеспечивают условия, при которых клетка приобретает способность реагировать на любое изменение внутриклеточной концентрации этих веществ и включать или выключать те или иные группы генов. В целом это явление получило название *quorum sensing*, поскольку оно отражает способность бактерий контролировать экспрессию генов и синхронизировать поведение клеток при достижении определенного размера популяции (достижение «*quorum*») [12]. Система *quorum sensing* регулирует целый ряд активностей у различных бактерий, в том числе образование биопленок, биолюминесценцию, перенос плазмид, синтез антибиотиков, споруляцию, экспрессию генов вирулентности [1, 2, 7].

К настоящему времени способность к межклеточной кооперации обнаружена более чем у 50 различных видов микроорганизмов, а количество генов, контролируемых системой *quorum sensing*, у различных бактериальных видов составляет от 5 до 25 % от общего числа генов [17]. Система *quorum sensing* хорошо изучена у бактерий родов *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* и других. В то же время сведения о функционировании этих систем у патогенных иерсиний весьма немногочисленны и противоречивы. В связи с этим целью настоящего обзора явилось рассмотрение ключевых элементов системы *quorum*

sensing у грамотрицательных бактерий и обобщение данных литературы об особенностях функционирования системы межклеточной коммуникации у трех патогенных иерсиний – *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*.

Основными элементами системы *quorum sensing* грамотрицательных бактерий являются: аутоиндукторы; ферменты, ответственные за синтез аутоиндукторов (белки семейства LuxI), и регуляторы транскрипции (белки семейства LuxR), активность которых модулируется самой молекулой аутоиндуктора (рис. 1) [14].

Аутоиндукторы грамотрицательных бактерий. У грамотрицательных бактерий наиболее распространенными аутоиндукторами являются низкомолекулярные химические вещества, относящиеся к классу ацильных производных лактона L-гомосерина (АГЛ), иногда обозначаемых как АИ-1 (аутоиндуктор-1). Эти сигнальные молекулы содержат в своем составе консервативное пятичленное гомосеринлактоновое кольцо и присоединенную к нему через амидную связь вариабельную ацильную боковую цепь (рис. 2) [30].

Молекулы АГЛ, синтезируемые различными бактериальными видами, варьируют по длине цепи и наличию или отсутствию различных радикалов при третьем атоме углерода в боковой цепи. Такие струк-

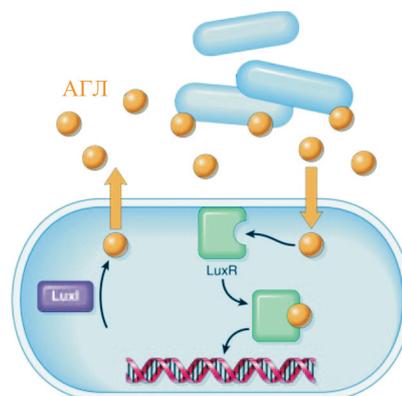


Рис.1. Схематическое представление системы *quorum sensing* у грамотрицательных бактерий:

АГЛ – ацилгомосеринлактон, *LuxI* – фермент ацилгомосерин-синтаза, *LuxR* – регулятор транскрипции [14]

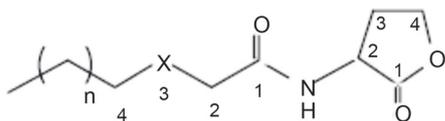


Рис. 2. Общая структура молекулы ацилгомосеринлактона:
X – возможные замены (H, OH или O) при третьем атоме углерода в боковой цепи; n – количество атомов углерода в боковой цепи [30]

турные различия молекул АГЛ обеспечивают узнавание бактериями собственных сигнальных молекул и их дифференциацию от чужеродных АГЛ [25].

Показано, что бактерии синтезируют как короткоцепочечные АГЛ (4–8 атомов углерода в ацильной группе), свободно диффундирующие через клеточную мембрану, так и длинноцепочечные АГЛ (10–18 углеродных атомов), которые встраиваются в мембрану клетки [13, 31]. Патогенные бактерии, способные к существованию в нескольких экологических нишах, продуцируют различные АГЛ, отличающиеся по своей структуре [46].

Помимо участия в функционировании системы *quorum sensing*, АГЛ могут непосредственно влиять и на поведение клеток эукариотических организмов, в частности, регулируя образование цитокинов, являющихся модуляторами иммунного ответа [32].

АГЛ-синтазы семейства LuxI. Основным классом ферментов, ответственных за синтез АГЛ у грамотрицательных бактерий, являются белки, принадлежащие к семейству LuxI [23]. Система *quorum sensing* впервые обнаружена у морских бактерий *Vibrio fischeri*, у которых она определяет интенсивность биолюминесценции клеток. По названию ключевых элементов *lux*-регулона – *luxI* и *luxR* в настоящее время все подобные системы относят к типу «*luxI-luxR*» [13].

Для синтеза сигнальных молекул АГЛ-синтазы используют S-аденозинметионин и продукты липидного метаболизма [30]. Отличительной особенностью белков этого семейства (описано свыше 100 белков) является наличие в их молекуле одинаковой последовательности из десяти аминокислотных остатков в аминотерминальной части белка [14]. Вариабельность последовательности других участков молекулы определяет специфичность действия АГЛ-синтаз у различных микроорганизмов [44].

Регуляторы транскрипции генов-мишеней *quorum sensing*. Регуляция экспрессии различных бактериальных генов системой *quorum sensing* осуществляется через белки семейства LuxR, которые активируются при связывании с молекулой аутоиндуктора. Белки типа LuxR содержат два функциональных домена. Аминотерминальный (N-терминальный) домен обеспечивает связывание с молекулой АГЛ, а карбокситерминальный (C-терминальный) домен, который составляет две трети длины всей полипептидной цепи, содержит участок связывания с ДНК (рис. 3) [28].

Связывание АГЛ приводит к конформационным изменениям молекулы LuxR и димеризации белка,

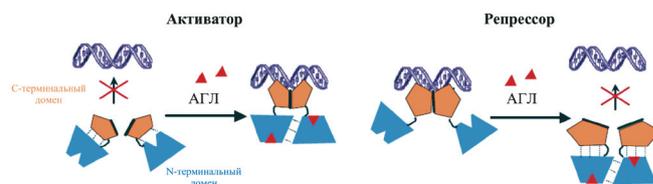


Рис. 3. Схема, представляющая структурные модификации, возникающие в результате связывания АГЛ с активаторными или репрессорными белками семейства LuxR [24]

что является необходимым для прикрепления регулятора к промоторному участку гена-мишени [42, 35]. Белки семейства LuxR взаимодействуют с двухцепочечной ДНК в сайте, получившем название «*lux box*», и имеющем сходное строение у разных видов бактерий. Он представляет собой палиндромные последовательности ДНК размером 20 п.н., расположенные примерно на расстоянии 40 п.н. от начала транскрипции гена-мишени [11].

Большинство белков семейства LuxR являются активаторами. В этом случае N-терминальный домен в отсутствие АГЛ маскирует C-терминальный ДНК, связывающий домен регулятора. Присоединение молекулы АГЛ к активатору индуцирует конформационные изменения, приводящие к активированию ДНК-связывающего домена, прикреплению РНК-полимеразы к промотору и транскрипции генов-мишеней (рис. 3) [33, 35, 42].

Однако некоторые белки типа LuxR являются репрессорами, у которых в отсутствие АГЛ C-терминальный домен в комплексе с ДНК выполняет репрессорные функции. Присоединение молекулы АГЛ к N-терминальному домену приводит к димеризации молекулы и диссоциации комплекса репрессор-ДНК (рис. 3) [24].

Гены, кодирующие гомологи LuxR и LuxI, могут быть расположены на хромосоме или мобильных генетических элементах (плазмиды и транспозоны) и часто локализованы вблизи друг друга [17].

Кроме специфических для грамотрицательных бактерий сигнальных молекул класса АГЛ, у многих из них выявлен неспецифический аутоиндуктор – АИ-2, действующий как универсальный сигнал *quorum sensing*, обеспечивающий межвидовые взаимодействия бактерий. Он найден как у грамположительных, так и грамотрицательных бактерий [40]. По химическому строению АИ-2 является производным фуранозидов, его продукция контролируется геном *luxS*. Распознавание АИ-2 осуществляет двухкомпонентная система LuxP/LuxQ, которая запускает каскад фосфорилирования, что приводит к изменению транскрипции генов-мишеней [47]. Функция системы *quorum sensing*, сигнальной молекулой которых является АИ-2, для многих бактерий остается невыясненной [7].

В качестве сигнальных молекул могут выступать 4-хинолоны, жирные кислоты и их эфиры, а также ряд других соединений, каждое из которых является специфичным для отдельных видов бактерий [17].

У большинства патогенных бактерий система *quorum sensing* участвует в модулировании экспрессии генов, необходимых для существования бактерий в организме хозяина [46]. Координированная экспрессия факторов вирулентности всеми клетками бактериальной популяции позволяет возбудителю выживать в организме хозяина и успешно преодолевать систему защиты макроорганизма [37].

Наличие системы *quorum sensing* выявлено и у патогенных видов рода *Yersinia* – *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis*. В их геноме обнаружены гены, кодирующие белки-гомологи LuxI и LuxR, а в клеточных супернатантах этих возбудителей выявлены различные АГЛ [3, 38, 41].

У всех трех патогенных видов иерсиний система *quorum sensing* изучена недостаточно. Тем не менее, выявлено наличие одной АГЛ-зависимой системы у *Y. enterocolitica* и по две системы у *Y. pseudotuberculosis* и *Y. pestis* [5].

Система *quorum sensing* у возбудителя кишечного иерсиниоза. Первым видом иерсиний, у которого обнаружена система *quorum sensing*, является возбудитель кишечного иерсиниоза *Y. enterocolitica*. При выяснении функциональной роли системы *quorum sensing* у возбудителя кишечного иерсиниоза было установлено ее влияние на способность клеток *Y. enterocolitica* к активному движению, которое необходимо на начальных этапах развития энтеропатогенной инфекции для обеспечения контакта с клетками кишечного эпителия и проникновения в них [49]. Данные об участии системы *quorum sensing* в патогенезе кишечного иерсиниоза подтверждены фактом выявления аутоиндукторов из группы гомосеринлактонов в тканях мышей, зараженных вирулентным штаммом *Y. enterocolitica* 0:8 серогруппы, что свидетельствует о функционировании системы во время развития инфекционного процесса, вызываемого этим микробом [18].

В клетках *Y. enterocolitica* выявлено два типа аутоиндукторов из группы гомосеринлактонов, которые идентифицированы как 3-окси-С6-ГСЛ и С6-ГСЛ, причем их соотношение в клетке составляет 1:1 [41]. Установлено наличие двух генов, участвующих в реализации межклеточной коммуникации [38, 41]. Продукт одного из этих генов, обозначенного как *yenI*, обладает гомологией с генами белков семейства LuxI и является АГЛ-синтазой, тогда как второй ген – *yenR* детерминирует синтез регуляторного белка, принадлежащего к семейству LuxR. Последующий анализ нуклеотидной последовательности генома штамма *Y. enterocolitica* 8081, представленного в базе данных NCBI GenBank, показал, что YenI является единственным гомологом LuxI, что подтверждает предположение о наличии у возбудителя кишечного иерсиниоза только одной системы *quorum sensing* [5]. Инактивация гена *yenI* приводит к прекращению синтеза АГЛ клетками *Y. enterocolitica*. Дальнейшими исследованиями показано, что YenI, помимо двух короткоцепочечных молекул, обеспечивает синтез

и длинноцепочечных молекул АГЛ, в которых число атомов углерода в боковых цепях составляет 10, 12 и 14 [5]. Длинноцепочечные АГЛ обладают сильной воспалительной и иммуномодулирующей активностью, а также способны непосредственно воздействовать на стенки кровеносных сосудов [36]. В культуральных супернатантах клеток *Y. enterocolitica* обнаружен и неспецифический аутоиндуктор АИ-2, а в геноме – наличие гена *luxS*, детерминирующего синтез этой молекулы [26].

По данным S. Atkinson *et al.* [4], мутация по гену *yenI* (АГЛ-синтаза) не влияет на экспрессию генов *yenR* (регулятор транскрипции), *flhDC* (главный регулятор жгутикового оперона) и *fliA* (регулятор экспрессии белков, участвующих в формировании жгутиков и хемосенсорной системы). Однако в клетках, дефектных по гену АГЛ-синтазы *yenI*, отсутствует основной структурный белок жгутиков – флагеллин FleB, что свидетельствует о влиянии системы *quorum sensing* на синтез этого компонента жгутикового аппарата [2]. Установлено, что регуляция гена *fleB* системой *quorum sensing* осуществляется как на трансляционном, так и на посттрансляционном уровне. Высказано предположение, что регуляция на уровне гена *fleB* через АГЛ-зависимую систему представляет собой эффективный механизм контроля секреции белков жгутикового аппарата, обеспечивающих колонизацию бактериями тканей организма хозяина [4].

Для целого ряда бактерий установлена связь между образованием жгутиков и способностью к формированию биопленки, поскольку штаммы, обладающие сниженной подвижностью, дефектны по образованию биопленки [16, 22]. Однако у *Y. enterocolitica* не выявлено зависимости формирования биопленки от функционирования генов *luxS* и *yenI*, определяющих синтез аутоиндукторов АГЛ и АИ-2 [20]. Возможно, что у *Y. enterocolitica* образование биопленки не находится под контролем системы *quorum sensing*.

Системы *quorum sensing* *Yersinia pseudotuberculosis*. При изучении системы *quorum sensing* у другого патогенного вида рода *Yersinia* – *Y. pseudotuberculosis* – было выявлено наличие, по меньшей мере, 24 различных молекул аутоиндукторов (АГЛ) с боковыми цепями, содержащими от 4 до 15 атомов углерода [29]. Однако подавляющее большинство этих соединений присутствуют в клетке в количестве менее 1 % от общего числа молекул АГЛ и, следовательно, они не могут играть значительную роль в осуществлении межклеточной коммуникации у возбудителя псевдотуберкулеза (рис. 4) [29]. Наибольшее биологическое значение из обнаруженных соединений имеют молекулы АГЛ с 6 и 8 атомами углерода в боковых цепях (рис. 4) [29], что подтверждается их высоким содержанием в бактериальной клетке.

Две из обнаруженных сигнальных молекулы идентичны аутоиндукторам, выявленным у *Y. enterocolitica* (3-окси-С6-ГСЛ и С6-ГСЛ), а молекула 3-охо-С7-АГЛ выявлена только у *Y. pseudotuberculosis*.

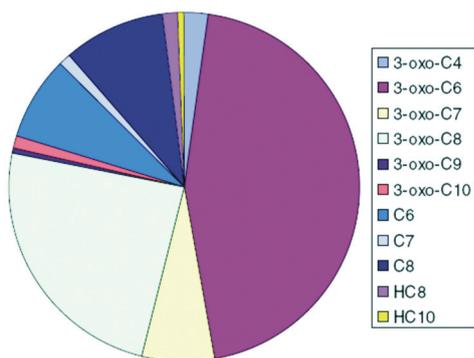


Рис. 4. Схема, иллюстрирующая соотношение количества различных АГЛ, синтезируемых возбудителем псевдотуберкулеза [29]

sis и отсутствует у других бактерий [5]. Высказано предположение, что способность к синтезу широкого спектра АГЛ с различной длиной ацильной боковой цепи обеспечивает возбудителю псевдотуберкулеза большие преимущества при адаптации к изменяющимся условиям внешней среды [39].

При сравнении профилей АГЛ при различных температурах культивирования *Y. pseudotuberculosis* было установлено, что наибольший уровень продукции этих молекул наблюдается при температуре 22 °С. Он существенно ниже при 28 °С и почти отсутствует при 37 °С. Различия в синтезе АГЛ у возбудителя псевдотуберкулеза не зависят ни от активности АГЛ-синтаз, ни от доступности субстратов для их действия, а определяются чувствительностью лактонового кольца молекулы АГЛ к изменению кислотности окружающей среды [48].

В функционировании системы *quorum sensing* у возбудителя псевдотуберкулеза, как и у других грамотрицательных бактерий, важную роль играют белки семейства LuxR/L. Однако в отличие от *Y. enterocolitica*, возбудитель псевдотуберкулеза содержит две пары LuxR/L гомологов, обозначенных как YpsR/L и YtbR/L [3].

Показано, что обе синтазы – YpsI и YtbI принимают участие в образовании молекул аутоиндукторов, поскольку мутации в любом из генов АГЛ-синтаз – *ypsI* или *ytbI* приводят к прекращению синтеза молекул аутоиндукторов. Установлено, что экспрессия обеих систем *quorum sensing* *Y. pseudotuberculosis* (YpsR/L и YtbR/L) взаимосвязана и осуществляется по иерархическому принципу. Так, гены *ypsRI* осуществляют негативную собственную регуляцию и в то же время позитивно регулируют экспрессию генов *ytbRI*. Система *ytbRI*, в свою очередь, позитивно регулирует собственную экспрессию на уровне генов *ytbI* и *ytbR*, но не влияет ни на экспрессию гена *ypsR*, ни на *ypsI* (рис. 5) [6].

Установлено, что обе системы *quorum sensing* у возбудителя псевдотуберкулеза участвуют в проявлении ряда фенотипических признаков, в том числе способности к клеточной агрегации и подвижности, обусловленной наличием жгутиков (рис. 5) [6].

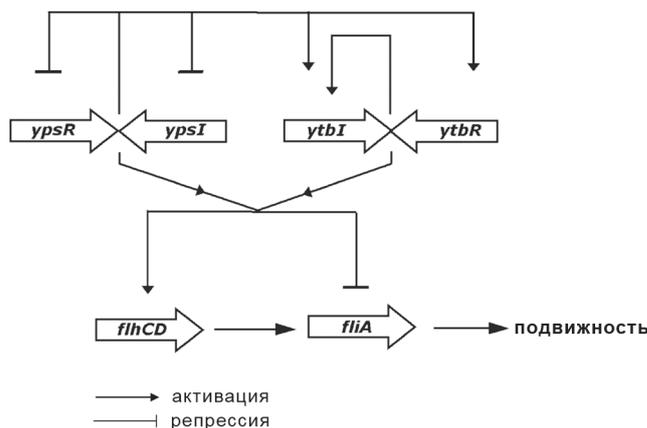


Рис. 5. Модель регуляторного каскада, связанного с *ypsRI* и *ytbRI* генами *quorum sensing* и их воздействием на подвижность *Y. pseudotuberculosis* [6]

Контроль подвижности осуществляется путем изменения экспрессии генов *flhDC* и *fliA* – главных регуляторов жгутикового оперона. АГЛ, синтезируемые при участии белка YtbI, играют двойную роль, активируя *flhDC* (в комплексе с белком YpsR), но репрессируя ген *fliA* (в комплексе с белками YtbR и YpsR). Утрата функциональной активности гена *flhDC* приводит к значительному снижению плавательной активности клеток *Y. pseudotuberculosis*. Таким образом, полученные данные указывают на функциональное взаимодействие двух систем *quorum sensing* у возбудителя псевдотуберкулеза, которое модулирует плавательную активность клеток посредством контроля главных регуляторных генов жгутикового оперона.

Изменение функции гена *flhDC* приводит к снижению не только подвижности, но и способности к образованию биопленки на различных поверхностях [43]. О наличии взаимосвязи между системой *quorum sensing* *Y. pseudotuberculosis* и способностью к образованию биопленки свидетельствует тот факт, что на биотической поверхности клетки «дикого» типа образуют биопленку через 24 часа, а двойные мутанты *ypsI/ytbI* и *ypsR/ytbR* такой способностью не обладают [5].

По-видимому, у *Y. pseudotuberculosis* образование биопленки находится под контролем двух систем *quorum sensing*, в отличие от *Y. enterocolitica*, для которого взаимосвязи между системой *quorum sensing* и образованием биопленки не обнаружено [20].

Система *quorum sensing* у возбудителя чумы. Третий патогенный представитель рода *Yersinia* – возбудитель чумы – отличается от других патогенных иерсиний тем, что он является возбудителем кровавой инфекции, которая передается через укусы инфицированной блохи и существенно отличается по эпидемическим проявлениям от болезней, вызываемых *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*. Тем не менее, возбудитель чумы, как и псевдотуберкулезный микроб, обладает двумя парами LuxR/L гомологов, кодируемых генами, получившими обозначение

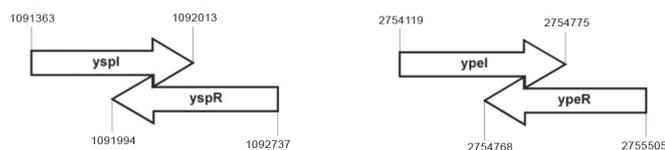


Рис. 6. Сравнительный анализ структуры оперонов *ypsl-ypsr* (*Y. pseudotuberculosis*) и *ypeI-yper* (*Y. pestis*) [38]

ypeR/I и *yepR/I*, которые на 99 % идентичны соответствующим генам *Y. pseudotuberculosis* [3, 10].

Установлено, что каждый из LuxR и LuxI гомологов, выявленных у иерсиний, обладает значительным сходством друг с другом. Генетические локусы организованы сходным образом и так, что гены гомологов LuxR и LuxI транскрибируются конвергентно и частично совпадают на участках от 8 до 20 пар нуклеотидов (рис. 6) [34, 38]. Кроме того, у возбудителя чумы, как и у других патогенных иерсиний, обнаружен ген *luxS*, детерминирующий синтез аутоиндуктора АИ-2, который на 89 % идентичен аналогичным генам, выявленным у других представителей семейства *Enterobacteriaceae* [6].

Клетки *Y. pestis*, как *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis*, синтезируют короткоцепочечные (6 и 8 атомов углерода в составе ацильной боковой цепи) и длинноцепочечные (10–14 атомов углерода) АГЛ [8, 21].

Сведения об участии системы *quorum sensing* в процессах жизнедеятельности клеток *Y. pestis* крайне незначительны. По данным S. Swift *et al.* [38], гены *ypeI* и *yper* не участвуют в экспрессии таких факторов вирулентности как V-антиген, рН6 антиген, активатор плазминогена и липополисахарид. Однако вопрос об участии системы *quorum sensing* в регуляции экспрессии факторов вирулентности возбудителя чумы остается до конца не выясненным, поскольку в 2009 г. H. Gelhaus *et al.* показали, что внесение в среду культивирования *Y. pestis* аутоиндукторов С8- и охС8-АГЛ приводит к подавлению экспрессии гена *lcrV* и снижению продукции соответствующего белка. Кроме того, выявлено еще 14 генов системы секреции III типа, транскрипция которых существенно снижается под воздействием АГЛ, в то время как 44 гена этого аппарата секреции подвержены воздействию этих сигнальных молекул в меньшей степени.

О возможном влиянии системы *quorum sensing* на факторы патогенности возбудителя чумы свидетельствует тот факт, что титры антител к фракции I, рН6 антигену, каталазе, образуемых в ответ на введение кроликам штамма, мутантного по системе *quorum sensing*, ниже, чем титры, индуцируемые штаммом «дикого» типа. Это позволило высказать предположение, что экспрессия этих белков у *Y. pestis* все же контролируется системой *quorum sensing* [9]. Кроме того, показано, что система *quorum sensing* возбудителя чумы прямо или косвенно регулирует синтез сериновой протеазы HtrA, являющейся глобальным регулятором ответа на стрессорные воздействия.

Этот фермент отсутствовал в клетках, дефектных по системе межклеточной коммуникации, что приводило к повышению чувствительности бактерий к окислительному стрессу [9, 27]. При изучении течения чумной инфекции у мышей наблюдали увеличение продолжительности жизни животных, зараженных мутантными по системе *quorum sensing* вариантами, по сравнению с родительским штаммом. Так, при заражающей дозе 10^4 КОЕ средняя продолжительность жизни мышей повысилась от 5,4 (для животных, зараженных родительским штаммом) до 6,7 дней (для мышей, инфицированных *yper* мутантом) [38].

Также установлено, что мутанты по генам *ypeI/R*, *ypsl/R* и *luxS* обладают сниженной способностью к образованию биопленки по сравнению с родительскими штаммами, что позволяет предположить участие системы *quorum sensing* в формировании биопленки у возбудителя чумы [8].

Суммируя представленные литературные данные можно сделать заключение, что плотность бактериальной популяции является важным параметром жизнедеятельности клеток, который патогенные иерсинии используют при адаптации к существованию в различных экологических условиях. Для всех трех патогенных иерсиний установлено опосредованное действие системы *quorum sensing* на их патогенные свойства. У *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* это влияние проявляется через воздействие на жгутиковый аппарат, функционирование которого необходимо для эффективного развития энтеропатогенных инфекций. У *Y. pestis* система *quorum sensing*, по-видимому, участвует в регуляции экспрессии некоторых факторов вирулентности, необходимых для инфицирования организма хозяина, а также образования биопленки (чумного блока) в желудочно-кишечном тракте насекомого-переносчика и, следовательно, для эффективной трансмиссии возбудителя. Однако воздействие системы *quorum sensing* на процессы жизнедеятельности патогенных бактерий рода *Yersinia* изучено далеко не достаточно и требует проведения дальнейших разносторонних исследований.

Работа поддержана грантами РФФИ №№ 07-04-00100, 08-04-00731.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Биопленка как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития. Генетика. 2004; 40(11):1–12.
- Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Системы коммуникаций у бактерий и их роль в патогенезе. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2006; 3:22–9.
- Atkinson S., Throup J., Stewart G., Williams P. A hierarchical quorum-sensing system in *Yersinia pseudotuberculosis* is involved in the regulation of motility and clumping. Mol. Microbiol. 1999; 33:1267–77.
- Atkinson S., Chang C., Sockett R. *et al.* Quorum sensing in *Yersinia enterocolitica* controls swimming and swarming motility. J. Bacteriol. 2006; 188:1451–61.
- Atkinson S., Sockett R., Camara M., Williams P. Quorum sensing and lifestyle of *Yersinia*. Curr. Issues Mol. Biol. 2006; 8(1):1–10.
- Atkinson S., Chang C., Patrick H. *et al.* Functional interplay between the *Yersinia pseudotuberculosis* YpsRI and YtbRI quorum

- sensing systems modulates swimming motility by controlling expression of *flhDC* and *flhA*. *Mol. Microbiol.* 2008; 69(1):137–51.
7. *Bassler B.* Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell.* 2002; 109(4):421–4.
 8. *Bobrov A., Bearden S., Fetherston J. et al.* Functional quorum sensing systems affect biofilm formation and protein expression in *Yersinia pestis*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2007; 603:178–97.
 9. *Chen Z., Li B., Zhang J. et al.* Quorum sensing affects virulence-associated proteins Fl, LcrV, KatY and pH6 etc of *Yersinia pestis* as revealed by protein microarray-based antibody profiling. *Microbes Infect.* 2006; 8(9–10):2501–8.
 10. *Deng W., Burland V., Plunkett G. et al.* Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. *J. Bacteriol.* 2002; 184:4601–11.
 11. *Egland K., Greenberg E.* Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the *luxI* promoter. *Mol. Microbiol.* 1999; 31:1197–204.
 12. *Fukua W., Winans S., Greenberg E.* Quorum sensing in bacteria: the LuxR LuxI family of cell density responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 1994; 176:269–75.
 13. *Fukua W., Winans S., Greenberg E.* Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR LuxI family of quorum sensing transcriptional regulators. *A. Rev. Microbiol.* 1996; 50:727–51.
 14. *Fukua C., Parsek M., Greenberg E.* Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.* 2001; 35:439–68.
 15. *Gelhaus H., Rozak D., Nierman W. et al.* Exogenous *Yersinia pestis* quorum sensing molecules N-octanoyl-homoserine lactone and N-(3-oxooctanoyl)-homoserine lactone regulate the LcrV virulence factor. *Microb. Pathog.* 2009; 46(5):283–7.
 16. *Girón J., Torres A., Freer E., Kaper J.* The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 2002; 44(2):361–79.
 17. *Gonzalez J., Keshavan N.* Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2006; 70:859–75.
 18. *Jacobi C., Bach A., Eberl L. et al.* Detection of N-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone in mice, infected with *Yersinia enterocolitica* serotype 0:8. *Infect. Immun.* 2003; 71:6624–6.
 19. *Kievit T., Iglewski B.* Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect. Immun.* 2000; 68(9):4839–49.
 20. *Kim T., Young B., Young G.* Effect of flagellar mutations on *Yersinia enterocolitica* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74(17):5466–74.
 21. *Kirwan J., Gould T., Schweizer H. et al.* Quorum sensing signal synthesis by *Yersinia pestis* acyl-homoserine lactone synthase YspI. *J. Bacteriol.* 2006; 188(2):784–8.
 22. *Lemon K., Higgins D., Kolter R.* Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *J. Bacteriol.* 2007; 189:4418–24.
 23. *Lerat E., Moran N.* The Evolutionary history of quorum-sensing systems in Bacteria. *Mol. Biol. Evol.* 2004; 21(5):903–13.
 24. *Lazdunski A., Ventre I., Sturgis J.* Regulatory circuits and communication in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2:581–92.
 25. *McLean R.J., Pierson L.S. 3rd, Fuqua C.* A simple screening protocol for the identification of quorum signal antagonists. *J. Microbiol. Methods.* 2004; 58:351–60.
 26. *Miller M., Bassler B.* Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 2001; 55:165–99.
 27. *Morton M., Garmory H., Perkins S. et al.* A *Salmonella enterica* serovar Typhi vaccine expressing *Yersinia pestis* F1 antigen on its surface provides protection against plague in mice. *Vaccine.* 2004; 22:2524–32.
 28. *Nasser W., Reverchon S.* New insights into the regulatory mechanisms of the LuxR family of quorum sensing regulators. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007; 387:381–90.
 29. *Ortori C., Atkinson S., Chhabra S. et al.* Comprehensive profiling of N-acylhomoserine lactones produced by *Yersinia pseudotuberculosis* using liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007; 387:497–511.
 30. *Parsek M., Val D., Hanzelka B.* Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *PNAS.* 1999; 96:4360–5.
 31. *Pearson J., Van Delden C., Iglewski B.* Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J. Bacteriol.* 1999; 181:1203–10.
 32. *Popat R., Crusz S., Diggle S.* The social behaviours of bacterial pathogens. *British Medical Bulletin.* 2008; 87:63–75.
 33. *Qin Y., Luo Z., Smyth A., et al.* Quorum-sensing signal binding results in dimerization of TraR and its release from membranes into the cytoplasm. *EMBO J.* 2000; 19(19):5212–21.
 34. *Salmund G., Bycroft B., Stewart G., Williams P.* The bacterial “enigma”: cracking the code of cell-cell communication. *Mol. Microbiol.* 1995; 16:615–24.
 35. *Schuster M., Urbanowski M., Greenberg E.* Promoter specificity in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(45):15833–9.
 36. *Smith R., Harris S., Phipps R., Iglewski B.* The *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing signal molecule, N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone contributes to virulence and induces inflammation *in vivo*. *J. Bacteriol.* 2002; 184:1132–9.
 37. *Smith R., Iglewski B.* *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr. Opin. Microbiol.* 2003; 6(1):56–60.
 38. *Swift S., Isherwood K., Atkinson S. et al.* Quorum sensing in *Aeromonas* and *Yersinia*. In: England R., Hobbs G., Bainton N., Roberts D. *Microbial signaling and communication*. Society for general microbiology symposium 57. Cambridge, 1999. P. 85–104.
 39. *Swift S., Downie J., Whitehead N. et al.* Quorum sensing as a population density dependent determinant of bacterial physiology. *Adv. Microb. Physiol.* 2001; 45:199–270.
 40. *Taga M., Bassler B.* Chemical communication among bacteria. *PNAS.* 2003; 100(Suppl. 2):14549–54.
 41. *Throup J., Camara M., Briggs G. et al.* Characterization of the *yenI/yenR* locus from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two quorum sensing signal molecules. *Mol. Microbiol.* 1995; 17:345–56.
 42. *Urbanowski M., Lostroh C., Greenberg E.* Reversible acyl-homoserine lactone binding to purified *Vibrio fischeri* LuxR protein. *J. Bacteriol.* 2004; 186(3):631–7.
 43. *Wang Y., Ding L., Hu Y. et al.* The *flhDC* gene affects motility and biofilm formation in *Yersinia pseudotuberculosis*. *Sci. China C. Life Sci.* 2007; 50(6):814–21.
 44. *Watson W., Minogue T., Val D. et al.* Structural basis and specificity of acyl homoserine lactone signal production in bacterial quorum sensing. *Mol. Cell.* 2002; 9:685–94.
 45. *Whitehead N., Barnard A., Slater H. et al.* Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2001; 25:365–404.
 46. *Williams P., Camara M., Hardman A. et al.* Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 2000; 355:667–80.
 47. *Winzer K., Hardie K., Williams P.* LuxS and autoinducer-2: their contribution to quorum sensing and metabolism in bacteria. *Adv. Appl. Microbiol.* 2003; 53:291–396.
 48. *Yates E., Philipp B., Buckley C. et al.* N-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis on pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 2002; 70:5635–46.
 49. *Young G., Badger J., Miller V.* Motility is required to initiate host cell invasion by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 2000; 68:4323–6.

Об авторах:

Куклева Л.М., Ерошенко Г.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

L.M.Koukleva, G.A.Eroshenko

**Intercellular Communication Quorum Sensing
in Pathogenic Bacteria of the Genus *Yersinia***

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov.

The present review considered key elements of *quorum sensing* system of gram-negative bacteria and summarized the existing literature data on functioning features of intercellular communication system in three pathogenic *Yersinia* – *Yersinia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* and *Y. pestis*.

Key words: pathogenic *Yersinia*, intercellular communication system, signal molecules, *quorum sensing* effect upon housekeeping and virulent properties.

Authors:

Koukleva L.M., Eroshenko G.A. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 06.07.09.

Л.В.Домотенко, Я.В.Подкопаев, М.В.Храмов, И.А.Дятлов

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЧУМЫ

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

Проведен анализ отечественной и зарубежной литературы. Рассмотрены питательные среды для культивирования, выделения и дифференциации чумного микроба. Освещено современное состояние производства питательных сред.

Ключевые слова: чумной микроб, питательные среды.

Со времени публикации последней монографии по чуме [5], в которой приведены рекомендации по выбору питательных сред для диагностики заболевания, прошло уже более 10 лет. Еще старше монография Н.И.Николаева [14], содержащая подробное описание питательных сред для диагностики, выделения и дифференциации возбудителя чумы. Ряд сред, приведенных в книге, до сих пор находятся на вооружении исследователей. Но за это время появились и новые среды, и новые рекомендации по использованию уже известных.

Для диагностики чумы используют как жидкие, так и агаризованные питательные среды. Основная их роль – поддерживать рост возбудителя при выделении его из патологического материала или из объектов окружающей среды. Питательные среды также необходимы для дифференциации патогена и для накопления его биомассы при проведении дальнейших молекулярно-биологических или генетических исследований. Питательные среды используют в производстве вакцин и при изучении биохимических свойств микроба.

Основное требование, предъявляемое к питательным средам, – это способность обеспечивать проявление типичных культурально-морфологических свойств возбудителя заболевания.

Возбудитель чумы – *Yersinia pestis* – короткая, прямая, с закругленными концами палочка длиной 1–3 мкм и шириной 0,3–0,7 мкм. Отличается большим полиморфизмом. Спор не образует. В организме животных и людей и на сыровоточном или кровяном агаре при температуре 37 °С обычно образует капсулу. Грамотрицательна. Кислотоустойчивостью не обладает. Не имеет жгутиков и не обладает активной подвижностью [5].

В связи с относительной неприхотливостью растет на синтетических средах с аминокислотами (в качестве источников азота) и ферментируемыми углеводами. В витаминах и азотистых основаниях, как правило, не нуждается. Однако аминокислотные потребности у штаммов из разных природных очагов сильно варьируют. Кроме того, они могут меняться в зависимости от температуры культивирования.

Y. pestis – факультативный анаэроб. Для роста из небольших посевных доз на плотных средах нуждается в понижении окислительно-восстановительного потенциала, достигаемом, в частности, за счет добавления сульфита натрия, крови или гемина. На жидких средах хорошо развивается при аэрации.

Оптimum температуры роста – 26–28 °С. Может расти на искусственных средах при температуре от -2 °С до +45 °С, в диапазоне рН от 5,0 до 9,6. Optimum рН – 7,2–7,6; вместе с тем при рН 6,6–8,0 наблюдается достаточно хороший рост микроба [47].

На поверхности агара сначала образует прозрачные колонии в виде «битого стекла» и «кружевных платочков», а затем вырастает в виде блестящих, серовато-белых, полупрозрачных колоний с выпуклым мелкозернистым центром и плоским, кружевным, «фестончатым» краем (R-форма). В англоязычной литературе колонии описывают как «кованый металл или медь» («hammered cooper»), которые при старении приобретают вид «глазуньи» («fried egg») [40].

При температуре 26–28 °С колонии суховаты, а выросшие при температуре 37 °С, имеют блестящую маслянистую консистенцию. По мере старения центр их становится более грубым, менее прозрачным и приобретает коричневатый оттенок.

На кровяном агаре чумной микроб растет в виде полупрозрачных серовато-белых колоний, обычно очень мелких, трудно различимых через 24 ч. После 48 ч инкубации размер колоний увеличивается до 1–2 мм. Они приобретают цвет от серовато-белого до желтого и теряют прозрачность. Вокруг колоний иногда наблюдаются зоны гемолиза.

Через 48 ч инкубации при температуре 37 °С колонии на кровяном агаре не имеют хорошо выраженной кружевной периферии.

В бульоне обычно образует хлопьевидный или порошковидный, легко распадающийся при встряхивании осадок, жидкость над ним остается прозрачной. Часто образует нежную пленку, в старых культурах от нее вглубь среды могут отходить нити – «стактиты».

Как видно из приведенных выше фактов, чумной микроб не предъявляет особых требований ни к

условиям культивирования, ни к питательным средам.

Питательные среды для культивирования чумного микроба. Эти среды, не содержащие селективных добавок, пригодны для наращивания биомассы штаммов и выделения *Y. pestis* из клинического материала, который обычно бывает стерильным (кровь, лимфатическая жидкость, бубонное содержимое, спинно-мозговая жидкость), или из биопробных животных, из которых ожидается рост чистой культуры.

В литературе приведены прописи большого количества питательных сред данного назначения, основными компонентами которых являются белковая основа или иной источник аминокислот, сахара, стимуляторы роста. Выбор сред зависит от задач исследования и определяется национальными регламентирующими документами и документами ВОЗ.

Стандартной средой, рекомендованной ВОЗ и Центром по контролю за заболеваемостью (CDC), является кровяной агар, приготовленный из овечьей крови (Sheep blood agar, SBA) [29, 30]. В случае отсутствия овечьей крови средами выбора могут служить агар на основе сердечно-мозговой вытяжки (brain heart infusion, BHI), питательный агар (nutrient agar) и триптиказо-соевый агар (trypticase soy agar). Чумной микроб растет на них медленнее, чем на SBA, и формирует колонии меньшего размера.

В нашей стране согласно МУ 3.1.1098-02 по организации и проведению эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории РФ для диагностических целей рекомендовано использовать слабощелочной (рН 7,0–7,2) питательный агар с содержанием аминного азота 60–120 мг% [15]. Более конкретный выбор питательной среды осуществляется в соответствии с личными предпочтениями исследователя и/или лабораторными традициями. При этом обязательно должен быть проведен контроль каждой серии среды на чувствительность к росту чумного микроба согласно действующим нормативно-методическим документам [10].

Традиционными средами для диагностики чумного микроба, ставшими уже классикой, являются среды на основе перевара Хоттингера [4, 13, 18] – ферментативного гидролизата мяса, полученного с помощью поджелудочной железы. При приготовлении сред используют перевары с достаточно высокой степенью расщепления белка – 55–65 %, разведенные до указанной выше концентрации аминного азота. Для повышения ростовых характеристик в среды дополнительно вводят гемолизированную кровь в концентрации до 5–6 %.

Нестандартность мясных переваров, их дороговизна побудили многих исследователей заняться поиском заменителей белка мяса для получения из них гидролизатов – белковой основы питательных сред.

Белковая основа. В качестве белковой основы питательных сред для чумного микроба предложены гидролизаты разнообразных субстратов. Основным

критерием при выборе источника белка были доступность и стандартность сырья. Первым в этом списке стоит казеин как наиболее удовлетворяющее этим требованиям белковое сырье. На основе казеина предложены различные рецептуры получения кислотных и ферментативных гидролизатов. Для роста чумного микроба, не обладающего выраженной протеолитической активностью, наиболее пригодными являются гидролизаты с достаточно высокой степенью расщепления. В работах ряда авторов [12, 46, 48] и др. описано культивирование *Y. pestis* в средах, содержащих ферментативные гидролизаты казеина. К. Higuchi и С.Е. Carlin [33] показали возможность использования сернокислотного гидролизата казеина средней степени расщепления в концентрации 2,5 % в составе питательной среды, что значительно увеличивало выход биомассы и обеспечивало рост *Y. pestis* при температуре 37 °С.

Гидролизаты казеина входят в состав многих коммерческих сред, используемых в диагностике чумы. Все среды, рекомендованные ВОЗ, содержат в своем составе те или иные гидролизаты казеина.

Культуры чумного микроба, выращенные на казеиновых средах как агаровых, так и бульонных, имеют типичную морфологию, сохраняют агглютинабельность, вирулентность, иммуногенность, биохимические свойства. Снижение вирулентности на казеиновых средах и средах Хоттингера происходит одинаково. Высокая стабильность казеиновых сред позволила рекомендовать их для длительного хранения культур чумного микроба, а также использовать в качестве диагностических.

Перспективными для приготовления питательных сред оказались гидролизаты рыбы и отходов рыбной промышленности [2, 11, 21]. В настоящее время крупные производства питательных сред во ФГУН ГНЦПМБ (Оболенск) и НПО «Питательные среды» (Махачкала) базируются на гидролизатах рыбной муки и кильки каспийской, соответственно.

Доступным, стандартным и дешевым сырьем для получения белковых гидролизатов являются дрожжи. Организованное в 50–60-х годах в нашей стране производство кормовых дрожжей на углеводородах нефти (БВК) решало вопрос о стандартном и недорогом белке. В то время были разработаны технологии промышленного изготовления гидролизатов из кормовых дрожжей и питательных сред на их основе. Дрожжевой экстракт стал широко использоваться как стимулятор роста микроорганизмов. Показано его стимулирующее влияние в составе питательных сред, основой которых является пептон «Д». Предложено добавлять дрожжевые экстракты даже к средам Хоттингера для восстановления качества питательных сред, хранившихся более 15 сут [6].

В результате изменения внутренней политики в нашей стране в конце прошлого века были закрыты заводы по производству БВК, и промышленность лишилась крупнотоннажного источника полноценного белка.

Пекарные и пивные дрожжи, являющиеся также источником полноценного белка, используются только для производства экстрактов. В настоящее время экстракт пекарных дрожжей является одним из основных стимуляторов роста для широкого круга микроорганизмов и добавляется в состав многих питательных сред.

Другие виды непищевого источников белка: соя, подсолнечный и кукурузный шроты, отходы мясной промышленности (кровь животных, кровяные сгустки), вакцинно-сывороточного производства (куриные эмбрионы, эритроцитарная масса), плаценты, крове-заменители с истекшим сроком годности и др. были широко изучены в нашей стране. Разработанные гидролизаты на их основе были предложены в рецептуры питательных сред для чумного микроба [23]. Но эти среды не нашли широкого применения.

Стимуляторы роста. Культура чумного микроба активно реагирует на наличие в среде стимуляторов роста. В качестве таковых часто добавляют гемолизированную кровь, сульфит натрия, стимулятор из сарцин (стимулятор Карпузиди), сернокислое закисное железо, перевар Филдса, манифестатор, молибденовокислый аммоний, гидролизат микробной массы *Y. pestis* EV [3, 8, 16, 17, 19, 20]. В очагах, где циркулируют тиаминзависимые штаммы, в качестве стимулятора роста используют витамин В₁ в концентрации 0,0001 мг% [5] или синтетическую среду 199 (3 мл на 100 мл среды).

Важно отметить, что влияние того или иного стимулятора или группы стимуляторов на рост чумного микроба зависит от природы белковой основы питательной среды.

Синтетические среды. Для культивирования чумного микроба применяются и синтетические питательные среды. Данные об удачном применении таких сред встречаются в работах отечественных и зарубежных исследователей [9, 28, 42]. Для роста чумного микроба при температуре 30 °С достаточно наличия в среде фенилаланина, валина, изолейцина, метионина и тиосульфата. В состав синтетических питательных сред, предназначенных для культивирования чумного микроба при температуре 37 °С, входит уже от 8 до 15 аминокислот, биотин и пантотенат [32].

В.И.Вейнблат и соавт. (1972) предложили синтетическую питательную среду для выращивания чумного микроба при 28 и 37 °С. Аминокислотный состав среды примерно соответствовал десятикратному содержанию аминокислот в крови человека.

Бульоны. *Y. pestis* хорошо растет в обогащенных бульонах, типа Хоттингера [7], сердечно-мозговой вытяжки (ВН1), триптиказо-соевого или питательно-го бульонов [45]. Через 24 ч культивирования микроб образует хлопьевидный или порошкообразный осадок на фоне прозрачного бульона. Часто образует нежную пленку; в старых культурах от нее вглубь среды могут отходить нити – «сталактиты».

Появление характерного роста микроба в прозрачном бульоне используют для идентификации

Y. pestis. Оптимальное значение рН бульона 7,2-7,6. Время генерации микроба в ВН1 бульоне – 1,25 ч.

В связи со специфическим ростом чумного микроба в бульоне последние могут быть использованы при выделении возбудителя. Но не как самостоятельная процедура, а лишь совместно с выделением культуры на агаризованной среде.

Селективные среды для выделения чумного микроба. Попытки создания селективных агаризованных сред для выделения *Y. pestis* относятся к началу прошлого века. Еще в 1917 г. J.G.Drennan [31] предложил использовать кристаллический фиолетовый в концентрации 1/700 % для придания ингибирующих свойств питательному агару из сердечного настоя.

В работах G.LaRose [36] и L.Kirschner [34] описано успешное использование питательной среды, содержащей соли желчных кислот, для выделения чумного микроба. Вместе с тем на данной среде отмечается появление нетипичных колоний *Y. pestis*, а соли желчных кислот ингибируют лишь ограниченное количество видов микроорганизмов.

Среда, предложенная E.J.Morris [39], содержала уже несколько селективных добавок: новобиоцин, эритромицин и циклогексимид, ингибирующих как грамположительные и грамотрицательные бактерии, так и грибы.

R.F.Knisely *et al.* [35] усилили ингибирующее действие указанного выше селективного набора добавлением этиленвиолета, азида натрия и нистатина и успешно использовали среду для прямого выделения *Y. pestis* из сильно загрязненного материала.

J.Markenson и S.Ben-Efraim [38] предложили среду, содержащую свежую желчь, а гомогенизированные органы павших животных перед посевом обрабатывали раствором теллурида калия (150 мкг/мл). Данная процедура значительно снижала количество грамотрицательных контаминантов.

Для подавления посторонней микрофлоры (протей и некоторых других бактерий) также предложены малахитовый зеленый [1] в концентрации 1:100000–800000 и борная кислота [14]. Перед использованием генцианвиолета рекомендуется определять рабочую дозу для каждой серии препарата [15] перед обследованием сезоном и указывать в паспорте на рабочий раствор.

Помимо этого, для ингибирования посторонней флоры могут быть использованы теллурид калия в концентрации 1:300000, фосфомицин 50–100 мкг/мл.

В полевых условиях ВОЗ рекомендует использовать дезоксихолатный агар, так как при этом не требуется стерилизация, и чумной микроб может быть выделен даже при комнатной температуре [27]. Чумной микроб вырастает на нем при температуре 37 °С через 48 ч в виде немногочисленных красноватых колоний величиной с булавочную головку.

В более поздних руководствах рекомендуют для выделения чумного микроба использовать агар МакКонки [30]. Присутствие кристаллического фио-

летового в среде подавляет рост грамположительных бактерий, а соли желчных кислот препятствуют росту некоторых грамотрицательных бактерий. Вместе с тем среда позволяет дифференцировать штаммы чумного микроба по признаку ферментации лактозы.

Центр контроля за заболеваемостью (CDC) предлагает в качестве альтернативной среды применять eosin methylene blue (EMB) agar [37].

В качестве селективной среды для *Y. pestis* широко разрекламирован CIN агар (Cefsulodin-irgasannovobiosin agar) [41], разработанный первоначально для выделения *Yersinia enterocolitica* [44]. Среда, обладая сильными ингибирующими свойствами в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, не подавляет рост грибов. Но главное, значительно угнетает рост *Y. pestis*. Только 5 % бактерий было обнаружено через 36 ч инкубации при температуре 28 °С, а размер выросших колоний варьировал в широком диапазоне [43].

Недавние исследования израильских ученых привели к созданию новой улучшенной селективной среды для выделения *Y. pestis*, названной BIN агар [26]. Формула BIN агара основана на brain heart infusion (BHI) агаре, который придает среде высокие ростовые свойства. Ингибирующие свойства обеспечиваются присутствием целого набора реагентов: солей желчных кислот (холата натрия (0,5 г/л) и дезоксихолата натрия (0,5 г/л)), иргазана (0,0008 г/л), кристаллического фиолетового (0,001 г/л) и нистатина (0,025 г/л). Поэтому на среде отсутствует рост золотистого стафилококка, многих видов бацилл, сальмонелл, шигел, кишечной палочки и грибов. Показано, что BIN агар более эффективен в поддержании роста чумного микроба из чистых культур и выделении его в модельных экспериментах, чем среда МакКонки и CIN агар.

Совсем свежая разработка американских изобретателей посвящена созданию хромогенной среды для идентификации *Y. pestis* [24]. В качестве азотистой основы заявлены, наверное, все коммерческие белковые гидролизаты, начиная от триптона, бактопептона и заканчивая соевым гидролизатом, и даже сульфат аммония. Ингибирующее действие в отношении бактерий и грибов обеспечивает комплекс ингредиентов: соли желчных кислот, иргазан, ванкомицин и циклогексимид.

Помимо селективных, среда обладает дифференциальными свойствами. Для этого в состав среды предлагается вводить один или смесь углеводов: сахарозу, инозит, дульцит, лактозу, адонит, рамнозу и целлобиозу, которые не ферментируются чумным микробом. Среда также содержит индикатор pH для индикации изменения pH среды и хромогенный субстрат 5-бром-4-хлор-3-индоксил-β-D-глюкопиранозид и 3-индоксил-β-D-глюкопиранозид или изопропил-β-D-тиоглюкопиранозид и 3-О-метил-β-D-глюкопиранозид, которые реагируют с β-глюкозидазой *Y. pestis* с образованием осадка, окрашивающего колонии в синий цвет. Микробы, ферментирующие хотя

бы один из перечисленных сахаров и не обладающие β-глюкозидазой, формируют на среде колонии желтого цвета. Колонии микроорганизмов, положительных в отношении сахаров и β-глюкозидазы, окрашиваются в зеленый цвет. Авторы изобретения гарантируют появление чумного микроба и его простую дифференциацию от родственных микробов через 48 ч инкубации при температуре 28–30 °С. Штаммы *Y. enterocolitica* формирует колонии желтого цвета, а штаммы *Y. pseudotuberculosis* растут в виде колоний, окрашенных от зеленого до желто-зеленого цвета.

Дифференциальные среды. Для дифференциации чумного микроба было предложено много питательных сред: голодный агар Безсоновой; среда с рамнозой, агар для обнаружения пестицида, магниево-оксалатный агар, среда с конго-красным, среда для определения фибринолитической активности и др. Подробное их описание можно найти в монографии Н.И.Николаева и др. публикациях [14, 22, 49].

Здесь хотелось бы остановиться на коммерческой иерсиниозной среде производства ФГУН ГНЦ ПМБ (Оболенск), выпускаемой в виде сухого порошка (Регистрационный номер ФСР 2007/00900 от 11.10.2007 г.). Среда первоначально разработана для дифференциации культур *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* по признаку утилизации мочевины. Вместе с тем она позволяет дифференцировать их от чумного микроба. Посев штаммов *Y. pestis* приводит к появлению типичных (с темным центром и ажурной периферией) колоний, окрашенных в желтый цвет. При этом колонии *Y. enterocolitica* выглядят синими влажными гладкими, а *Y. pseudotuberculosis* – сухими с фестончатым краем зелено-синего цвета.

С целью дифференциации чумного микроба фирма Becton Dickinson предлагает использовать агар Кристенсена с мочевиной, который входит в состав диагностической системы для *Y. pestis*. Фирма Becton Dickinson выпускает также и другие среды, необходимые для диагностики чумы. Это триптиказо-соевый и питательный бульоны и агары, CIN агар.

Резюмируя вышесказанное, можно заключить, поскольку чумной микроб не требует уникальных сред для роста, то в арсенале исследователя для работы с чумным микробом должны быть хотя бы обогащенные бульон и агар, а также селективная и дифференциальная среды. В нашей стране к настоящему времени нет ни одной сертифицированной среды, ни для культивирования, ни для выделения, ни для дифференциации чумного микроба, зарегистрированной в надлежащем порядке.

В конце прошлого века Иркутский ПЧИ выпускал среду для культивирования чумного микроба по ФС 42-3609-98. Питательная среда для культивирования чумного микроба (ЧПС), разработанная во ФГУН ГНЦ ПМБ, успешно прошла Государственные испытания еще в 2000 г.

Таким образом, в современной бактериологической лаборатории биохимические и микробиологические методы и тесты понемногу вытесняются

молекулярно-биологическими, иммунохимическими и другими ускоренными методами [25]. Диагноз заболевания может быть поставлен при использовании высокотехнологичных тест-систем, основанных на выявлении антигенов с определенными антителами в прямых тестах флюоресценции, или обнаружении определенных последовательностей ДНК и др. Однако выделение возбудителя остается «золотым стандартом» в диагностике любого инфекционного заболевания. Чума не является исключением. Для выделения возбудителя нужны стандартные питательные среды. Стандартность сред может быть достигнута при их промышленном изготовлении на предприятиях, где действует система контроля на каждой стадии технологического процесса, где внедрен процесс валидации и сертификации.

Работа выполнена по Государственному контракту № 128-Д от 11.06.2009 г. в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Апарин Г.П. О влиянии малахитовой зелени на рост возбудителя чумы и некоторых других микробов. Изв. Иркут. ГосНИПЧИ Сибири и Дальн. Вост. 1958; 18:3–7.
2. Артюхин В.И., Шепелин А.П., Киселева Н.В. Белковые гидролизаты в производстве питательных сред: Производство и применение продуктов микробиологических производств: Обзорная информация. М.: ВНИИСЭНТИ; 1990. 9–10. 52 с.
3. Арыкпаева У.Т., Класовский Л.Н., Степанов В.М., Сучков Ю.Г. Минимальная синтетическая среда для культивирования бактерий чумы при температуре 37 °С. Пробл. особо опасных инф. 1978; 1:22–6.
4. Бахрах Е.Э., Обухова З.А., Маслова О.П. Усовершенствование технологии приготовления питательных сред для выращивания чумного микроба. Тр. ин-та «Микроб». 1960; 4:501–7.
5. Домарадский И.В. Чума. М.: Медицина; 1998.
6. Домарадский И. В., Голубинский Е. П., Лебедева С. А., Сучков Ю. Г. Биохимия и генетика возбудителя чумы. М.: Медицина, 1974. 165 с.
7. Домарадский И.В. Общая характеристика обмена веществ чумного микроба. Изв. Иркут. ГосНИПЧИ Сибири и Дальн. Вост. 1958; 18:155–71.
8. Желтенков А.И., Анохин С.В. Влияние фильтрата сарцины на некоторые свойства чумного микроба. Тр. ин-та «Микроб». 1958; 2:341.
9. Иванов В.А. Культивирование чумного микроба на жидких и твердых синтетических средах. Тр. Ин-та «Микроб». 1959. С. 98–106.
10. Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза. Методические указания. МУ 3.3.2.2124-06. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2007. 35 с.
11. Мартенс Л.А. Получение питательных сред и кислотных гидролизатов рыбокопной муки. В кн.: Специфическая профилактика особо опасных инф. М.; 1964. С. 246–56.
12. Муравьева Н.К., Крайнова А.Н., Маслова О.П. Применение казеиновых сред в вакцинном производстве. В кн.: Особо опасные и природноочаговые инфекции. М.: Медиздат; 1962. С. 207–11.
13. Наумов А. В., Самойлова Л. В., редакторы. Руководство по профилактике чумы. Саратов; 1992. 275 с.
14. Николаев Н. И. Чума. М.: Медицина; 1968. 238 с.
15. Организация и проведение эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации. МУ 3.1.1098-02. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2002.
16. Орел Л.Л., Класовский Л.Н., Терентьева Л.И., Стогова А.Г., Чмиров О.Б., Доброцветова Т.Я. Влияние молибденовокислого аммония на рост возбудителя чумы и холеры. В кн.: Микробиология, иммунология и биохимия особо опасных инф.

Саратов; 1987. С. 85–91.

17. Попов А.А. Сравнение эффективности стимулирующего действия гемолизированной крови и стимулятора из сарцины при посеве шт. EV НИИ ЭГ. В кн.: Совершенствование методов диагностики и профилактики чумы и холеры. Саратов; 1987. С. 34–40.
18. Розанова Р.Н., Лазарева И.Р., Елкин Ю.М., Свешникова Л.П. Потребности в факторах роста чумного микроба из Закавказского нагорья. Пробл. особо опасных инф. 1976; 49:8–11.
19. Трифонова А.А. Роль составных частей крови человека и различных видов животных в питании чумного микроба. В кн.: Вопросы микробиологии и лабораторной диагностики особо опасных инф. Саратов; 1965. С. 117–8.
20. Трифонова А.А. Сравнительное изучение некоторых стимуляторов роста чумного микроба. Тр. ин-та «Микроб». Саратов; 1960. 4:162–4.
21. Фидиппов А.Ф., Кондрашкова Т.В., Муравьева Н.К., Павлова Л.П., Огарев Н.А. Свойства культур чумного микроба, выращенных на средах из аутолизатов рыбы. Пробл. особо опасных инф. 1974; 3(37):62–7.
22. Шеремет О.В., Голубинский Е.П., Винидниченко Н.Н. Питательная среда для дифференциации возбудителя чумы и псевдотуберкулеза. Пробл. особо опасных инф. 1978; 4(62):65–66.
23. Шеремет О.В., Милютин В.Н., Корганов Я.Н., Копылов В.А. Вирулентность, жизнеспособность и чувствительность к антибиотикам возбудителя чумы при выращивании на некоторых питательных средах при 28 и 37 °С. Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол. 1986; 5:53–6.
24. Abrott T. J. Plating media for the identification of *Yersinia pestis*. US Patent 000402 (A1). Patent Application 20070004021. 2007.
25. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. Clin. Microbiol. Rev. 2004; 7:434–64.
26. Ber R., Mamroud E., Aftalion M., Tidhar A., Gur D., Flashner Y., Cohen S. Development of an improved selective agar medium for isolation of *Yersinia pestis*. Appl. Environ. Microbiol. 2003; 69:5787–92.
27. Berencsi G., Khan A.S., Halouška J. Emerging biological threat. IOS Press; 2003. P. 181.
28. Brownlow W.J., Wessman G.E. Nutrition of *Pasteurella pestis* in chemically defined media at temperatures of 36 to 38 °C. J. Bacteriol. 1960; 79:299–304.
29. Chu M.C. Basic Laboratory Protocols for the Presumptive Identification of *Yersinia pestis*. CDC. 4/18/01.
30. Dennis D.T., Gage K.L., Gratz N., Poland J.D., Tikhomriov E. Plague manual: epidemiology, distribution, surveillance and control. Geneva: WHO; 1999.
31. Drennan J.G., Teague O. A selective medium for the isolation of *B. pestis* from contaminated plague lesions and observations on the growth of *B. pestis* on autoclaved nutrient agar. J. Med. Res. 1917; 36:519–32.
32. Englesberg E., Levy J.B. Studies of immunization against plague. VI. Growth of *Pasteurella pestis* and the production of the envelope and other soluble antigens in a casein hydrolyzate mineral glucose medium. J. Bacteriol. 1956; 67:438–49.
33. Higuchi K., Carlin C.E. Studies on the nutrition and physiology of *Pasterella pestis*. I. A casein hydrolyzate medium for the growth of *Pasterella pestis*. J. Bacteriol. 1957; 73:122–9.
34. Kischner L. Gals als voedingsbodem bij de diagnose der pest septicaemiae. Geneesh. Tijdschr. 3. Ned. Indie. 1934; 74:1149–59.
35. Knisely R.F., Swaney L.M., Friedlander H. Selective media for the isolation of *Pasterella pestis*. J. Bacteriol. 1964; 88:491–6.
36. LaRose G. L'oxione della bile sul Bacillo della peste. Giorn. Batteriol. Immunol. 1930; 5:1768–80.
37. Level A Laboratory Procedures for Identification of *Yersinia pestis*. Available from: http://www.bt.cdc.gov/Agent/Plague/ype_la_cp_121301.pdf.
38. Markenson, J., and S. Ben-Efraim. Oxgall medium for identification of *Pasteurella pestis*. J. Bacteriol. 1963; 85:1443–5.
39. Morris, E. J. Selective media for some *Pasteurella* species. J. Gen. Microbiol. 1958; 19:305–11.
40. Murray P.R., editor in chief. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington, D.C.: ASM Press; 1999. 1773 p.
41. Rasoamanana, B., L. Rahalison, C. Raharimanana, and S. Chanteau. Comparison of *Yersinia* CIN agar and mouse inoculation assay for the diagnosis of plague. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 1996; 90:651.
42. Rockenmacher M., James H., Elberg S.S. Studies of the nutrition and physiology of *Pasteurella pestis*. I. A chemically defined culture medium for *Pasteurella pestis*. J. Bacteriol. 1952; 63:785–94.
43. Russell P., Nelson M., Whittington D., Green M., Eley S.M., Tithall R.W. Laboratory diagnosis of plague. Br. J. Bio. Sci. 1997; 54:231–6.
44. Schiemann, D. A. Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*. Can. J. Microbiol. 1979; 25:1298–304.
45. Sentinel Laboratory Guidelines for suspected agents of bioterrorism. *Yersinia pestis*. American Society for Microbiology;

2005. 19 p.

46. *Smith L.D. and Phillips R.L.* Growth of *Pasterella pestis* on a casein digest medium. J. Franklin Inst. 1943; 235:536–45.

47. *Sokhey S.S., Habbu M.K.* Optimum and limiting hydrogen ion concentrations for the growth of the plague bacillus in broth. J. Bacterial. 1943; 46:33–7.

48. *Sokhey S.S., Harbu M.K., Bharucha K.F.* Hydrolisate of casein for preparation of plague and cholera vaccines. Bull. WHO. 1950; 3:25–31.

49. *Surgalla M.J., Befsley E.D., Albizo J.M.* Practical Applications of new laboratory methods for plaque investigations. Bull. WHO. 1970; 42:993–1000.

Об авторах:

Домотенко Л.В., Подкопаев Я.В., Храмов М.В., Дятлов И.А. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Московская обл., Серпуховский р-он, п. Оболенск. E-mail: domotenko@obolensk.org

L.V.Domotenko, Ya.V.Podkopaev, M.V.Khramov, I.A.Dyatlov

Nutrient Media for Plague Diagnostics

State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow region

National and foreign literature was analyzed. Considered were nutrient media for plague agent growth, isolation and differentiation. Present state of nutrient media production was highlighted.

Key words: plague agent, nutrient media.

Authors:

Domotenko L.V., Podkopaev Ya.V., Khramov M.V., Dyatlov I.A. State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk. E-mail: domotenko@obolensk.org

Поступила 14.09.09.

А.А.Лапин, В.М.Павлов, А.Н.Мокриевич, Л.В.Домотенко, М.В.Храмов

**ПРОСТАЯ ЖИДКАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА
ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ *FRANCISELLA TULARENSIS***

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

Предложена простая жидкая питательная среда для наработки биомассы туляремийного микроба с целью выделения ДНК и антигенов из бактериальных клеток, а также для культивирования трансформантов *F. tularensis*. Показано, что за исключением цистеина дрожжевой экстракт содержит полный набор аминокислот и рост-стимулирующих факторов, необходимый для роста *F. tularensis*.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, питательная среда, дрожжевой экстракт.

Возбудитель туляремии, *Francisella tularensis*, является ауксотрофом [1], что характерно для внутриклеточных паразитов. Большую часть современных знаний о свойствах туляремийного микроба и реакции организма на *F. tularensis* были получены на модели вакцинного штамма *F. tularensis* 15/10, созданного аттенуацией природного изолята *F. tularensis* subsp *holarctica*. В последнее десятилетие интерес к молекулярно-генетическим исследованиям туляремийного микроба возрос из-за необходимости разработки современных препаратов для диагностики и профилактики туляремии. Используемые жидкие питательные среды либо сложны в приготовлении (многокомпонентная синтетическая среда Чемберлена [3]), либо содержат гидролизаты белков животного происхождения (бульон Мюллера-Хинтона, сердечно-мозговая вытяжка и триптиказо-соевый бульон [6, 8]), а также Т-бульон, включающий в себя сердечно-мозговую экстракт, триптон и кислотный гидролизат казеина [2]. Наличие пептидов в гидролизатах белков животного происхождения может представлять определенную проблему при выделении и очистки антигенов и ДНК из биомассы туляремийного микроба, выращенной на таких богатых средах [5].

Цель настоящего исследования – оптимизация состава жидкой питательной среды для проведения молекулярно-генетических работ с вакцинным штаммом туляремийного микроба (выделение ДНК, криотрансформация, электропорация и аллельный обмен).

В настоящей работе использован штамм *F. tularensis* 15/10, полученный из музейной коллекции живых культур (ФГУН ГНЦ ПМБ, Московская обл.). *F. tularensis* культивировали на твердой (FT-агар, ФГУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) и жидкой питательной средах при 37 °С.

Базовый состав жидкой питательной среды (на 1 л): кислотный гидролизат казеина – 5 г («Roth»); дрожжевой экстракт – 5 г («Roth»); цистеина гидрохлорида моногидрат – 0,1 г («Sigma»); фосфат калия однозамещенный – 12 г; калий гидроксид – 3,9 г; натрий хлористый – 5 г («Реахим», Россия); сульфат железа (II) семиводный – 6 мг («ЗАО Мосреактив»,

Россия); глюкозы – 10 г; pH среды – 7,2. Для оптимизации состава среды концентрации компонентов меняли в диапазоне: кислотный гидролизат казеина от 0 до 10 г, натрий хлористый от 5 до 20 г, цистеин от 0 до 0,4 г, глюкоза от 0 до 10 г.

Культуру выращивали в пробирках с 3 мл жидкой питательной среды на термостатируемой качалке (200 об/мин, 37 °С) в течение 5–18 ч. Отбор проб проводили на 2,5; 5 и 18 ч роста. Оптическую плотность клеточной суспензии измеряли при длине волны 590 нм с помощью фотокolorиметра КФК-2. В качестве посевного материала использовали 24-часовую агаровую культуру, начальная концентрация клеток была около $8 \cdot 10^8$ КОЕ /мл ($OD_{590} \sim 0,05$).

Кислотный или ферментативный гидролизат казеина входит в состав ряда питательных сред для выращивания *F. tularensis*. Для выяснения влияния гидролизата казеина на рост туляремийного микроба культуру *F. tularensis* 15/10 выращивали в течение 5 ч, измеряя оптическую плотность клеточной суспензии через 2,5 и 5 ч роста (табл. 1).

Из табл. 1 следует, что кислотный гидролизат казеина практически не улучшает качество среды, а при высоких концентрациях даже подавляет рост культуры туляремийного микроба.

Цистеин является ключевым стимулятором роста для *F. tularensis* [4, 7]. Для определения оптимальной концентрации этой аминокислоты в жидкой питательной среде туляремийную культуру выращивали в течение 5 ч и измеряли оптическую плотность

Таблица 1

Влияние кислотного гидролизата казеина на эффективность размножения *F. tularensis*

Концентрация гидролизата казеина, г/л	0		1,25		2,5		5		10	
	2,5	5	2,5	5	2,5	5	2,5	5	2,5	5
Время, ч	2,5	5	2,5	5	2,5	5	2,5	5	2,5	5
Оптическая плотность культуры в относительных единицах	2,6	6,5	2,6	6,7	2,7	6,4	2,6	6,7	2,2	4,0

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 за 1 взята оптическая плотность исходной культуры, точность измерений – 5 %.

Таблица 2

Таблица 3

Влияние цистеина на эффективность размножения *F. tularensis*

Концентрация цистеина, г/л	0	0,004	0,01	0,03	0,1
Оптическая плотность культуры в относительных единицах	2,8	5,8	6,0	7,0	6,4

Влияние глюкозы на эффективность размножения *F. tularensis*

Концентрация глюкозы, г/л	0	1	2	5	10
Оптическая плотность культуры в относительных единицах	6,0	6,8	7,7	6,8	5,7

клеточной суспензии (табл. 2).

Оптимальная концентрация цистеина в среде находится в пределах 0,03–0,1 г/л для начального этапа роста культуры, в случае же 18-часового выращивания оптическая плотность культуры достигала OD₅₉₀ – 1,40 для среды с 0,1 г/л цистеина и OD₅₉₀ – 0,70 для среды с 0,03 г/л цистеина.

При выращивании культуры *F. tularensis* в жидкой питательной среде в течение 5 ч с различным содержанием глюкозы не выявлено существенной разницы в оптической плотности клеточных суспензий (табл. 3), хотя наиболее эффективный рост бактерий наблюдали в среде с 2 г/л глюкозы.

Изменение концентрации хлористого натрия в среде в пределах 5–20 г/л существенно не влияло на скорость роста культуры. Наибольший прирост оптической плотности за 5 ч роста (OD₅₉₀ – 0,64) наблюдали при концентрации хлористого натрия 10 г/л.

Добавление соли железа незначительно влияло на размножение туляремийного микроба в исследуемой жидкой питательной среде. Так, при добавлении железа до концентрации 6 мг/л оптическая плотность культуры за 5 ч роста увеличивалась в 6,7 раз, а без железа – в 4,8 раза.

Полученные данные показывают, что в жидкой питательной среде для туляремийного микроба дрожжевой экстракт может служить единственным источником аминокислот и рост-стимулирующих факторов, за исключением цистеина. Этот вывод справедлив при культивировании культуры *F. tularensis* с посевной дозой более 1·10⁸ КОЕ /мл, при меньших посевных дозах наблюдали торможение скорости роста на начальном этапе культивирования (результаты не приведены).

В результате анализа экспериментальных данных нами был выбран оптимальный состав жидкой питательной среды (на 1 л): дрожжевой экстракт – 5 г, калия фосфат однозамещенный – 12 г; калия гидроксид – 3,9 г; натрий хлористый – 10 г; цистеина гидрохлорида моногидрат – 0,1 г, сульфат железа (II), 7-водного – 6 мг, глюкоза – 2 г; pH среды 7,2).

Данная среда оптимальна для наработки биомассы туляремийного микроба с целью выделения ДНК и антигенов из клеток, а также может использоваться в генетических работах по трансформации плазмидных ДНК в *F. tularensis* и аллельному обмену в геноме туляремийного микроба (результаты будут опубликованы в последующих работах).

Работа выполнена по Государственному контракту № 128-Д от 11.06.09 г. в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.: Медицина; 1975. 192 с.
2. Павлович Н.В., Мишанькин Б.Н. Прозрачная питательная среда для культивирования *Francisella tularensis*. Антибиотики и мед. биотехнол. 1987; 32:133–7.
3. Francis E. The amino-acid cistine in the cultivation of tularence. Public Health Reports. 1923; 38(3):324–7.
4. Chamberlain R.E. Evaluation of live tularemia vaccine prepared in a chemical defined medium. Appl. Microbiol. 1965; 13:232–5.
5. Hazlett K.R.O., Caldon S.D., McArthur D.G., Cirillo K.A., Kirimanjeswara G.S., Magguilli M.L. et al. Adaptation of *Francisella tularensis* to the mammalian environment is governed by cues which can be mimicked *in vitro*. Infect. Immun. 2008; 76:4479–88.
6. Lee B.Y., Horwitz M.A., Clemens D.L. Identification, recombinant expression, immunolocalization in macrophages, and T-cell responsiveness of the major extracellular proteins of *Francisella tularensis*. Infect. Immun. 2006; 74:4002–13.
7. Traub A., Mager J. Studies on the nutrition of *Pasteurella tularensis*. J. Bact. 1960; 79:566–71.
8. Twine, S. M., Mykytczuk N. C., Petit M. D., Shen H., Sjostedt A., Wayne C. J. et al. In vivo proteomic analysis of the intracellular bacterial pathogen, *Francisella tularensis*, isolated from mouse spleen. Biochem. Biophys. Res. Commun. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006; 345:1621–33.

Об авторах:

Лавин А.А., Павлов В.М., Домотенко Л.В., Храмов М.В., Мокриевич А.Н. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Московская обл., Серпуховский р-он, п. Оболensk. E-mail: vitpav@obolensk.org

A.A.Lavin, V.M.Pavlov, A.N.Mokrievich, L.V.Domotenko, M.V.Khramov

Simple Liquid Nutrient Medium for Molecular Genetic Investigations of *Francisella tularensis*

State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow region

Proposed was the simple liquid nutrient medium for tularemia agent biomass growth with the aim to isolate DNA and antigens out of bacterial cells and to culture the transformants of *F.tularensis*. Shown was that yeastrel contained complete set of amino acids and growth stimulating agents required for *F.tularensis* growth, except for cysteine.

Key words: *Francisella tularensis*, nutrient medium, yeastrel.

Authors:

Lavin A.A., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Domotenko L.V., Khramov M.V. State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk. E-mail: vitpav@obolensk.org

Поступила 14.09.09.

Д.А.Будыка, Н.В.Абзаева, Г.Ф.Иванова, С.Е.Гостищева, А.А.Фисун, Л.В.Ляпустина

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ СЕРИЙ ВАКЦИНЫ ЧУМНОЙ ЖИВОЙ ПО ПОКАЗАТЕЛЯМ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ И ТЕРМОСТАБИЛЬНОСТИ

ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»

Проведено сравнительное изучение регламентированных показателей (жизнеспособность, термостабильность) препаратов вакцины чумной живой, изготовленных по различным биотехнологическим схемам производства. Показано, что комбинация оптимальной температуры выращивания биомассы штамма *Yersinia pestis* EV (21 ± 1) °С и оптимального соотношения концентрации микробной взвеси и стабилизатора в суспензии с уменьшенной оптической плотностью и объемом способствует эффективному удалению из препарата влаги, что в итоге стабилизирует показатель жизнеспособности микробных клеток (м.к.) в процессе хранения.

Ключевые слова: чумная живая вакцина, жизнеспособность, термостабильность, температура выращивания, количественные параметры.

Применяемые при производстве живой чумной вакцины технологические приемы оказывают значительное влияние на жизнеспособность микробных клеток вакцинного штамма *Y. pestis* EV. Количество жизнеспособных микроорганизмов в процессе лиофилизации и хранения зависит от многих факторов: условий культивирования, фаз роста, концентрации в суспензии, используемой защитной среды, технологии высушивания, температуры, сроков хранения и способов выведения клеток из анабиоза [2].

Биотехнология производства чумной вакцины основана на температуре культивирования биомассы (27 ± 1) °С [7]. Однако согласно литературным данным [1], температура выращивания чумного микроба 20–25 °С стимулирует биологическую активность возбудителя чумы, что может значительно улучшить качество вакцины за счет увеличения в биомассе процента живых микробных клеток. Ранее проведенные опыты по отработке температурных режимов культивирования биомассы в биотехнологии производства вакцины чумной живой при (21 ± 1) °С в сравнении с регламентированной (27 ± 1) °С показали, что температура выращивания существенно влияет на количество жизнеспособных микробных клеток в готовом препарате. При этом температура выступает как фактор, влияющий на биосинтетические процессы в цитоплазматических мембранах клеток за счет увеличения содержания ненасыщенных жирных кислот, накопление которых в мембранах клеток способствует их большей устойчивости к лиофилизации [4, 5].

Вместе с тем экспериментально доказано, что вакцина с целенаправленно уменьшенной концентрацией микробных клеток в суспензии обладает качественными характеристиками (жизнеспособность, термостабильность, содержание живых микробов в человекодозе), превосходящими стандартные коммерческие образцы [2, 3, 6]. Это происходит вследствие более сбалансированного соотношения микробных клеток и защитной среды, а также возможности достичь в регламентированных пределах состояния более глубокого анабиоза живых клеток при лиофилизации за счет уменьшения объема суспензии

вакцины с 2,0 до 1,0 мл в ампуле. В настоящее время разработана и внедрена вакцина чумная живая с содержанием от 20 до 50 человекодоз в ампуле, полностью соответствующая требованиям регламента производства данного препарата [3].

Материалы и методы

Экспериментальные образцы вакцины чумной живой были приготовлены при сочетанном воздействии на микробные клетки штамма *Y. pestis* EV обоих указанных выше факторов: температурных и количественных.

Изучены показатели жизнеспособности и термостабильности экспериментальных образцов препарата, полученных при температуре культивирования биомассы (21 ± 1) °С, имеющих различную концентрацию суспензии (около 20 и 80 млрд м.к./мл) и объем в ампуле (1,0 и 2,0 мл соответственно). Для контроля параллельно проверяли показатели образцов, полученных при регламентированной температуре выращивания (27 ± 1) °С с аналогичными параметрами оптической концентрации и объема суспензии.

Жизнеспособность и термостабильность микробов определяли культуральным методом [7]. Вакцину выращивали одномоментно на одной серии агара Хоттингера (рН 7,1±0,1), что исключило влияние ростовых качеств питательной среды на отдельные образцы препарата. В полученных сериях вакцины определяли жизнеспособность микробных клеток во время розлива и после сушки, а также в процессе хранения (в течение 2 лет) при температуре (4 ± 2) °С.

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что температура выращивания вакцинного штамма оказывает существенное влияние на показатели жизнеспособности биомассы даже до этапа лиофильного высушивания, а жизнеспособность препарата, выращенного при (21 ± 1) °С, практически во всех образцах превосходит таковую у вакцины,

Таблица 1

Жизнеспособность вакцины чумной живой, полученной при различных температурных условиях и количественно-объемных параметров до и после этапа лиофильного высушивания

Количество определений	Жизнеспособность, %			
	Оптическая концентрация 20 млрд/мл, объем в ампуле 1 мл		Оптическая концентрация 80 млрд/мл, объем в ампуле 2 мл	
	до лиофилизации	после лиофилизации	до лиофилизации	после лиофилизации
<i>Выращена при (27±1) °С</i>				
3	36,4±2,1	26,8±3,0	46,4±0,3	28,1±0,9
3	43,1±0,8	30,8±2,6	41,3±1,4	30,6±3,1
M±m	39,8±3,3	28,8±2,0	43,8±2,6	29,4±1,3
<i>Выращена при (21±1) °С</i>				
3	67,0±3,7	43,8±4,8	42,7±0,9	36,1±1,7
3	48,1±1,3	35,2±2,6	62,3±2,4	53,4±4,8
3	54,3±3,9	49,2±7,3	-	-
3	50,1±1,7	37,7±3,5	-	-
3	46,6±2,2	38,4±3,0	-	-
3	52,9±1,1	46,1±2,0	-	-
M±m	53,2±3,0	41,7±2,2	52,9±9,8	44,8±8,7
t	3,0	4,3	0,9	1,8

Примечание. Прочерк – оптическая концентрация не определялась.

выращенной при (27±1) °С, оставаясь более высокой и после сушки (табл. 1).

Отдельного внимания заслуживает анализ показателей жизнеспособности образцов в зависимости от количественных параметров вакцины в ампуле. В пределах каждой группы (по температуре выращивания) существенной разницы в жизнеспособности готовых образцов не отмечается. В то же время при сравнительном анализе сходных по параметрам образцов вакцины между группами с различными температурами культивирования суспензии, четко регистрируется преимущество вакцин, выращенных при (21±1) °С, особенно у образцов со сниженной концентрацией микробных клеток и объемом суспензии в ампуле (t=4,3).

Сравнительная характеристика жизнеспособности образцов чумной вакцины в процессе длительного (2 года) хранения при температуре (4±2) °С показала, что во все сроки исследования этот показатель был выше у вакцины, выращенной при (21±1) °С. При этом уровень жизнеспособности в экспериментальных сериях даже через два года хранения превышал показатель в 35 %, а в контрольных образцах в те же сроки он не достигал даже регламентированной нормы в 25 %.

Следует особо отметить, что у исследованных образцов экспериментальной вакцины, приготовленной со снижением концентрации и объема суспензии в ампуле, во все сроки наблюдения разница в показателях жизнеспособности была существенно выше, чем у регламентированных аналогов (табл. 2).

Помимо анализа жизнеспособности, были проведены исследования по сравнительному изучению термостабильности для экспериментальных (21±1) °С и

контрольных (27±1) °С образцов живой чумной вакцины, имеющих концентрацию 19–21 млрд м.к./мл и разлитых по 1 мл в ампулу. В целом показатель термостабильности оказался выше у вакцины, полученной при температуре культивирования (21±1) °С, составляя в среднем 11 сут, а у некоторых образцов он достигал величины 14,3 сут на фоне более высоких показателей биологической концентрации. При этом у (27±1) °С аналогов показатель термостабильности находился в пределах 10 сут.

Для дополнительной объективизации полученных данных по динамике жизнеспособности микробных клеток изучаемых образцов вакцины в процессе хранения представляло интерес определение этих же показателей под влиянием длительного воздействия повышенной температуры.

В условиях длительного экстремального температурного воздействия в процессе хранения образцов при температуре (37±1) °С в течение 30 сут жизнеспособность микробных клеток в исследуемых препаратах уменьшалась. Динамика изменений представлена на рисунке.

В целом серии, полученные при температуре культивирования (21±1) °С, обнаруживали большую устойчивость к температурному стрессовому фактору, причем наиболее устойчивыми оказались образцы с меньшей концентрацией и объемом суспензии в ампуле, которые также имели меньшие показатели потери в массе при высушивании (1,6 % против 2,7 % – у контрольных). Динамика отмирания живых микробов в вакцине при экстремальных условиях (хранение при (37±1) °С коррелирует с изменением процента живых микробов в процессе длительного хранения при (4±2) °С. При этом на 20-е сутки хра-

Анализ жизнеспособности вакцины чумной живой, полученной при различных условиях культивирования из разной оптической концентрации микробной суспензии, в процессе хранения при (4±2) °С

Количество определений	Жизнеспособность, %					
	Оптическая концентрация 20 млрд/мл, объем в ампуле 1 мл			Оптическая концентрация 80 млрд/мл, объем в ампуле 2 мл		
	после сушки	через 1 год	через 2 года	после сушки	через 1 год	через 2 года
<i>Выращена при (27±1) °С</i>						
3	26,8±3,0	24,3±0,8	24,2±1,2	28,1±0,9	24,4±1,2	24,1±1,6
3	30,8±2,6	30,2±0,3	25,0±1,3	30,6±3,1	25,2±1,6	24,7±3,4
M±m	28,8±2,0	27,3±3,0	24,6±0,4	29,4±1,3	24,8±0,4	24,4±0,3
<i>Выращена при (21±1) °С</i>						
3	35,2±2,6	32,4±1,2	30,1±2,4	36,1±1,7	34,3±0,6	29,3±3,6
3	49,2±7,3	43,6±3,9	39,8±0,8	53,4±4,8	44,5±2,2	42,9±1,3
3	43,8±4,8	40,2±0,5	36,6±2,2	-	-	-
3	37,7±3,5	35,8±1,9	29,1±1,2	-	-	-
3	38,4±3,0	38,1±1,6	35,2±0,7	-	-	-
3	46,1±2,0	45,0±4,1	40,9±1,8	-	-	-
M±m	41,7±2,2	39,2±1,9	35,3±2,0	44,8±8,7	39,4±5,1	36,1±6,8
t	4,3	3,4	5,2	1,8	2,9	1,7

Примечание. Проверк – оптическая концентрация не определялась.

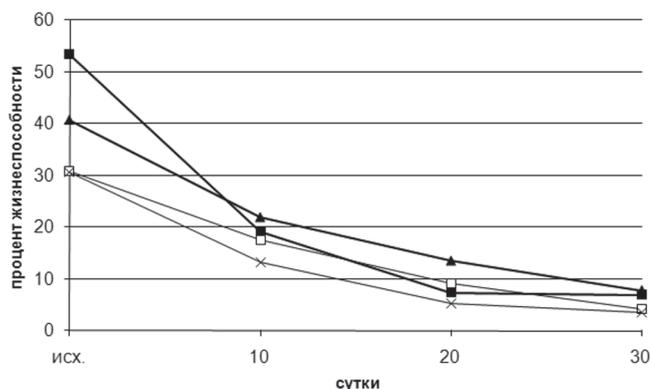
нения при (37±1) °С происходит закономерное снижение количества живых микробных клеток в образцах, что сравнимо с уменьшением жизнеспособности через 1 год хранения вакцины в условиях соблюдения «холодовой цепи». На 30-е сутки нахождения образцов в экстремальных условиях жизнеспособность клеток еще более снижается, но при этом четко прослеживается тенденция большей устойчивости к отмиранию микробных клеток в образцах вакцины, полученных при температуре культивирования (21±1) °С по сравнению с (27±1) °С образцами, что соответствует большей устойчивости и при длительном хранении вакцины при (4±2) °С в течение 2 лет.

Таким образом, полученные результаты показали, что температура культивирования вакцинного штамма *Y. pestis* EV, как и изменение концентрации

и объема суспензии в ампуле, оказывают большое влияние на такие качественные показатели готового препарата, как жизнеспособность и термостабильность. Наилучших результатов в биотехнологии производства чумной живой вакцины удается достичь при сочетанном воздействии на микробную суспензию оптимальных температурных и количественных параметров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алутин И.М. Влияние температуры окружающей среды на биологическую активность возбудителя чумы [автореф. дис. ... канд. мед. наук]. Саратов; 1974. 19 с.
2. Будыка Д.А. Научно-методические основы совершенствования живой чумной вакцины [дис. ... д-ра мед. наук]. Ставрополь; 2002. 279 с.
3. Ефременко А.А. Разработка биотехнологии вакцины чумной живой сухой со сниженным количеством члвководоз в производственной упаковке (ампуле) [дис. ... канд. мед. наук]. Ставрополь; 2005. 117 с.
4. Иванова Г.Ф., Будыка Д.А., Гюлушанян К.С., Руднев С.М. Оптимизация температурных режимов выращивания бактериальной массы в технологии производства чумной вакцины В кн.: Вторая междунар. конф., посв. 75-летию института им. Пастера: Идеи Пастера в борьбе с инфекциями. СПб; 1998. С. 47.
5. Иванова Г.Ф., Будыка Д.А., Абзаева Н.В. Сравнительное изучение эффективности противочумных вакцин, полученных из биомасс, выращенных при (21±1) °С. В кн.: Фундаментальные исследования в биологии и медицине: Сб. научных трудов. Федеральное агентство по оборудованию. СГУ. Ставрополь; 2007. С. 186–8.
6. Тинкер А.И., Будыка Д.А., Верховцева Г.Н., Печников Н.Е. Опыт производственного приготовления живой чумной вакцины со сниженным показателем оптической плотности и оценка ее термостабильности. В кн.: Актуальные вопросы профилактики опасных инфекционных заболеваний: Тез. докл. межведомственной науч. конф.; 26–28 марта 1991. Киров; 1991. С. 38–40.
7. Фармакопейная статья предприятия ФСП 42-8654-07 «Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, накожного скарификационного нанесения и ингаляций».



Динамика отмирания живых микробов в чумной вакцине, полученной при различных сочетаниях биологических и количественных параметров:

▲ – 22 °С, 1 мл; ■ – 22 °С, 2 мл; □ – 28 °С, 1 мл; × – 28 °С, 2 мл

Об авторах:

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

D.A.Budyka, N.V.Abzaeva, G.F.Ivanova, S.E.Gostischeva, A.A.Fissun, L.V.Lyapustina

Comparative Analysis of Experimental Series of Plague Live Vaccine as for Viability and Thermostability Indices

Stavropol Research Anti-Plague Institute

Comparative analysis of specified indices (viability, thermostability) of plague live vaccine preparations, produced in accordance with different

biotechnological production schemes, have been carried out. Shown is that the combination of optimal temperature for *Yersinia pestis* strain EV biomass propagation (21 ± 1) °C as well as optimal concentration proportion of bacteria and stabilizer in suspension with decreased optical density and volume facilitates effectual moisture removal out of preparation, thus stabilizing microbial cells viability index in the process of storage.

Key words: plague live vaccine, viability, thermostability, propagation temperature, quantitative parameters.

Authors:

Budyka D.A., Abzaeva N.V., Ivanova G.F., Gostischeva S.E., Fissun A.A., Lyapustina L.V. Stavropol Anti-Plague Research Institute. 355035, Stavropol, Sovetskaya St., 13–15.

Поступила 14.05.09.

75 ЛЕТ ПРОТИВОЧУМНОМУ ЦЕНТРУ РОСПОТРЕБНАДЗОРА

В октябре 2009 г. исполнилось 75 лет со дня основания Противочумного центра (ранее – Центральной противочумной станции). У этого учреждения Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека яркая и славная история. Его специалисты неоднократно принимали участие в работе противоэпидемических отрядов во многих природных очагах чумы на территории Советского Союза, в ликвидации очагов холеры в нашей стране, в оказании практической помощи учреждениям здравоохранения Монголии, Пакистана, Афганистана, Индии, Бирмы, Бангладеш, Болгарии, Вьетнама, Ливии по локализации и ликвидации эпидемических проявлений чумы, холеры и натуральной оспы.

Сегодня Противочумный центр является организационно-методическим центром по вопросам санитарно-эпидемиологического надзора за чумой, противоэпидемического обеспечения в чрезвычайных ситуациях, санитарной охраны территории России, биологической безопасности и противодействия биотерроризму. Вместе со всеми противочумными учреждениями страны Противочумный центр выполняет задачи по реализации приоритет-

ных направлений государственной политики в деле обеспечения эпидемиологического благополучия населения по чуме, другим особо опасным и природно-очаговым инфекциям, совершенствованию форм и методов эпидемиологического надзора за ними. При этом он осуществляет постоянный контроль за деятельностью противочумных станций России, а также оказывает консультативную, методическую, а при необходимости, практическую помощь органам и учреждениям Роспотребнадзора в 19 субъектах Российской Федерации.

Благодаря высокому профессионализму, энтузиазму и самоотверженности коллектива Противочумный центр снискал заслуженный авторитет и признание. Храня лучшие традиции противочумной службы, нынешнее поколение сотрудников с достоинством продолжает и развивает дело своих предшественников.

Редакционная коллегия научно-практического журнала «Проблемы особо опасных инфекций» поздравляет коллектив Противочумного центра со славным юбилеем и желает больших творческих успехов, новых достижений, здоровья и благополучия!