

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 99

1 · 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

Подписано в печать 10.03.09.

Формат 60×88 1/8.

Бумага офсетная.

Печать офсетная.

Усл. печ. л. 9,5

Гарнитура Таймс.

Тираж 500 экз.

Заказ 191

Подписной индекс – 24687

ISSN 0370-1069. Пробл. особо
опасных инф. 2009. Вып. 99. 1–76

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 ВИНТИ.
Сведения о журнале ежегодно публикуются в международной
справочной системе по периодическим и продолжающимся
изданиям «Ulrich's Periodicals Directory»*

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

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

**Problemy
osobo opasnyh infekcij**

ISSN 0370-1069

**Problems
of Particularly Dangerous Infections**

Онищенко Г.Г., Кузькин Б.П., Кутырев В.В., Щербакова С.А., Пакскина Н.Д., Топорков А.В. Актуальные направления совершенствования лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней

5

Эпидемиология

Попов Н.В., Безсмертный В.Е., Топорков В.П., Иванова С.М., Попов В.П., Удовиков А.И., Шилова Л.Д., Кутырев В.В. Прогноз эпизоотической активности природных очагов чумы Российской Федерации на 2009 г.

11

Жолдошев С.Т. Современные возможности информационно-аналитической подсистемы эпидемиологического надзора за распространением сибирской язвы (аналитический обзор)

17

Кормиленко И.В., Москвитина Э.А. Кleshевые природно-очаговые инфекции в Ростовской области. Сообщение 1. Фауна иксодовых клещей: распространение и численность

23

Никитин А.Я., Козлова Ю.А., Панова Т.С. Анализ изменчивости морфологических признаков с альтернативной вариацией у имаго таежного клеща на территории Иркутской области

28

Микробиология

Видяева Н.А., Ерошенко Г.А., Шавина Н.Ю., Кузнецов О.С., Кутырев В.В. Формирование биопленки штаммами *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов и *Yersinia pseudotuberculosis* на модели *Caenorhabditis elegans*

31

Волков Ю.П., Ерошенко Г.А. Анализ эффективности некоторых методов построения филогенетических деревьев, используемых при оценке эволюционного родства микроорганизмов

35

Грачева И.В., Караваева Т.Б., Меркулова Т.К., Плотников О.П. Современное состояние классификации некоторых патогенных представителей родов *Bacillus*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Francisella*, *Vibrio*, *Yersinia*

42

Дентовская С.В., Платонов М.Е., Комбарова Т.И., Титарева Г.М., Бахтеева И.В., Шайхутдинова Р.З., Иванов С.А., Анисимов А.П. Укорочение кора липополисахарида снижает вирулентность *Yersinia pestis*

50

Ерошенко Г.А., Одинок Г.Н., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Кутырев В.В. Вариабельность генов *aspA* у штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов

52

Пронина Е.А., Шуб Г.М., Креницкий А.П., Майборodin А.В., Бецкий О.В., Гуляев Ю.В. Изменение активности каталазы и супероксиддисмутазы бактерий при действии электромагнитного излучения на частоте молекулярного спектра поглощения и излучения атмосферного кислорода

55

Onischenko G.G., Kouzkin B.P., Kutyrev V.V., Scherbakova S.A., Pakskina N.D., Toporkov A.V. Current Trends of Perfection of Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases

Epidemiology

Popov N.V., Bezsmertny V.E., Toporkov V.P., Ivanova S.M., Popov V.P., Udovikov A.I., Shilova L.D., Kutyrev V.V. Prognostication of Epizootic Activity of Plague Natural Foci in the Russian Federation for 2009

Zholdoshev S.T. Modern Opportunities of Informational and Analytical Subsystem for Epidemiological Surveillance of Anthrax Distribution (Analytical Review)

Kormilenko I.V., Moskvitina E.A. Tick-Borne Natural Focal Infections in the Territory of the Rostov Region. Part 1. The Fauna of Ixodidae Ticks

Nikitin A.Ya., Kozlova Yu.A., Panova T.S. Analysis of Variability of Morphologic Characteristics with Alternative Variation in Imago of Taiga Tick in the Territory of the Irkutsk Region

Microbiology

Vidyaeva N.A., Eroshenko G.A., Shavina N.Yu., Kuznetsov O.S., Kutyrev V.V. Biofilm Formation in *Yersinia pestis* Strains of the Main and Non-Main Subspecies and *Yersinia pseudotuberculosis* on the Model of *Caenorhabditis elegans*

Volkov Yu.P., Eroshenko G.A. Analysis of the Efficiency of Some Methods of Construction of Phylogenetic Trees Used in Evaluation of Microorganisms Evolutionary Relations

Gracheva I.V., Karavaeva T.B., Merkulova T.K., Plotnikov O.P. Present-Day State of Classification of Some Pathogenic Representatives of the *Bacillus*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Francisella*, *Vibrio*, *Yersinia* Genera

Dentovskaya S.V., Platonov M.E., Kombarova T.I., Titareva G.M., Bakhteeva I.V., Shaikhutdinova R.Z., Ivanov S.A., Anisimov A.P. Truncation of Lipopolysaccharide Core Decreases *Yersinia pestis* Virulence

Eroshenko G.A., Odinokov G.N., Krasnov Ya.M., Gooseva N.P., Kutyrev V.V. Variability of the *aspA* Genes in *Yersinia pestis* Strains of the Main and Non-Main Subspecies

Pronina E.A., Shub G.M., Krenitskiy A.P., Maiborodin A.V., Betskiy O.V., Gulyaev Yu.V. Alteration of Activity of Bacterial Catalase and Superoxide Dismutase under the Action of Electromagnetic Radiation at a Frequency of Molecular Absorption Spectrum and Atmosphere Oxygen Emission

Иммунология, патогенез, лечение

Афанасьева Г.А., Чеснокова Н.П., Кутырев В.В., Маслякова Г.Н., Хоркин Ю.Ф. О роли активации процессов липопероксидации в структурной и функциональной дезорганизации биологических систем в динамике бактериального эндотоксикоза

59

Барулина И.С., Саяпина Л.В., Байдалова Н.П., Хорева И.И., Мещерякова И.С., Кормилицына М.И., Коровкин С.А. Оценка показателя «Специфическая безопасность» живой туляремийной вакцины

64

Бондарева Т.А., Поярков А.Ю., Вахнов Е.Ю. Использование полиоксидония в комплексном лечении генерализованных форм экспериментальной чумы

67

Киреев М.Н., Тараненко Т.М., Храмченкова Т.А., Гусева Н.П., Полунина Т.А., Павлова В.И., Подборонова Н.А., Девдариани З.Л., Голова А.Б., Дальвадянт С.М. Изучение стабильности антигенных компонентов чумной химической вакцины (Ф1+ОСА) в тестах на «ускоренное старение» и стресс-условия

70

Юбилеи

К 80-летию Валентина Ивановича Покровского

75

К 90-летию Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова

75

Правила для авторов

76

Immunology, Pathogenesis, Treatment

Afanasieva G.A., Chesnokova N.P., Kutyrev V.V., Maslyakova G.N., Khorkin Yu.F. The Role of Lipoperoxidation Processes in Structural and Functional Disorganization of Biological Systems in Dynamics of Bacterial Endotoxiosis

Barulina I.S., Sayapina L.V., Baidalova N.P., Khoreva I.I., Mescheryakova I.S., Kormilitsyna M.I., Korovkin S.A. Assessment of "Specific Safety" Index of the Live Tularemia Vaccine

Bondareva T.A., Poyarkov A.Yu., Vakhnov E.Yu. Application of Polyoxidonium in the Mixed Treatment of Experimental Plague Generalized Forms

Kireev M.N., Taranenko T.M., Khranchenkova T.A., Gooseva N.P., Polunina T.A., Pavlova V.I., Podboronova N.A., Devdariani Z.L., Golova A.B., Dalvadyants S.M. Analysis of Stability of Plague Chemical Vaccine (F1+MSA) Antigenic Components in the Tests of "Accelerated Ageing" and Stress Conditions

Anniversaries

To the 80-th anniversary of Valentin I. Pokrovsky

To the 90-th anniversary of I.I.Mechnikov Research Institute for Vaccine and Sera

Instruction to Authors

Г.Г.Онищенко¹, Б.П.Кузькин¹, В.В.Кутырев², С.А.Щербакова², Н.Д.Пакскина¹, А.В.Топорков²

АКТУАЛЬНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

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

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

В статье рассмотрены актуальные направления совершенствования лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней: разработка и внедрение в практику методов лабораторной диагностики, основанных на современных диагностических технологиях, стандартизация лабораторных исследований, аккредитация лабораторий, проводящих лабораторную диагностику особо опасных инфекционных болезней, совершенствование системы внешнего контроля качества лабораторных исследований, подготовка кадров.

Ключевые слова: лабораторная диагностика, особо опасные инфекционные болезни, диагностические препараты, контроль качества, аккредитация.

Возрастающая актуальность проблемы особо опасных инфекционных болезней в современных условиях обусловлена неуклонной тенденцией появления новых и возвращения старых нозологических форм, экономическим ущербом, угрожающим стабильности мирового сообщества, возрастанием риска возникновения чрезвычайных ситуаций вследствие стихийных бедствий и техногенных катастроф, актов биологической агрессии [2, 6]. Существенное влияние на стратегию и тактику борьбы с инфекционными болезнями в международном масштабе, адекватную современным эпидемиологическим, социально-экономическим, геополитическим реалиям, оказали саммит стран «Группы восьми» в Санкт-Петербурге в 2006 г. и вступившие в силу в 2007 г. Международные медико-санитарные правила (ММСП, 2005 г.) [9, 11]. Важнейшим направлением реализации глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями, в рамках решений Саммита и ММСП (2005 г.), является укрепление национальной лабораторной сети.

В Российской Федерации эпидемиологический надзор за особо опасными инфекционными болезнями в рамках санитарной охраны территории осуществляют органы и учреждения Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, входящие в единую систему лабораторной диагностики, индикации и идентификации возбудителей особо опасных инфекционных болезней, принципы организации которой закреплены в приказе Роспотребнадзора от 17.03.08 № 88 «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней» [15].

Основу этой системы, включающей территориальный, региональный и федеральный уровни (рисунок), составляют лаборатории учреждений Роспотребнадзора: государственных научных центров (ГНЦ ВБ «Вектор» и ГНЦ ПМБ), противочумных учреждений (ФГУЗ «Противочумный Центр», ФГУЗ «Противочумный институт», ФГУЗ «Противочумная станция»), ФГУЗ «Центр гигиены и

эпидемиологии» в субъектах Российской Федерации [15]. Наряду со стационарными лабораториями, в лабораторную сеть Российской Федерации входят оперативные формирования, функционирующие на базе пяти научно-исследовательских противочумных институтов – 10 специализированных противоэпидемических бригад (СПЭБ) [8]. Необходимо отметить, что противочумные учреждения, выполняющие задачи мониторинга и лабораторной диагностики чумы, а также других особо опасных инфекционных болезней, и СПЭБ осуществляют свою деятельность экстерриториально [16].

В настоящее время в Российской Федерации в рамках глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями осуществляются укрепление материально-технической базы стационарных лабораторий системы государственного санитарно-эпидемиологического надзора, а также модернизация СПЭБ, сочетающиеся с внедрением современных диагностических технологий, гармонизацией национальных норм и стандартов в области эпидемиологического надзора и лабораторной диагностики, адекватных требованиям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [7, 9, 14].

В связи с этим основными направлениями совершенствования лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней являются:

- разработка и внедрение в практику методов лабораторной диагностики, основанных на достижениях микро- и нанотехнологий, протеомного, геномного и биоинформационного анализов;

- повышение чувствительности, специфичности и экспрессности анализов, проводимых с использованием существующих методов лабораторной диагностики;

- разработка и внедрение в практику лабораторий различных уровней стандартов диагностической деятельности (стандартизация лабораторных исследований);

- аккредитация лабораторий, в том числе и противочумных учреждений, проводящих лабора-



Порядок взаимодействия учреждений, осуществляющих диагностические исследования инфекционных болезней в соответствии с приказом Роспотребнадзора от 17.03.08 № 88 «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней»

торную диагностику особо опасных инфекционных болезней;

- совершенствование системы внешнего контроля качества лабораторных исследований, проводимых с материалом, подозрительным на наличие возбудителей особо опасных инфекционных болезней;

- подготовка квалифицированных кадров по вопросам диагностики, эпидемиологии и профилактики особо опасных инфекционных болезней.

Одна из первоочередных задач, которую необходимо решить, – это обеспечение лабораторной диагностики препаратами, отвечающими современным требованиям и основанными на использовании новых технологий и методических подходов.

В соответствии с решениями Ученого совета Роспотребнадзора (протокол № 6 от 19.10.2007 и протокол № 7 от 22.11.2007) проведен анализ обеспеченности препаратами для лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней (табл. 1), который выявил ряд проблем в этой области.

Согласно действующим в Российской Федерации нормативно-методическим документам [12, 13], регистрации подлежат все изделия медицинского назначения, в том числе и диагностические препараты. Документом, подтверждающим факт регистрации изделия медицинского назначения, является регистрационное удостоверение. Использование фармакопейной статьи предприятия, регламентов производства, методических указаний и рекомендаций в

качестве нормативных регистрационных документов неправомерно.

Кроме того, препараты и тест-системы для диагностики инфекционных болезней, используемые на территории Российской Федерации, подлежат обязательной сертификации. Сертификацию МИБП, производимых предприятиями России, организует ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича Роспотребнадзора согласно методическим указаниям МУ 3.3.2.684-98 «Сертификация медицинских иммунобиологических препаратов» [5]. Процедура сертификации иммунобиологического препарата осуществляется после регистрации его в качестве изделия медицинского назначения.

В настоящее время в Российской Федерации зарегистрирована только часть препаратов, необходимых для лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней. В основном это тест-системы и диагностикумы для выявления возбудителей особо опасных бактериальных инфекций (чумы, сибирской язвы, холеры, бруцеллеза). Практически полностью отсутствуют зарегистрированные препараты для индикации и идентификации особо опасных вирусов, возбудителей сапа, мелиоидоза, глубоких микозов.

Решение существующей на сегодняшний день задачи по обеспечению лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней зарегистрированными препаратами заложено в реализации федеральной целевой программы «Национальная

Таблица 1

**Обеспеченность лабораторной диагностики
особо опасных инфекционных болезней
зарегистрированными препаратами**

Метод/нозоология	МФА	ИФА	ПЦР
Чума	+	+/-	+
Холера	+	-	+
Бруцеллез	+	+/-	+
Сибирская язва	+	+/-	+
Туляремия	+	+/-	+/-
Сап	+/-	+/-	+/-
Мелиоидоз	+/-	+/-	+/-
Натуральная оспа	+/-	+/-	
Тяжелый острый респираторный синдром (ТОРС)	-	+/-	+/-
Грипп птиц H5N1	+	+/-	+
Лихорадка Марбург	-	+/-	+/-
Лихорадка Эбола	-	+/-	+/-
Лихорадка Ласса	-	+/-	+/-
Боливи́йская геморрагическая лихорадка	-	+/-	-
Аргентинская геморрагическая лихорадка	-	-	-
Желтая лихорадка	-	+/-	-
Лихорадка Денге	-	+/-	-
Лихорадка долины Рифт	-	-	+/-
Лихорадка Западного Нила	-	+/-	+/-
Крымская геморрагическая лихорадка	-	+/-	+/-

Примечания: «+» – зарегистрированный препарат, «+/-» – экспериментальные серии, «-» – отсутствие препаратов.

система химической и биологической безопасности Российской Федерации» (2009–2013 гг.) [18]. В ходе ее выполнения будут разработаны и внедрены в практику современные средства диагностики (в том числе ПЦР-тест-системы с учетом результатов в режиме реального времени, биочипы, иммунохроматографические тест-системы и др.), что позволит обеспечить лабораторную диагностику особо опасных инфекционных болезней бактериальной и вирусной природы зарегистрированными препаратами на 80–100 %.

Помимо разработки новых диагностических препаратов, необходимо решение вопросов о поэтапной разработке и регистрации МИБП [17], а также внедрении в практику и производство уже разработанных тест-систем, диагностикумов, питательных сред и т.д. Представляется целесообразным централизованное размещение производства препаратов для диагностики особо опасных инфекционных болезней на базе учреждений, имеющих адекватные биотехнологические возможности, например, таких как государственные научные центры – ФГУН ГНЦ ПМБ (производство препаратов для диагностики бактериальных инфекций) и ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» (производство препаратов для диагностики вирусных инфекций).

В настоящее время лабораторная диагностика особо опасных инфекционных болезней осуществляется с использованием микробиологических, иммуносерологических и молекулярно-генетических методов. Дальнейшее совершенствование диагностических методов связано с повышением их чувствительности, специфичности и экспрессности. Широкое распространение получила автоматизация микробиологических исследований: при идентификации микроорганизмов, определении чувствительности/резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам, количественном определении микроорганизмов в исследуемом материале и др. Весьма актуально и внедрение в лабораторную диагностику особо опасных инфекций микрообъемных технологий, применение которых сокращает время идентификации выделенных культур до 4–5 ч.

Повышение чувствительности иммунодиагностических методов (иммуноферментного и иммунофлуоресцентного) связано с поиском альтернативных флуоресцентных меток, таких как фосфоресцентные хелатные комплексы редкоземельных металлов и люминесцирующие наноматериалы («квантовые точки»).

В настоящее время активно внедряются в практику средства диагностики, разработанные на основе микро- и нанотехнологий. Развитие этих технологий привело к созданию биосенсоров, биологических микро- и наночипов, обладающих высокой избирательностью, чувствительностью (до единичных клеток и молекул), скоростью выдачи ответа в течение нескольких минут и предназначенных для одновременного выявления целого ряда патогенных микроорганизмов и специфических антител к ним, быстрой дифференциальной диагностики особо опасных инфекционных болезней [10].

Дальнейшее совершенствование молекулярно-генетических методов связано с внедрением в практику ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени (real time PCR), с учетом результатов анализа по окончании ПЦР (end point PCR – «по конечной точке») и гибридизационно-ферментного (флуоресцентного) анализа (ГиФА), обеспечивающих повышение производительности, специфичности реакции, сокращение сроков анализа до 1 ч, исключение этапа электрофореза и снижение риска ДНК-контаминации. Одно из направлений модернизации ПЦР-анализа включает внедрение тест-систем на основе «сухих» реагентов, более стабильных при длительном хранении, что способствует стандартизации процедуры детекции и снижению себестоимости анализа. ПЦР-тест-системы, разработанные на основе вышеуказанных методических подходов, перспективны для использования как в стационарных, так и в мобильных лабораториях, в том числе в лабораториях СПЭБ.

Еще одно направление развития молекулярно-генетических методов диагностики особо опасных инфекционных болезней связано с конструированием

ем тест-систем для проведения комплексного многофакторного анализа, позволяющего одновременно получить данные о таксономическом положении микроорганизмов, провести внутривидовую дифференциацию, установить штаммовые различия, определить признаки эпидемической значимости. Реализацию такого подхода обеспечивает разработка мультиплексных тест-систем для ПЦР-анализа, а дальнейшее их совершенствование – конструирование и внедрение в практику ДНК-чипов, позволяющих выявлять и идентифицировать до 100 видов патогенных агентов [10].

Не менее важным является разработка систем молекулярного типирования возбудителей особо опасных инфекционных болезней на межвидовом, внутривидовом и межштаммовом уровне с учетом эпидемиологической значимости, географической и иной приуроченности. Для выполнения такого анализа наиболее перспективно использование методов, основанных на генамплификационных, рестрикционных и секвенационных технологиях, в частности: мультилокусный анализ числа tandemных повторов (MLVA), определение полиморфизма длины рестрикционных или амплифицированных фрагментов (RFLP или AFLP соответственно), определение полиморфизма единичных нуклеотидов (SNP) с помощью рестрикционного анализа и секвенирования, мультилокусное секвенирование (MLST). Данные, полученные отечественными и зарубежными авторами за последние несколько лет, подтвердили эффективность применения обозначенных выше подходов для молекулярного типирования штаммов возбудителей чумы, туляремии, сибирской язвы, холеры, бруцеллеза и др. [1, 19, 20, 21].

Определяющим фактором успешного внедрения в лабораторную практику современных технологий является совершенствование нормативно-методической базы, регламентирующей стандартность отдельных методов, схем исследования в целом, а также взаимодействие лабораторий, осуществляющих лабораторную диагностику особо опасных инфекционных болезней. В настоящее время требуют разработки и внедрения в практику стандарты диагностической деятельности, которые должны нормативно закрепить объем и сроки исследований, используемые методы и диагностические препараты, порядок проведения анализа в лабораториях различного уровня, с целью исключения дублирования отдельных этапов и сокращения объемов. Основанием для разработки стандартов являются принципы, положенные в основу организации лабораторной службы Роспотребнадзора и регламентированные приказом Роспотребнадзора от 17.03. 08. № 88 [15].

Лаборатории территориального уровня (ФГУЗ «ЦГиЭ» и их филиалов, ЛПУ) должны выполнять исследования по индикации возбудителей особо опасных инфекционных болезней (кроме чумы и КВГЛ) и использовать для этого только зарегистрированные препараты.

Лаборатории регионального уровня (Региональные центры по мониторингу за возбудителями I–II и II–IV групп патогенности, Центры индикации и идентификации возбудителей инфекционных и паразитарных болезней) должны осуществлять индикацию и идентификацию возбудителей инфекционных болезней (в том числе неизвестных), используя при этом зарегистрированные диагностические препараты и подтверждающие тесты.

Лаборатории федерального уровня (Референс-центры, в том числе с функциями в рамках ММСП (2005 г.), Национальные Центры верификации диагностической деятельности) должны проводить расширенную идентификацию и молекулярное типирование возбудителей. В ходе исследования, наряду с зарегистрированными диагностическими препаратами, возможно применение и экспериментальных серий. При этом лаборатории Национальных Центров верификации диагностической деятельности при подтверждении результатов идентификации, проведенной в лабораториях регионального уровня, должны использовать верификационные тесты.

Современное состояние вопросов по организации и проведению лабораторной диагностики инфекционных болезней нашло отражение в практическом руководстве «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней» (утверждено Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 12.12.07).

Еще один аспект совершенствования лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней – это стандартизация и гармонизация лабораторных исследований в соответствии с международными требованиями, в том числе и с ММСП (2005 г.). В мировой практике достоверными признаются только результаты лабораторных исследований, которые получены в лабораториях, соответствующих требованиям международных стандартов: Международной организации по стандартизации (ИСО) и Международной электротехнической комиссии (МЭК). В частности, лаборатория должна соответствовать общим требованиям, установленным в стандарте ИСО/МЭК 17025 (ГОСТ Р ИСО/МЭК 17025) «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий», что подтверждается при аккредитации лаборатории [3].

Необходимость аккредитации лабораторий, проводящих диагностические исследования особо опасных инфекционных болезней, в том числе и лабораторий противочумных учреждений обусловлена:

- этапностью лабораторной диагностики, осуществляемой в лабораториях различного уровня (территориального, регионального и федерального);
- взаимодействием различных лабораторий (зарубежных и входящих в лабораторную систему страны) при проведении санитарно-противоэпидемических мероприятий, направленных на санитарную охрану территории Российской Федерации. При выполнении поставленных задач необходимо,

чтобы результаты были получены лабораториями, соответствующими требованиям единого стандарта. В связи с этим приоритетной является задача по аккредитации лабораторий СПЭБ, т.к. возможно их функционирование не только в регионах Российской Федерации, но и на международном уровне, в том числе в рамках деятельности ВОЗ [8].

Одно из требований, установленное в стандарте ИСО/МЭК 17025, – это контроль качества лабораторных исследований. В мировой практике широко внедрены системы внешней оценки качества, основной целью которых является обеспечение сравнимости результатов исследований, полученных в разных лабораториях. Начиная с 1995 г. в нашей стране действует Федеральная система внешней оценки качества (ФСВОК) клинических лабораторных исследований, выполняемых в клиничко-диагностических лабораториях. Деятельность ФСВОК охватывает различные виды клиничко-лабораторных исследований [4], однако она не распространяется на лаборатории, осуществляющие диагностические исследования на особо опасные инфекционные болезни, возбудители которых относятся I–II группам патогенности. В связи с этим необходима организация системы внешнего контроля качества (ВКК) лабораторных исследований материала, подозрительного на зараженность возбудителями I–II групп патогенности.

Это обусловлено рядом факторов:

- использование, в ряде случаев, при лабораторной диагностике незарегистрированных диагностических препаратов;
- отсутствие зарегистрированных контрольных материалов для проверки качества лабораторных исследований;
- отсутствие утвержденных нормативных документов по контролю качества исследований, направленных на выявление и идентификацию возбудителей I–II групп патогенности.

Структура системы ВКК должна включать: Центры по ВКК лабораторных исследований материала, подозрительного на зараженность возбудителями I–II групп патогенности; Референс-центры по ВКК; Региональные центры по ВКК.

Головными учреждениями в системе ВКК лабораторных исследований материала, подозрительного на зараженность возбудителями I–II групп патогенности, являются Центры по ВКК. Такие Центры должны быть организованы на базе Национальных центров верификации диагностической деятельности – ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» и ФГУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Референс-центры по ВКК – это учреждения, которые должны осуществлять нормативно-методическое обеспечение мероприятий по ВКК и участвовать совместно с Центром по ВКК в разработке контрольных материалов. Функции Референс-центров по ВКК необходимо возложить на Референс-центры по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней I–II групп патогенности.

Региональные центры по ВКК – это учреждения, которые должны организовывать проведение ВКК, их функционирование должно быть организовано на базе Региональных центров по мониторингу за возбудителями I–II и II–IV групп патогенности.

Участие лабораторий ФГУЗ «ЦГиЭ», их филиалов и противочумных учреждений, в том числе лабораторий СПЭБ, в системе ВКК позволит повысить достоверность результатов лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней.

Развитие системы лабораторной диагностики требует решения вопросов, связанных с обеспеченностью и подготовкой кадров учреждений Роспотребнадзора. Так, в 2007 г. в микробиологических лабораториях, включая 69 лабораторий особо опасных инфекций ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах Российской Федерации, исследования проводили 3452 специалиста с высшим образованием и 7119 специалистов со средним специальным образованием; в 2005 г. соответственно – 3773 и 7832 человек (табл. 2). Общее количество указанных специалистов уменьшилось за 2 года на 7,2 %, прежде всего за счет врачей-бактериологов бактериологических лабораторий (сокращение на 9,6 %).

Эффективность кадровой политики зависит от уровня профессиональной подготовки специалистов. Следует обеспечить своевременное прохождение ими курсов первичной специализации и усовершенствования врачей-бактериологов по особо опасным инфекциям на базе противочумных учреждений. Необходим пересмотр учебных программ с целью включения в них данных, касающихся новых, современных методов лабораторной диагностики.

Поставленные на сегодняшний день задачи по модернизации и развитию в целом системы лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней в Российской Федерации должны быть решены в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)», концепция которой предусматривает в части, касающейся обеспечения лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней [18]:

- укрепление материально-технической базы учреждений, осуществляющих контроль и монито-

Таблица 2

Количество специалистов с высшим образованием в лабораториях ЦГиЭ

Наименование лабораторий (подразделения)	Количество специалистов		
	2005 г.	2007 г.	Динамика в сравнении с 2005 г., %
Бактериологическая	3161	2856	- 9,6
Особо опасных инфекций	159	162	+1,9
Вирусологическая	228	253	+ 11,0
Паразитологическая	175	185	+ 5,7
Всего	3723	3456	- 7,2

ринг в области обеспечения биологической безопасности в Российской Федерации, включая Центры индикации и диагностики, действующие на базе учреждений Роспотребнадзора в федеральных округах Российской Федерации;

- развитие научных основ и разработка единых научно-методических подходов в области обеспечения биологической безопасности, в том числе при мониторинге и лабораторной диагностике особо опасных инфекционных болезней;

- разработка методов и средств индикации и идентификации возбудителей инфекционных болезней;

- подготовка специалистов по различным направлениям деятельности в области обеспечения биологической безопасности, в том числе высшей квалификации.

Таким образом, комплексный подход к развитию лабораторной диагностики, включающий практическое внедрение диагностических препаратов, основанных на передовых инновационных технологиях, стандартизацию методов и контроль качества выполняемых исследований, аккредитацию учреждений и подготовку кадров, позволит обеспечить совершенствование санитарной охраны территории Российской Федерации, адекватное современным рискам и угрозам международного значения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Павлович Н.В., Мишанькин Б.Н. Мультилокусное VNTR-типирование штаммов *Francisella tularensis*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2004; 2:21–5.
2. Кутырев В.В. Актуальные проблемы особо опасных инфекционных болезней и санитарная охрана территории в современных условиях. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2008; 1:17–23.
3. Лабораторное дело и аккредитация лабораторий государственной санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации. Вып. 2. М.: Издатель НЦЗД РАМН; 2003. 168 с.
4. Малахов В.Н., Меньшиков В.В., Заикин Е.В. и др. Федеральная система внешней оценки качества клинических лабораторных исследований. В кн.: Меньшиков В.В., редактор. Качество клинических лабораторных исследований. М.; 2002. С. 123–62.
5. Методические указания МУ 3.3.2.684-98 «Сертификация медицинских иммунобиологических препаратов» (утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 09.01.1998 г.).
6. Онищенко Г.Г. Борьба с инфекционными болезнями – приоритетная тема председательства Российской Федерации на саммите «Группы восьми» в 2006 г. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2006; 7:3–7.
7. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Кривуля С.Д. и др. О реализации инициатив саммита «Группы восьми» в Санкт-Петербурге (15–17 июля 2006 г.) в области борьбы с инфекционными болезнями и Международных медико-санитарных правил (2005 г.) при осуществлении санитарной охраны территорий государств-участников Содружества независимых Государств. В кн.: Матер. VIII Межгос. научно-практич. конф. государств-участников СНГ; 25–26 сентября 2007 г.; Саратов. Саратов; 2007. С. 9–12.
8. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Топорков А.В. и др. Специализированные противозидемические бригады (СПЭБ): опыт работы и тактика применения в современных условиях. Probl. особо опасных инф. 2008; 4(98):5–14.
9. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Топорков В.П. и др. Реализация глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями и применение современных технологий в государствах участниках СНГ. В кн.: Матер. IX Межгос. научно-практич. конф. государств-участников СНГ; 30 сентября – 2 октября, 2008 г.; Волгоград. Волгоград; 2008. С. 9–12.
10. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Уткин Д.В. Перспективы применения нанотехнологий и наноматериалов в диагностике, профилактике и лечении особо опасных инфекционных болезней. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2008;

6:93–7.

11. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации № 27 от 11.05.2007 «О введении в действие Международных медико-санитарных правил (2005 г.)» (зарегистрировано Министерством Юстиции Российской Федерации № 9575 31 мая 2007 г.).

12. Приказ Минздравсоцразвития России № 735 от 30.10.2006 г. «Об утверждении административного регламента Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития по исполнению государственной функции по регистрации изделий медицинского назначения».

13. Приказ Росздравнадзора № 2690-Пр/06 «Об аннулировании приказа Росздравнадзора № 1711-Пр/06 от 28.07.2006 г. «О порядке государственной регистрации наборов реагентов для диагностики *in vitro* и сред микробиологических в качестве изделий медицинского назначения».

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

15. Приказ Роспотребнадзора от 17.03.08. № 88 «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней».

16. Приказ Роспотребнадзора от 08.05.2008 № 152 «О совершенствовании организации и проведения мероприятий по профилактике чумы».

17. Приказ Роспотребнадзора от 08.05.2008 № 1118 «О ходе реализации распоряжения Правительства Российской Федерации от 21 мая 2007 г. № 642-р».

18. Распоряжение правительства Российской Федерации от 28 января 2008 г. № 74-р «Об утверждении Концепции федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

19. Цыганкова О.И., Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Цыганкова Е.А. Перспективы применения генотипирования *Bacillus anthracis* в эпидемиологическом анализе. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2006; 1:24–8.

20. Keim P., Price L.B., Klevytska A.M. et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. J. Bacteriol. 2000; 182(10):2928–36.

21. Johansson A., Forsman M., Sjostedt A. The development of tools for diagnosis of tularemia and typing of *Francisella tularensis*. APMIS. 2004; 112(11–12):898–907.

Об авторах:

Онищенко Г.Г., Кузькин Б.П., Пакскина Н.Д. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Москва.

Кутырев В.В., Щербакова С.А., Топорков А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. Тел.: (845-2) 73-46-48. E-mail: microbe@san.ru

G.G.Onischenko, B.P.Kouzkin, V.V.Kutyrev, S.A.Scherbakova,
N.D.Pakskina, A.V.Toporkov

Current Trends of Perfection of Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases

Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow; Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Considered in the article are current trends of perfection of laboratory diagnostics of particularly dangerous infectious diseases. They are as follows: development and practical introduction of laboratory diagnostics methods based on the modern diagnostic techniques, standardization of the laboratory investigations, accreditation of the laboratories carrying out laboratory diagnostics of particularly dangerous infectious diseases, perfection of the system of external control of the laboratory investigations quality, staff training.

Key words: laboratory diagnostics, particularly dangerous infectious diseases, diagnostic preparations, quality control, accreditation.

Authors:

Onischenko G.G., Kouzkin B.P., Pakskina N.D. Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare. Moscow.

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

Поступила 05.02.09.

Н.В.Попов¹, В.Е.Безсмертный², В.П.Топорков¹, С.М.Иванова², В.П.Попов², А.И.Удовиков¹,
Л.Д.Шилова¹, В.В.Кутырев¹

ПРОГНОЗ ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЧУМЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ НА 2009 г.

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

²Противочумный центр Роспотребнадзора, Москва

Обоснован краткосрочный прогноз эпизоотической активности 11 природных очагов чумы Российской Федерации на 2009 г. Проведен анализ состояния численности основных носителей и переносчиков чумы в природных очагах различного типа. Определены современные тенденции динамики эпизоотической активности природных очагов чумы различной биоценотической структуры.

Ключевые слова: природные очаги чумы Российской Федерации, эпизоотическая активность, показатели численности носителей и переносчиков чумы, краткосрочный прогноз.

В соответствии с краткосрочным прогнозом¹⁾ в 2008 г. эпизоотии чумы выявлены на территории Алтайского горного (72 культуры), Тувинского горного (62), Восточно-Кавказского высокогорного (23) природных очагов. На территории Центрально-Кавказского высокогорного природного очага развитие локальных эпизоотий чумы подтверждено результатами иммунодиагностических исследований. Общая площадь эпизоотий в 2008 г. составила 1096 кв.км (в 2007 г. – 1160,75 кв.км). В 2008 г. от грызунов и их эктопаразитов изолировано 157 культур чумного микроба (в 2007 г. – 102 культуры). При исследовании полевых материалов иммунологическими методами получено 58 положительных на чуму результатов (в 2007 г. – 199). Прогноз эпизоотической активности природных очагов чумы Российской Федерации на 2008 г. оправдался полностью. В частности, отмечено сохранение межэпизоотических периодов в равнинных, предгорных и низкогорных природных очагах чумы – Прикаспийском Северо-Западном степном, Волго-Уральском степном, Забайкальском степном, Волго-Уральском песчаном, Прикаспийском песчаном, Дагестанском равнинно-предгорном, Терско-Сунженском низкогорном. После перерыва с 2000 г. произошла активизация Восточно-Кавказского высокогорного природного очага чумы. Отмечено снижение эпизоотической активности Центрально-Кавказского высокогорного и Тувинского горного природных очагов чумы. Алтайский горный природный очаг чумы сохранил высокую эпизоотическую активность.

Аномальные погодные условия 2008 г. предопределили сохранение низкой численности носителей и переносчиков возбудителя чумы и эпизоотической активности равнинных и низкогорных

природных очагов этой инфекции сусликового и песчаночьевого типов. Вследствие негативного влияния климатических факторов сохранилась тенденция сокращения численности горного суслика в Центрально-Кавказском высокогорном и длиннохвостого суслика в Тувинском горном природных очагах чумы. В Восточно-Кавказском высокогорном природном очаге чумы в горной зоне произошел резкий спад численности обыкновенной полевки и ее блох. В границах энзоотичной по чуме территории сохранение высокой фоновой численности носителей (монгольской пищухи) отмечено только на территории Алтайского горного природного очага чумы. Все это в целом послужило основанием для прогноза (на фоне сохранения тенденции снижения численности носителей) на развитие в 2009 г. локальных эпизоотий чумы только на территории горных и высокогорных природных очагов этой инфекции.

Общая характеристика эпизоотического состояния 11 природных очагов чумы РФ в 2008 г. и прогноз их активности на 2009 г. представлены ниже.

Природные очаги чумы сусликового типа

Центрально-Кавказский высокогорный природный очаг чумы (01). В 2008 г. зараженные чумой животные в очаге не обнаружены (в 2007 г. выделено 10 штаммов чумного микроба на площади 4,5 кв.км). При исследовании 1494 экз. грызунов иммунодиагностическими методами (в системе РПГА-РНАГ) получен 31 положительный результат, из них 27 в РПГА. Переболевшие чумой горные суслики с низкими титрами антител к чумному микробу зарегистрированы в 7 секторах. В границах эпизоотических участков 2007 г. отловлены зверьки с титрами антител к чумному микробу от 1:20 до 1:320 (ур. Перк) и от 1:20 до 1:1280 (ур. Автодром).

На территории очага сохраняется тенденция сокращения площадей, заселенных горными сусликами. Фоновая численность зверьков в 2008 г. не превышала 19,3 экз. на 1 га, что несколько ниже

¹⁾ Попов Н.В., Безсмертный В.Е., Новиков Н.Л., Удовиков А.И., Кузнецов А.А., Попов В.П., Шилова Л.Д., Кутырев В.В. Прогноз эпизоотической активности природных очагов чумы Российской Федерации на 2008 г. Пробл. особо опасных инф. 2008; 1(95):13–17.

ее среднемноголетнего уровня. Наиболее заметное снижение численности горных сусликов (до 17,5 экз. на 1 га) отмечено на территории Баксано-Черекского ландшафтно-эпизоотологического района, который характеризуется относительно высокой сухостью климата. Показатели численности блох вида *Citellophilus tesquorum* в поясе горных степей остались на уровне 2007 г., на альпийских участках Верхне-Кубанского и Малко-Баксанского ландшафтно-эпизоотологических районов значительно возросли. Напротив, в зоне субальпийских лугов, за исключением территории Малко-Баксанского ландшафтно-эпизоотологического района, произошло значительное снижение численности этого основного здесь переносчика чумного микроба. В открытых стациях сохраняется низкий уровень численности мышевидных грызунов – 4,2 %, в населенных пунктах численность зверьков возросла до 4–11,0 % попадания в орудия лова. На участках, освободившихся от поселений горного суслика, происходит расселение обыкновенной полевки, численность которой составляет 5,5 % попадания в орудия лова. В 2009 г. прогнозируется сохранение численности горного суслика на уровне ниже среднемноголетних значений. Индексы обилия блох вида *Cit. tesquorum*, за исключением альпийской зоны Верхне-Кубанского ландшафтно-эпизоотологического района, снизятся. Ожидается сохранение низкой эпизоотической активности очага, возможны единичные находки зараженных чумой грызунов и блох.

Терско-Сунженский низкогорный природный очаг чумы (02). С 1992 г. регулярное эпизоотологическое обследование очаговой территории не проводится. В 2000 г. выявлена эпизоотия чумы среди малых сусликов в Малгобекском районе Республики Ингушетия (выделено 3 штамма чумного микроба). В последующем, вплоть до настоящего времени, территория очага не обследовалась. В 2009 г. обнаружение зараженных чумой животных маловероятно.

Дагестанский равнинно-предгорный очаг чумы (03). Последняя эпизоотия выявлена в 2003 г. на территории Бабаюртовского района Республики Дагестан (выделено 3 штамма чумного микроба). В 2006–2007 гг. отмечены находки переболевших чумой грызунов. В 2008 г. возбудитель чумы в очаге не выделен. На большей части территории очага, за исключением предгорной зоны, сохраняется низкая фоновая численность грызунов и эктопаразитов. В равнинной части очага средние показатели плотности малого суслика возросли до 1,3 экз. на 1 га; численность блох малого суслика, по сравнению с прошлым годом, снизилась с 14,0 до 3,0 при среднемноголетних значениях – 18,0 экз. на 1 га. В предгорьях сохранилась тенденция роста численности малого суслика, плотность которого достигла 13,9 экз. на 1 га (2007 г. – 10,6 экз. на 1 га). В весенний период численность блох малого суслика возросла здесь с 276,0 до 349,0 экз. на 1 га, что более чем в 2 раза превышает среднемноголетнюю норму в 156,0 экз.

на 1 га. Летом численность блох увеличилась до 570,0 экз. на 1 га.

Популяции гребенщиковой песчанки продолжают оставаться в состоянии депрессии. В Аграханских песках средние показатели плотности зверьков снизились в весенний период до 3,3 экз. на 1 га, что значительно ниже среднемноголетних значений (6,4 экз. на 1 га). Фоновая численность зверьков к осени сократилась до 2,2 экз. на 1 га. Численность блох *Nosopsyllus laeviceps* весной составляла 17,0; осенью – 1,3 экз. на 1 га, что значительно ниже среднемноголетних значений для весеннего (23,5 экз. на 1 га) и осеннего (17,0 экз. на 1 га) периодов.

Численность мышевидных грызунов в весенний период как в предгорной, так и в равнинной части очага составляла 0,2 % попадания в орудия лова. В осенний период произошел значительный подъем численности мышевидных грызунов. В предгорной зоне средний процент попадания возрос до 4,6 % (осенью 2007 г. – 2,2 %), в равнинной зоне – до 5,8 % (2007 г. – 2,5) попадания в орудия лова. В 2009 г. в равнинной части очага сохранится низкая фоновая численность носителей и переносчиков чумы. Развитие локальных эпизоотий маловероятно.

Прикаспийский Северо-Западный степной природный очаг (14). С 1991 г. очаг находится в состоянии межэпизоотического периода. В 2008 г. возбудитель чумы в очаге не выделен. На территории очага сохраняется депрессия численности носителей и переносчиков чумы. Общая фоновая численность малого суслика в центральных и западных районах очага не превышает 5,0 экз. на 1 га. На западных склонах Ергенинской возвышенности отмечена тенденция роста численности малых сусликов. На территории Черных земель показатели малого суслика достигают 10–15 экз. на 1 га, севернее, на территории низменно-солонцеватых степей, – 7,1 экз. на 1 га. Индексы обилия блох на малом суслике составляли: на Северных Ергенях в мае 0,6, на Центральных Ергенях в апреле 1,1, на южных Ергенях в апреле 1,4, в ложине Даван в мае 2,5. На Черных землях и в низменно-солонцеватых степях индексы обилия блох этого грызуна возросли, соответственно, до 1,7 и 2,8. Показатели численности гребенщиковой песчанки на Черных землях и на территории низменно-солонцеватых степей составляли, соответственно, весной 2,0–2,1 %, осенью – 1,3–0,3 % попадания в орудия лова

На Ергенинской возвышенности численность мышевидных грызунов в открытых биотопах весной составляла 0,9–2,9 % попадания в орудия лова. В осенний период численность мышевидных грызунов возросла на Южных Ергенях до 15,3 %; на Северных Ергенях не превышала 5,0 % попадания в орудия лова. В Сарпинской низменности и ложине Даван численность мышевидных грызунов в открытых биотопах составляла весной, соответственно, 2,9 и 1,9 % попадания в орудия лова; осенью – 2,6 и 5,0 %. На Черных землях и на территории низменно-

солонцеватых степей численность мышевидных грызунов не превышала весной 4,6 %, осенью снизилась до 3,5 % попадания в орудия лова. В населенных пунктах наиболее высокий уровень численности мышевидных грызунов зарегистрирован на Черных землях – 7,3 % попадания в орудия лова. На остальной части очага показатели численности мышевидных грызунов не превышала весной 1,6–3,2 %, осенью – 1,2–4,0 % попадания в орудия лова. В 2009 г. на территории очага сохраняется низкий уровень численности малого суслика и его блох. Ожидается повышение численности мышевидных грызунов в открытых стациях. Развитие локальных эпизоотий маловероятно.

Волго-Уральский степной природный очаг чумы (15). На территории Российской Федерации по восточной границе очага последние эпизоотии чумы выявлены в 1975 г. в Харабалинском районе Астраханской области (ур. Тугай-Худук) в смешанных поселениях малых сусликов и песчанок. В 2008 г. возбудитель чумы в очаге не выделен. Популяция малого суслика находится в глубокой депрессии. Средняя численность составила 3,7 экз. на 1 га. В весенний период массового выхода сеголеток на поверхность средняя численность зверьков не превышала 5,4 экз. на 1 га. Индексы обилия блох на малом суслике достигали в марте 4,7, в апреле – 3,7, в мае–июне – не превышали 1,0. На всей территории очага сохраняется низкий общий запас блох на 1 га.

В степных биотопах показатели численности мышевидных грызунов в осенний период не превышали в среднем 13,3 % попадания в орудия лова. В пойменных биотопах уровень численности мышевидных грызунов достигал весной 24,0 %, осенью – 27,2 % попадания в орудия лова. В населенных пунктах отмечен низкий уровень численности мышевидных грызунов – 0,6–4,2 % попадания в орудия лова. В 2009 г. на территории очага сохраняется низкий уровень численности малого суслика и его блох, развитие локальных эпизоотий чумы маловероятно.

Тувинский горный природный очаг чумы (37). В 2008 г. эпизоотии чумы были зарегистрированы в Монгун-Тайгинском и Овюрском районах Республики Тыва на площади 457 кв.км. Выявлены новые эпизоотические участки в бассейне р. Чоза и правого притока р. Барлык. Всего выделено 62 культуры чумного микроба, в том числе от длиннохвостого суслика 19 культур, блох *Cit. tesquorum* – 25, *Oropsylla alaskensis* – 3, *Rhadinopsylla li transbaikalia* – 6, *Neopsylla mana* – 1, вшей даурского суслика *Neohaematopinus laevisculus* – 6, клещей *Dermacentor nuttalli* – 1, гамма-клещей – 1. Зараженность зверьков по всем пробам составила 5,8 %.

Показатели численности длиннохвостого суслика, по сравнению с 2007 г., повсеместно снизились. Средние показатели плотности зверьков весной составляли 2,7 экз. на 1 га (2007 г. – 6,1 экз. на 1 га). В Саглинском мезоочаге плотность длиннохвостых сусликов составила 3,1 экз. на 1 га, в

Монгун-Тайгинском – 2,7 экз. на 1 га. Численность тарбагана на большей части Монгун-Тайгинского и Саглинского мезоочагов низкая или очень низкая. Показатели численности блох длиннохвостого суслика, по сравнению с 2007 г., значительно возросли. Средний индекс обилия блох на сусликах достигал 4,25, во входах нор – 0,63. Показатели плотности тарбагана колебались от 0,5 до 0,81 жилого бутана на 1 га. В тоже время на Каргинском участке зарегистрированы его локальные поселения с плотностью 2,7 жилого бутана на 1 га. Во входах нор тарбагана индексы обилия блох достигали 0,7, с преобладанием блох вида *Cit. tesquorum*. Численность монгольской пищухи находится в стадии глубокой депрессии. В 2008 г. отмечено заметное снижение численности даурской пищухи на большей части очаговой территории. В Монгун-Тайгинском мезоочаге средний показатель плотности жилых колоний зверьков на 1 га составил 3,0 (в 2007 г. – 4,5), в Саглинском мезоочаге – 2,9 (в 2007 г. – 7,2). Индексы обилия блох на даурской пищухи на различных участках колебались от 1,3 до 4,27. Фоновым видом в открытых стациях является плоскочерепная полевка, численность которой относительно низкая. В 2009 г. прогнозируется дальнейшее сокращение численности длиннохвостого суслика и эпизоотической активности очага.

Забайкальский степной природный очаг чумы (38). С 1971 г. очаг находится в состоянии межэпизоотического периода. В 2008 г. возбудитель чумы в очаге не выделен. На территории очага сохраняется низкий уровень численности носителей и переносчиков чумы. Поселения монгольского сурка с плотностью до 1,0–1,5 жилых бутанов на 1 га сохранились в основном вдоль границы с Китаем и Монголией, равно как и на других локальных участках, где проводится их охрана. Фоновая численность даурского суслика весной не превышала 0,1–0,7 экз. на 1 га, осенью – 0,3–1,0 экз. на 1 га. В антропогенных биотопах плотности даурского суслика достигали 1,2–1,6 экз. на 1 га. Повсеместно сохранился низкий уровень численности блох даурского суслика.

Популяции даурской пищухи продолжают оставаться в состоянии депрессии. Только в оптимальных местообитаниях плотность зверьков достигает 1,2–1,5 жилых нор на 1 га. На открытых участках степи показатели численности даурской пищухи, даже в осенний период, не превышали 0,4–0,7 жилых нор на 1 га. Показатели численности других фоновых видов грызунов (даурского, джунгарского хомячков, стадной полевки) повсеместно низкие. В 2009 г. на территории очага возможен рост численности даурской пищухи, мышевидных грызунов. Прогнозируется дальнейшее сохранение межэпизоотического периода.

Природные очаги чумы песчаночьего типа

Волго-Уральский песчаный природный очаг чумы (16). В 2008 г. возбудитель чумы не выделен. Последняя эпизоотия выявлена в 2005 г. в Красноярском районе Астраханской области. На тер-

ритории очага сохраняется низкая численность полуденной и гребенщиковой песчанок. Общие показатели численности зверьков составляли весной 2,8 экз. на 1 га, осенью – 3,0 экз. на 1 га. В открытых стациях численность мышевидных грызунов достигала весной 3,4 % попадания в орудия лова, осенью – возросла до 6,0 % попадания в орудия лова. На территории АГКМ показатели численности мышевидных грызунов весной и осенью составляли, соответственно, 4,1 и 9,5 % попадания в орудия лова. В закрытых стациях отмечена низкая численность мышевидных грызунов: весной – 0,9–1,7 %; осенью – 1,0–2,1 % попадания в орудия лова. Численность блох песчанок сохраняется на низком уровне: весной – 29 экз. на 1 га, осенью – 120 экз. на 1 га, при доминировании блохи *Nos. laeviceps*. Индексы обилия блох как в шерсти, так в норах грызунов оставались на уровне прошлых лет. В 2009 г. сохраняется возможность единичных находок зараженных чумой животных.

Прикаспийский песчаный природный очаг чумы (43). Последние находки зараженных чумой животных сделаны в 2006 г. в Лиманском районе Астраханской области. В 2008 г. результаты бактериологических и иммунодиагностических исследований на чуму полевого материала отрицательны.

В северной и центральной части очага, в зоне деятельности Астраханской ПЧС, сохраняется низкая численность песчанок. Показатели численности зверьков на территориях Приволжских песков и Ильменного ландшафтно-эпизоотологического района не превышали весной 1,7–2,7 экз. на 1 га; осенью – 2,7–3,5 экз. на 1 га. На Черных землях и Приморье численность песчанок достигала весной 2,8–3,3 экз. на 1 га; осенью 2,5–3,8 экз. на 1 га. Популяции малого суслика продолжают оставаться в состоянии глубокой депрессии. Численность мышевидных грызунов, за исключением Ильменного ландшафтно-эпизоотологического района (7,5 %), не превышала весной 1,1–2,0 % попадания в орудия лова. К осени их численность, за исключением Приморья (3,6 %), возросла до 6,5–21,0 % попадания в орудия лова. В открытых стациях отмечено доминирование домовых мышей. В закрытых стациях численность грызунов составляла 1,1–2,9 % попадания в орудия лова.

Весенний запас блох мелких песчанок на Черных землях значительно превысил показатели 2007 г. (6 экз. на 1 га) и достиг 202 экз. на 1 га. Увеличение численности блох произошло здесь, в первую очередь, за счет *Xenopsylla conformis*. В других районах численность блох песчанок не превышала уровень 2007 г. К осени запас блох песчанок повсеместно снизился до уровня 2007 г. Отмечена тенденция роста численности блох в сохранившихся поселениях малого суслика.

В западной части очага, в зоне деятельности Элистинской ПЧС, численность мелких песчанок составляла весной 2,4 %, осенью возросла до 7,5 % попадания в орудия лова. В открытых биотопах показатели численности мышевидных грызунов не пре-

вышали весной 1,9 %, осенью – 2,9 % попадания в орудия лова. В закрытых стациях численность грызунов достигала весной 2,5 %, осенью снизилась до 2,0 % попадания в орудия лова. Фоновая численность малого суслика не превышала 5 экз. на 1 га. Сохранился низкий уровень численности блох песчанок, малых сусликов, мышевидных грызунов.

В южной части очага, в зоне деятельности Дагестанской ПЧС, популяции песчанок продолжают оставаться в состоянии депрессии. В Терско-Кумском междуречье показатели численности зверьков, по сравнению с 2007 г., весной снизились до 0,7 экз. на 1 га. Средняя плотность песчанок от весны к осени составила 0,9 зверьков на 1 га (среднемноголетняя норма 2,7 экз. на 1 га). Аналогичный спад численности песчанок до 1,3 зверька на 1 га произошел также на территории Кумо-Манычской впадины. От весны к осени численность песчанок возросла до 3,3 экз. на 1 га. Численность блох песчанок *N. laeviceps* остается на низком уровне. В Терско-Кумском междуречье весной показатели численности блох снизилась с 3,0 до 2,1, а осенью с 2,2 до 0,4 экз. на 1 га. В Кумо-Манычском междуречье численность блох снизилась весной с 11,7 до 6,2, а осенью – с 5,5 до 4,6 экз. на 1 га.

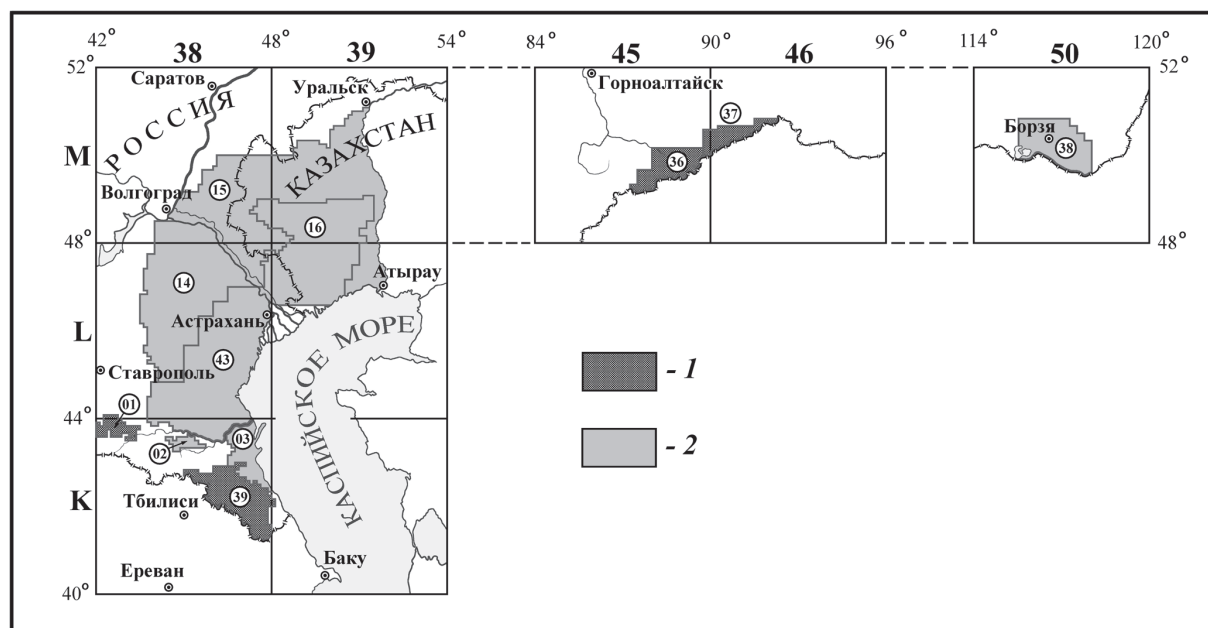
В весенний период в открытых стациях отмечена низкая численность мышевидных грызунов. В осенний период численность мышевидных грызунов на отдельных участках достигала 10,5 % попадания в орудия лова. В 2009 г. на фоне роста численности песчанок и мышевидных грызунов возможны единичные находки зараженных чумой животных.

Природный очаг чумы полевого типа

Восточно-Кавказский высокогорный природный очаг чумы (39).

В 2008 г. на территории Кулинского района Республики Дагестан, после перерыва с 2000 г., выявлена эпизоотия чумы на Кокмадагском участке очага. Общая площадь эпизоотии составила 100 кв.км. В августе и сентябре от блох из гнезд обыкновенной полевки было выделено 23 штамма возбудителя чумы, в том числе от *Ctenophthalmus intermedius* – 11, *Ct. golovi* – 3, *Callopsylla caspia* – 4, *Frontopsylla elata* – 3, *Megabotris turbidus* – 2. В границах эпизоотического участка поселения обыкновенных полевок носят мозаичный характер, а плотность зверьков варьировала в пределах 18 – 56 экз. на 1 га. Индексы обилия блох на обыкновенных полевках составляли в августе 0,8; в гнездах – 8,5. В сентябре показатели численности блох возросли, соответственно, до 2,1 и 27,8.

Средняя плотность обыкновенных полевок в горной зоне, по сравнению с 2007 г. (57,1 экз. на 1 га), снизилась до 9,8 экз. на 1 га. В предгорной зоне отмечена тенденция выхода из состояния депрессии популяций обыкновенной полевки. Средняя плотность зверьков здесь возросла до 11 экз. на 1 га. Численность блох полевок повсеместно снизилась. В горной зоне показатели численности блох весной, по



Природные очаги чумы Российской Федерации, на территории которых в 2009 г. прогнозируется развитие локальных эпизоотий чумы (1) и сохранение межэпизоотического периода (2)

сравнению с 2007 г. (166,0 экз. на 1 га), сократились до 26,0 экз. на 1 га, осенью не превышали 82,0 экз. на 1 га. В предгорной зоне численность блох осенью достигала 75,0 экз. на 1 га, при среднегоголетней норме 161,0 экз. на 1 га. Численность мышевидных грызунов в открытых биотопах составляла 1,7 %, в закрытых – 1,5 % попадания в орудия лова. В 2009 г. сохраняется возможность обнаружения зараженных чумой блох обыкновенных полевков на территории Кокмадагского участка очага.

Природный очаг чумы пищухового типа

Алтайский горный природный очаг чумы (36).

В 2008 г. эпизоотии чумы выявлены на территории Кош-Агачского района Республики Алтай на площади 539 кв.км. Выявлен новый эпизоотический участок на границе с Монгольской Народной Республикой на северном склоне хребта Сайлюгем – Вершина Больших Шибет. Всего выделено 72 культуры чумного микроба в том числе 11 – от монгольских пищух (включая 3 культуры от трупов), 32 – от блох монгольских пищух, 5 – от блох даурских пищух, 20 – от блох из входов нор монгольских пищух, 1 – от блох с плоскочерепных полевков, 1 – от блох из гнезд монгольских пищух. 1 – от блох длиннохвостого суслика, 1 – от блох, снятых с джунгарского хомячка. Зараженность монгольской пищухи по всем пробам на эпизоотических участках колебалась от 1,0 до 4,0 %, зараженность блох – от 0,2 до 1,6 %. При проведении иммунодиагностических исследований грызунов получено 14 положительных результатов. Антитела к Ф1 чумного микроба по видам носителей зарегистрированы: длиннохвостый суслик – 1, монгольская пищуха – 4, плоскочерепная полевка – 5, степной хорь – 1. На наличие капсульного антигена было исследовано 77 погадок хищных птиц и получено 3 положительных результата.

Показатели численности монгольской пищухи превышали среднегоголетний уровень и составляли весной 5,2 жилых нор на 1 га, осенью – 7,1 жилых нор на 1 га. Численность даурской пищухи составляла весной 1,6 жилых нор на 1 га (среднегоголетняя норма 0,7 жилых нор на 1 га); осенью снизилась до – 1,4 жилых нор на 1 га (среднегоголетняя норма 1,5 жилых нор на 1 га). Плотность алтайского сурка не превышала среднегоголетний уровень и составляла весной 0,3–1,1 жилых бутанов на 1 га; осенью – 0,2–0,6 жилых бутанов на 1 га. Показатели численности длиннохвостого суслика достигали весной 2,6 экз. на 1 га; осенью – 2,8 экз. на 1 га, при среднегоголетних значениях 3,3 и 5,5 экз. на 1 га соответственно. Численность плоскочерепной полевки составляла весной 9,1 % попадания в орудия лова; осенью – возросла до 29,7 экз. на 1 га.

Индекс обилия блох на монгольской пищухе составил весной 7,6; входов нор – 0,17. Годовой индекс обилия блох на даурской пищухе, по сравнению с 2007 г. (9,6), снизился до 6,9. Общий индекс обилия блох на плоскочерепной полевке (2,73) сохранился на уровне 2007 г. Индекс обилия блох на длиннохвостом суслике (2,28) несколько превысил среднегоголетний уровень (1,94). В 2009 г. на фоне сохранения высокой численности монгольской пищухи и ее блох прогнозируется развитие эпизоотий чумы в различных частях очага.

Итоговые прогностические данные по природным очагам чумы Российской Федерации, для территорий которых обоснован прогноз на развитие в 2009 г. эпизоотий чумы или сохранение межэпизоотического периода, представлены на рисунке.

Краткосрочный прогноз. В 2009 г. развитие локальных эпизоотий чумы ожидается на территории горных и высокогорных природных очагов –

Тувинского горного, Алтайского горного, Восточно-Кавказского высокогорного. Произойдет дальнейший спад эпизоотической активности Тувинского горного природного очага чумы. В Центрально-Кавказском высокогорном природном очаге чумы возможны единичные находки зараженных чумой животных. В равнинных и низкогорных природных очагах чумы – Прикаспийском Северо-Западном степном, Волго-Уральском степном, Забайкальском степном, Дагестанском равнинно-предгорном, Терско-Сунженском низкогорном, Волго-Уральском и Прикаспийском песчаных природных очагах ожидается сохранение межэпизоотических периодов.

Об авторах:

Попов Н.В., Топорков В.П., Удовиков А.И., Шилова Л.Д., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. Тел.: (845-2) 73-46-48. E-mail: microbe@san.ru

Безсмертный В.Е., Иванова С.М., Попов В.П. Противочумный Центр. Москва.

N.V.Popov, V.E.Bezsmertny, V.P.Toporkov, S.M.Ivanova, V.P.Popov, A.I.Udovikov, L.D.Shilova, V.V.Kutyrev

**Prognostication of Epizootologic Activity
of Plague Natural Foci in the Russian Federation
for 2009**

*Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov;
Plague Control Center of Rospotrebnadzor, Moscow*

A short-term prognosis of plague epizootic activity in 11 natural foci in the Russian Federation for 2009 is substantiated by the authors. The present situation with the numbers of the main carriers and vectors of plague infection in diverse types of natural foci was analyzed. Some modern tendencies were noted in the dynamics of epizootic activity of the natural plague foci varying in their biocenotic structures.

Key words: plague natural foci in the Russian Federation, epizootic activity, plague carriers and vectors abundance indices, short-term prognosis.

Authors:

Popov N.V., Toporkov V.P., Udovikov A.I., Shilova L.D., Kutyrev V.V. Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Bezsmertny V.E., Ivanova S.M., Popov V.P. Plague Control Center of Rospotrebnadzor. Moscow.

Поступила 28.01.09.

С.Т.Жолдошев

**СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИНФОРМАЦИОННО-АНАЛИТИЧЕСКОЙ ПОДСИСТЕМЫ
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА РАСПРОСТРАНЕНИЕМ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ
(АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР)**

*Институт медицинских проблем, Южное отделение НАН Кыргызской Республики,
г. Ош, Кыргызская Республика*

В целях совершенствования эпидемиологического надзора за распространением сибирской язвы, обоснована необходимость разработки единой информационно-аналитической программы, основанной на ГИС-технологии, направленной на создание широкого спектра, эпидемиологических, эпизоотологических прогнозов, позволяющих обосновать современную стратегию мониторинга очаговых территорий.

Ключевые слова: ГИС-технологии, сибирская язва, информационно-аналитическая программа.

Применение математических методов при изучении эпидемий было начато D.Bernoulli в середине XVII в. (1760 г.). Он впервые использовал простейший математический аппарат для оценки эффективности профилактических прививок против натуральной оспы. Вслед за этим последовал значительный перерыв, который завершился работами английского ученого W.Farr (1940 г.). Он изучал и моделировал статистические показатели смертности населения Англии (Уэльса) от эпидемии натуральной оспы в 1837–1839 гг. Этот ученый впервые получил математические модели показателей «движения» эпидемии натуральной оспы в виде статистических закономерностей, что позволило ему в итоге составить прогнозную модель этой эпидемии.

В начале XX в. статистический подход W.Farr в изучении эпидемий был переосмыслен и затем развит в работах Джона Браунли, в которых он анализировал статистические закономерности «движения» эпидемиологических показателей с помощью малоизвестных методов математической статистики. Однако этот статистический подход в изучении закономерностей развития эпидемий существенно отличается от аналитического подхода, который был предложен в России в конце XIX в. (Енько П.Л., 1889), а затем в начале XX века были сформулированы основы современной теории математического моделирования эпидемий (МТЭ), разработаны первые прогностические модели эпидемий (корь, ветрянка, малярия и др.), изучены их основные свойства, получены аналитические формулы для прогнозирования эпидемий.

Появление в середине 50-х годов XX в. первых электронно-вычислительных машин стало следующим этапом в развитии МТЭ, когда число научных работ и публикаций по математическому и компьютерному моделированию эпидемий стало быстро увеличиваться. В работах того времени появлялись все более сложные математические модели, в которых существенную роль играли *случайные факторы эпидемического процесса*, поэтому большинство моделей этого периода имели стохастический (вероятностный) характер, а рабочим аппаратом была теория

вероятностей и случайных процессов. Этот этап в развитии МТЭ был связан с «натиском» на эпидемиологию «чистых» математиков, которым удалось создать множество абстрактных моделей, но с весьма ограниченным эпидемиологическим содержанием [2].

Следующий этап в развитии МТЭ, который относится ко второй половине XX в., был связан с быстрым прогрессом в области компьютерных технологий (разработаны мощные компьютеры с новейшими инструментами программирования и моделирования). В 60–70-е годы в странах Запада были разработаны новые типы детерминированных и стохастических моделей эпидемий, ориентированные на изучение закономерностей развития социально-значимых вирусных и бактериальных инфекций.

Однако, несмотря на высокую сложность таких моделей и изощренность математического аппарата, большинство моделей продолжало иметь абстрактный характер, т.е. они были слабо связаны с постановкой и решением практических задач эпидемиологии. Дело в том, что ведущие научные центры по изучению эпидемий в США и в странах Западной Европы в то время располагались в университетах или в медицинских школах при университетах, которые были достаточно далеки от реальных проблем эпидемиологии, ее реальной практики. В свою очередь, эпидемиологи плохо воспринимали абстрактные математические (детерминированные или стохастические) модели эпидемий и вспышек и не могли их сочетать с практическими потребностями.

Таким образом, в 70-е годы XX в. на Западе наметился серьезный разрыв между «чистой» теорией математического моделирования эпидемий и реальной практикой применения этой теории в эпидемиологии.

Первые исследования, которые наметили пути преодоления указанного разрыва, были выполнены в 60-е годы в СССР академиком О.В.Барояном и профессором Л.А.Рвачевым (1977 г.). Ими была разработана новая методология математического моделирования эпидемий – ЭПИДДИНАМИКА. Данная методология основана на методе научной аналогии

в отображении эпидемического процесса (процесс «переноса» возбудителя инфекции от больных к здоровым) с процессом «переноса» материи (энергии, импульса и др.) в уравнениях математической физики (Боев. Б.В., 1991). Действительно, в ходе развития эпидемии среди населения территории, пораженной инфекционным заболеванием, формируется сложный взаимно поддерживающийся процесс «переноса» популяции возбудителя на сообщество восприимчивых людей. Эпидемиологическое содержание данного процесса связано с адекватным его отображением как в календарном времени « t », так и во «внутреннем времени» « τ », которое фиксирует развитие инфекционного заболевания у множества лиц, пораженных инфекцией. Система уравнений, которая описывает развитие эпидемического процесса, представляет собой систему нелинейных уравнений в частных производных с соответствующими начальными и граничными условиями, весьма «схожими» с уравнениями гидродинамики (Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М., 1954).

С применением этой методологии в ИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи АМН СССР в 60–70-е годы были разработаны уникальные модели эпидемий гриппа для территории СССР, которые составлены на основе балансов «поток» индивидуумов, проходящих основные стадии-состояния инфекционного процесса типа SEIR, где: S – восприимчивые, E – в инкубации, I – инфекционные больные, R – переболевшие.

Новая модель эпидемий гриппа на территории СССР имела адекватное медико-биологическое содержание, т.к. отражала особенности развития как индивидуальных, так и «коллективных» процессов гриппозной инфекции среди восприимчивого населения множества городов, пораженных патогеном. Эффективность моделирования эпидемий гриппа была продемонстрирована в 70-е годы при прогнозировании более 170 эпидемий на территории более 100 городов СССР (Бароян О.В., Рвачев Л.А., 1977). Новая методология моделирования эпидемий оказала существенное воздействие на исследования по математическому и компьютерному моделированию эпидемий в СССР (в России). Так, к концу 90-х годов в ГУ НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН с ее помощью была реализована уникальная «коллекция» математических (компьютерных, в виде Windows-приложений) моделей для изучения эпидемий и вспышек значимых инфекций с феноменологией типа SEnImRF, где: En – «n» стадий инкубационного периода; Im – «m» стадий (различных клинических форм инфекционного заболевания); R – переболевшие заболеванием, F – погибшие от осложнений.

Исключительное значение имеет внедрение новых технологий в совершенствование эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями в современных условиях, так как без коренного изменения системы информационно-аналитического обеспечения невозможна деятельность противоэпидемической службы. Действительной основой повышения

эффективности мер по профилактике инфекционных заболеваний, наносящих огромный социально-экономический ущерб, является реальное усиление деятельности подразделений инфекционной службы на основе современных компьютерных технологий [6–17, 19, 25].

Информационные системы управления (ИСУ) представляют собой упорядоченный способ сбора, хранения, организации, анализа и распространения данных, которые делают их значимыми, полезными и простыми для понимания. ИСУ позволяют: снабжать руководителей и врачей своевременной, точной и конкретной информацией; совершенствовать процесс принятия административных решений; объективно оценивать качество обслуживания пациентов; повысить эффективность работы лечебно-профилактических учреждений.

Компьютерные системы позволяют повысить функции управления, в частности стратегического планирования, управления финансами, отчетности перед вышестоящими структурами, отчетности перед внешними структурами, исследования и обучения.

Имея посредственное отношение к процессу управления, компьютерные технологии являются мощным инструментом улучшения таких характеристик как скорость, точность, восприимчивость.

При математическом анализе распространения инфекционных заболеваний нужно исходить из того, что в ходе эпидемического процесса взаимодействуют две популяции – человек-хозяин и возбудитель-паразита, которые гетерогенны по ряду признаков, эти признаки в процессе взаимодействия популяций претерпевают динамическую изменчивость, реализация взаимодействия осуществляется при наличии определенных природных и социальных условий. Популяции возбудителей приурочены к определенным территориальным, социальным или иначе обособленным группам населения. В эпидемиологии термином «популяция людей» определяются территориальные, социальные, бытовые или возрастные группы людей в пределах циркуляции возбудителя [3, 4, 6, 20–23]. При этом паразитарная система с участием человека носит социально-биологический характер.

Классики отечественной эпидемиологии анализ механизма развития эпидемического процесса проводят на основе теории механизма передачи с выделением понятий основных и дополнительных источников. Основной источник – специфический хозяин возбудителя, обеспечивающий его сохранение как биологического вида, дополнительный – неспецифический хозяин возбудителя, способный передавать его людям, который реализуется через три стадии: выделение возбудителя из зараженного организма, внешней среды, внедрение в восприимчивый организм. Разработанная В.Д.Беляковым и соавт. [2] теория саморегуляции паразитарных систем углубляет понятие «эпидемический процесс» и расширяет возможности его анализа. Согласно этой теории эпи-

демический процесс является результатом взаимодействия двух популяций, которые неоднородны по принципам их соотношения друг к другу: популяция паразита – по вирулентности, антигенности, а популяция хозяина – по восприимчивости, по способности вырабатывать и сохранять иммунитет. Если раньше делали акцент на внешние регуляторные механизмы, то сейчас к ним добавляют внутренние.

Согласно теории саморегуляции паразитарные системы являются универсальными независимо от вида хозяина и природы возбудителя-паразита. Конкретные же механизмы саморегуляции строго индивидуальны. Медицинское значение имеют проблемы саморегуляции эпидемического процесса, в котором участвуют возбудители, опасные для человека. Заражение людей происходит при их контакте с очагами в фазу распространения возбудителя, когда он характеризуется наиболее выраженной вирулентностью.

Следовательно, эпидемический процесс – сложная динамическая самоорганизующаяся, многопараметрическая, нелинейная система, которая требует соответствующих методов и средств исследования.

С широким внедрением компьютерной техники все больше расширяются возможности методологического разнообразия в изучении эпидемического процесса и прежде всего привлечения модельного эксперимента для более глубокого понимания механизмов эпидемического процесса и эффективного воздействия на его динамику [1, 23, 24].

Традиционный эпидемиологический анализ опирается на аппарат математической статистики и связанные с ним вычислительные методы [4, 5, 6]. При этом большое внимание уделяется выявлению, с одной стороны, циклических компонент процесса, а с другой – направлений и выраженности эпидемиологической тенденции. В целом этот метод при всем своем многообразии сводится к математико-статистическому анализу имеющихся фрагментарных данных и не позволяет исследовать эпидемический процесс как сложную систему. Сегодня все отчетливее проявляются недостатки обычных статистических методов для прогнозирования развития эпидемического процесса. Эти недостатки связаны, прежде всего, с тем, что не учитывается возможность изменения факторов, влияющих на его развитие. Этот подход не предполагает исследование механизмов процесса, следствием чего является крайне небольшой срок прогнозирования.

Компьютеризация всех направлений деятельности человека позволяет с другой стороны подойти к проблеме прогнозирования развития эпидемического процесса – методом математического моделирования. Преимуществом моделирования эпидемического процесса является возможность не только анализа следствий любых изменений моделируемого явления, но и проверки адекватности любого набора аксиом в рамках исходных постулатов, путем сравнения результатов моделирования с реальным течени-

ем эпидемического процесса [4, 5, 6].

Имеется несколько основных подходов к проблеме математического моделирования эпидемического процесса. Математическое моделирование оперирует понятиями численного (формализация полученных экспериментальным путем или в наблюдениях параметров, характеризующих текущее состояние эпидемического процесса и процесс его изменения во времени) и аналитического (качественное описание такого явления, внутреннее устройство и закономерности развития которого известны не совсем точно, с его помощью вырабатываются общие представления о возможных свойствах явления) моделирования [18, 26].

Наиболее адекватно научным целям при моделировании эпидемического процесса отвечает использование аппарата математической теории, специально созданной на основе представлений, распространенных в эпидемиологии. При этом динамика процесса описывается в виде системы дифференциальных или разностных уравнений, математическое моделирование этого уровня развивается в рамках детерминистского и стохастического подходов. Детерминистский подход строится на предположении о бесконечности рассматриваемой человеческой популяции и полном отделении эпидемического процесса от элементов случайности (Попов М.П., 1977), при стохастическом подходе численность популяции принимается конечной, а эпидемический процесс – случайным [3].

Следует отметить, что некоторые авторы указывают на определенный кризис идеологии математического анализа эпидемического процесса [4]. Действительно, используемые математическим моделированием причинно-следственные связи не могут точно задать явление. Даже постановка задачи поиска связей, точно задающих систему, упирается, как следует из опыта моделирования, в тот факт, что эпидемический процесс не похож на обычное линейное явление. Следовательно, решение проблемы может состоять в расширении существующей математической идеологии анализа эпидемического процесса как сложной многопараметрической системы.

Методы математического моделирования пока долго не находили широкого применения в анализе и прогнозировании распространения сибирской язвы в различных группах населения. Для этого имеются ряд причин:

- существующие методы математического моделирования основаны на сложных аналитических выражениях и системах уравнений, которые существенно формализуют эпидемический процесс, выделяя лишь некоторые его общие стороны, при этом невозможно учесть все факторы риска, которые имеют существенное значение для распространения сибирской язвы;

- в традиционной практике эпидемиологического надзора за распространением сибирской язвы не учитываются факторы, определяющие фоновую ситуацию (социальный фон, уклад жизни, хозяйствование).

К сожалению, в основных направлениях деятельности по борьбе с распространением сибирской язвы, намеченных ВОЗ, не уделяется должного внимания формированию системного подхода к проведению эпиднадзора, т.е. объединению в единую систему всех его этапов: ретроспективного и оперативного анализа эпидобстановки, прогноза и принятия решения по выработке противоэпидемических мероприятий. Очевидно, что создание такой системы контроля и управления является необходимым условием повышения эффективности борьбы с эпидемией.

Формы математического моделирования распространения сибирской язвы в зависимости от рассматриваемой стадии развития заболевания можно условно разделить на три группы. Модели первой группы рассматривают заключительную стадию развития заболевания – стадию постановки диагноза, они оперируют информацией о динамике возникновения случаев сибирской язвы и формально получают как результат аппроксимации экспериментальных данных с помощью алгебраических функций и позволяют строить краткосрочный прогноз будущего развития эпидемиологического процесса. Модели этой группы не обладают высокой точностью прогноза, но их достоинством являются минимальные требования к экспериментальной и априорной информации. Модели второй группы рассматривают динамику заболеваемости в связи с процессом инфицирования, в них не изучается процесс распространения болезни в различных группах риска в популяции, а учитывается общая интенсивность инфицирования. С помощью моделей из этой группы легко построить прогноз динамики появления новых случаев сибирской язвы, этот прогноз учитывает предысторию процесса инфицирования и обладает большой потенциальной точностью. К третьей группе относятся модели, рассматривающие развитие процессов инфицирования в популяции. Сюда входят как простые модели, оперирующие лишь с двумя группами (инфицированные животные и восприимчивые люди), так и изощренные модели, учитывающие не только различия в группах (животные и население), в путях передачи бацилл, но и изменения в контактной ситуации восприимчивого населения. Подобные модели важны для оценки результатов медицинских и социальных мероприятий по борьбе и профилактике распространения сибирской язвы, но для построения сложных моделей, адекватно отражающих развитие эпидемии, необходимо использовать надежную экспериментальную, теоретическую и статистическую информацию.

Прорыв математического моделирования распространения массовых и особо опасных инфекционных болезней произошел с внедрением современных геоинформационных систем (ГИС) в эпидемиологию. Это совершенно новые компьютерные технологии, которые обеспечивают комплексную автоматизацию процессов сбора, хранения, обработки и анализа эпидемиологической информации с ее визуализацией на

электронных картах. Как известно, ГИС развивались последние 30 лет, но только недавно, в последние 2–3 года, они стали доступными как по цене, так и по возможностям их применения специалистами органов здравоохранения. Современные ГИС предлагают все расширяющиеся функциональные возможности для решения прикладных задач, связанных с оперативным анализом и прогнозом эпидемий и эпизоотий. Сегодня есть возможности выбора из многочисленных инструментов ГИС, которые приспособлены для обобщения результатов и процедур эпидемиологического анализа конкретных ситуаций, особенно в части визуализации результатов анализа на географических картах [1, 7, 8, 10, 11, 12, 14, 15].

ГИС применяют во многих сферах человеческой деятельности, особенно при использовании этих систем специалистами, решающими проблемы глобальной эпидемиологии – процессов распространения СПИДа, атипичной пневмонии, птичьего гриппа и других инфекционных заболеваний. Современные ГИС [10, 15, 17, 19], которые могут работать в интересах решения прикладных задач эпидемиологии, содержат 5 ключевых составляющих: аппаратные средства, программное обеспечение и эпидемиологические данные, обученных специалистов и специальные методы решения прикладных задач эпидемиологии.

Аппаратные средства – это современные персональные компьютеры с их программным обеспечением. Программное обеспечение ГИС содержит множество функций и различных инструментов для ввода, хранения, обработки, анализа, прогноза и визуализации исходной и результирующей эпидемиологической и географической (пространственной) информации. Основными компонентами программного обеспечения ГИС являются инструменты ввода и оперирования информацией, инструменты системы управления базой данных (СУБД), инструменты поддержки информационных запросов, анализа и отображения эпидемиологической информации, инструменты графического и пользовательского интерфейса, который обеспечивает легкий доступ к другим инструментам ГИС.

Применение ГИС особенно эффективно для детального отображения текущей или будущей картины развития эпидемической (эпизоотической) ситуации, воздействия на нее принятых специалистами мер по противодействию патогенам, по прогнозированию процессов распространения патогенов на региональном или глобальном уровне.

Эпидемиологическая или иная служебная информация в ГИС может содержать множество сведений о пространственном положении источников инфекции, распределении по территории действующих сил эпидемии или эпизоотии с привязкой к географическим или другим координатам на карте территории. ГИС может работать с двумя существенно отличающимися типами данных – векторными и растровыми.

Используемые в ГИС данные преобразуются в подходящий для обработки цифровой формат, например, с бумажных карт, в компьютерные файлы (оцифровка карт). В ГИС этот процесс автоматизирован с применением сканерной технологии. Многие эпидемиологические данные могут быть непосредственно переведены в форматы ГИС.

В небольших эпидемиологических исследованиях или проектах исходная информация может храниться в виде файлов. При расширении проекта или исследования, которые приводят к увеличению объемов информации, росту числа пользователей ГИС, эффективнее всего применять системы управления базами данных, т.е. специальные компьютерные средства ГИС, «настроенные» для работы с интегрированными базами данных. В ГИС используют реляционную структуру баз данных, в которых данные хранятся в табличной форме, и для связывания различных таблиц применяются общие поля данных. Это самый простой и достаточно гибкий подход, широко используемый для работы с данными в ГИС.

Для запроса и анализа информации в современных ГИС имеется множество мощных аналитических инструментов, которые нетрудно модифицировать для проведения эпидемиологического анализа.

Для многих типов пространственных операций с эпидемиологическими данными конечным результатом является их представление в виде карт или графиков. Карта – очень эффективный и информативный способ отображения и хранения эпидемиологической информации [1, 11, 12]. Раньше карты территорий, где были возможны эпидемии или эпизоотии, создавались на длительное время, но ГИС предоставляет новые инструменты, расширяющие и развивающие искусство картографии по каждой конкретной эпидемической ситуации [10, 11, 12, 13, 15]. С помощью инструментов ГИС возможна визуализация карт, наполненных текущей эпидемиологической информацией и данными в виде отчетных документов, графиков, таблиц, фотографий и современными мультимедийными средствами.

Таким образом, современные ГИС становятся все более важными инструментами для проведения прогнозно-аналитических исследований в эпидемиологии и эпизоотологии. Они позволяют существенно сократить время и снизить трудоемкость исследований, получить требуемые результаты по ходу развития эпидемий или эпизоотий. Это чрезвычайно важно для организации мер эффективного противодействия патогенам, т.к. обеспечивает не только объективность эпидемического анализа ранее сложившихся ситуаций, но и позволяет перейти к поиску и формированию рациональных стратегий противодействия как «старым», так и новым типам патогенов. Несмотря на то, что ГИС последовательно развивались в течение последних трех десятилетий, только сегодня они стали доступными для ученых и специалистов. Современные ГИС предлагают расширяющиеся функциональные возможности для решения

прикладных задач эпидемиологии и эпизоотологии при относительно невысокой их стоимости. При проведении эпидемиологического анализа процессов распространения инфекционных заболеваний с помощью инструментов ГИС специалистам уже есть из чего выбрать, особенно в части визуализации результатов исследований на географических картах. В этом случае целесообразно к ГИС добавить математическое и компьютерное моделирование эпидемий или эпизоотий, что открывает новые возможности в организации эффективных мер противодействия эмерджентным инфекциям, особенно таким, как сибирская язва, оспа, геморрагические лихорадки и другие массовые и особо опасные инфекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Адамович В.Л.* Сущность картографических методов для изучения причинности явлений в медико-географических исследованиях (методологический аспект). В кн.: Проблемы медико-географических исследований: Материалы научного симпозиума по вопросам картографирования для целей охраны природной среды и здоровья человека. М.; 1984. С. 50–103.
2. *Беляков В.Д., Голубев Д.Б., Каминский Г.Д., Тец В.В.* Саморегуляция паразитарных систем (молекулярно-генетические механизмы). Л., Медицина; 1987.
3. *Бейли Н.* Математика в биологии и медицине. М.; 1970.
4. *Беляков В.Д., Кравцов Ю.В., Герасимов Л.Н.* Состояние и перспектива математического моделирования в эпидемиологии. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1990; 6:109–13.
5. *Беляков В.Д., Герасимов Л.Н., Кравцов Ю.В.* Математическая модель эпидемического процесса антропонозной инфекции при стабильных и однородных факторах. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1991; 3:29–32.
6. *Бочаров Г.А., Гольдман И.Е.* Математическое исследование асимптотической динамики экспериментальных вирусных инфекций. В кн.: Вычислительная математика и математическое моделирование. Т. 1. М.: ИВМ РАН, 2000. С. 198–213.
7. *Боровиков В.* Statistica: Искусство анализа данных на компьютере. Для профессионалов. СПб.: Питер, 2001. С. 16–45.
8. *Варшавский А.А., Туликова Н.В., Хляп Л.А.* О необходимости ведения кадастрово-справочных карт распространения животных. В кн.: Териофауна России и сопредельных территорий: Матер. междунар. совещания; 6–7 февраля 2003; Москва. М.; 2003. С. 66.
9. *Джугитин С.И.* Прогнозирование эпизоотической ситуации (на модели эпизоотического процесса сибирской язвы). РАСХН. Сибирское отделение. ИЭВС и ДВ. Новосибирск, 1996. 192 с.
10. *Кошкарёв А.В.* Геоинформатика. Толкования основных терминов. Программно-аппаратное обеспечение, фонд цифрового материала. Услуги и нормативно-правовая база геоинформатики. Ежегодный обзор. Вып. 3. 1996–1997.
11. *Кузьмин И.В.* Современные информационные системы на службе рабиологии. В кн.: Современные проблемы рабиологии: Тезисы докладов научной конференции; 25–26 декабря 1998. М.; 1998. С. 5–6.
12. *Куценкогий К.Л., Герасимова М.В., Трубина Л.К.* Создание электронных карт для оценки загрязнения и анализа заболеваемости детского населения Ленинского и Кировского районов города. Новосибирск; 2001. С. 222.
13. *Кутузов А.В.* Формирование ГИС на основе данных биомониторинга (Рыбинское водохранилище). В кн.: Териофауна России и сопредельных территорий: Матер. Междунар. совещания; 6–7 февраля 2003; Москва. М.; 2003. С. 90.
14. *Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Кривуля С.Д. и др.* Стратегия борьбы с инфекционными болезнями и санитарная охрана территории в современных условиях. Пробл. особо опасных инф. 2006; 92:5–9.
15. *Попов Н.В., Куклев Е.В., Кутырев В.В.* Актуальные вопросы геоинформационного обеспечения мониторинга и прогнозирования эпизоотической активности природных очагов чумы и других зоонозных инфекций на территории Российской Федерации. Пробл. особо опасных инф. 2006; 92:28–30.
16. *Романюха А.А., Руднев С.Г., Зуев С.М.* Анализ данных и моделирование инфекционных заболеваний. В кн.: Современные проблемы вычислительной математики и математического моделирования. М.: Наука, 2005. Т. 2. С. 352–404.
17. *Саутин С.Н., Пунин А.Е.* Мир компьютеров и химическая технология. Л.; 1991. 184 с.
18. *Санникова Т.Е., Марчук Г.И., Романюха А.А., Яшин*

А.И. Старение системы иммунитета и динамика смертности. Анализ роли антигенной нагрузки. Успехи геронтологии. 2003; 10:74–85.

19. Сергиев В.П., Малышев Н.А., Дрынов И.Д. Инфекционные болезни и цивилизация. М.: 2000. 207 с.

20. Суфиянов В.Г., Русяк И.Г., Пономарев С.Б. Адаптация статистических алгоритмов распознавания образов в условиях неоднородной пространственно-временной структуры данных. В кн.: Труды IV международной научно-технической конференции «Информационные технологии в инновационных проектах». Ижевск, 2003. Ч. 2. С. 91–3.

21. Зуева Л.П., Яфаев Р.Х. Эпидемиология: учебник. СПб: Фолиант; 2005. 746 с.

22. Черкасский Б.Л. Инфекционные и паразитарные болезни человека. М.: Медицинская газета, 1994. 617 с

23. Черкасский Б.Л. Закономерности территориального распространения и проявления активности стационарных неблагоприятных по сибирской язве пунктов. Эпидемиология и инфекционные болезни. 1999; 2:48–52.

24. Черкасский Б.Л., Ведерников В.А., Гаврилов В.А. и др. Методологические принципы разработки базы данных «Кадастр стационарно неблагоприятных по сибирской язве пунктов Российской Федерации». Фундаментальные и прикладные проблемы биотехнологии. Нижний Новгород; 2001. С. 127–8.

25. Хайтович А.Б., Кирьякова Л.С., Дулицкий А.И. и др. Перспективы использования ГИС-технологий в изучении карантинных и других особо опасных инфекций. Пробл. особо опасных инф. 2002; 84:174–8.

26. Sannikova T.E., Rudnev S.G., Romanyukha A.A., Yashin A.I. Immune system aging may be affected by HIV infection mathematical model of immunosenescence. Russ. J. Numer. Anal. Math. Modelling. 2004; 19(4):315–30.

Об авторах:

Жолдошев С.Т. Институт медицинских проблем, Южное отделение НАН Кыргызской Республики. 714004, Кыргызская Республика, г. Ош. E-mail: saparbai@mail.ru

S.T.Zholdoshev

Modern Opportunities of Informational and Analytical Subsystem for Epidemiological Surveillance of Anthrax Distribution (Analytical Review)

Institute of Medical Problems, South Branch of the Kyrgyz Republic NAS, Osh, Kyrgyz Republic

In order to improve epidemiological surveillance of anthrax distribution substantiated was the necessity to elaborate uniform informational and analytical program based on the GIS-technology. The program is aimed for creation of wide spectrum of epidemiological and epizootiological prognoses that permit to substantiate modern strategy of focal territories monitoring.

Key words: GIS-technologies, anthrax, informational and analytical program.

Authors:

Zholdoshev S.T. Institute of Medical Problems, South Branch of the Kyrgyz Republic NAS. Osh, Kyrgyz Republic. E-mail: saparbai@mail.ru

Поступила 11.12.08.

И.В.Кормиленко¹, Э.А.Москвитина²**КЛЕЩЕВЫЕ ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫЕ ИНФЕКЦИИ В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ.
СООБЩЕНИЕ 1. ФАУНА ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ: РАСПРОСТРАНЕНИЕ И ЧИСЛЕННОСТЬ**¹ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области»,²ФГУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону

При изучении фауны иксодовых клещей выявлено семь видов пяти родов иксодид – *Hyalomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Haemaphysalis*: *H. m. marginatum*, *H. scupense*, *D. marginatus*, *R. rossicus*, *I. ricinus*, *I. laguri* и *Haem. Punctata*. Установлено продолжающееся расширение ареала *H. m. marginatum* на север области. Анализ территориального распределения *H. m. marginatum*, а также *D. marginatus*, *R. rossicus*, *I. ricinus* и других с учетом среднесезонных показателей их численности позволил выделить группы районов с низкими, повышенными и высокими показателями. Это позволило выявить потенциальные территории риска с переносчиками и резервуаром возбудителей таких клещевых инфекций как Крымская геморрагическая лихорадка, Ку лихорадка и иксодовые клещевые боррелиозы, что, в свою очередь, явилось обоснованием для проведения эпизоотологических обследований и проведения регламентированных профилактических мер.

Ключевые слова: природно-очаговые инфекции, иксодовые клещи, территории риска.

В современный период отмечена активизация эпизоотического и эпидемического процессов при клещевых инфекциях, в том числе Крымской геморрагической лихорадке (КГЛ), лихорадке Ку (ЛКу), иксодовым клещевым боррелиозам (ИКБ) на территории Южного Федерального округа (ЮФО) [1, 3, 6, 7].

Необходимо отметить, что изучению роли иксодовых клещей при КГЛ, туляремии, бруцеллеze и других инфекциях в Ростовской области и на сопредельных территориях посвящены исследования Н.П.Миронова, Е.Н.Нельзиной, В.П.Боженко, В.П.Романовой, С.Ф.Шевченко, В.Ф.Кондратенко, Н.Б.Бирюля, А.А.Гусевой, И.М.Гроховской, В.Г.Пилипенко и других, в основном в 1950–1960 гг.

В настоящее время в циркуляцию вируса Конго-Крымской геморрагической лихорадки (ККГЛ) на юге России, кроме доминантного переносчика *Hyalomma marginatum marginatum* Koch, 1844, в Ростовской области включаются клещи *Dermacentor marginatus* Sulzer, 1776, *Rhipicephalus rossicus* Jakimov et Koh-Jakimova, 1911, в Республике Калмыкия – *D. marginatus*, *D. niveus* Neumann 1897, *R. sanguineus* Latreille, 1806, *R. rossicus*, *R. pumilio* Schulze, 1935, *H. detritum* Schulze, 1919, *H. scupense* Schulze, 1918, *H. anatolicum* Koch 1844., в Ставропольском крае – *D. marginatus*, *D. reticulatus* Fabricius, 1794, *Ixodes ricinus* L., 1758, *R. rossicus*, *Boophilus annulatus* Say, 1776, *H. scupense*, *H. anatolicum*, *Haemaphysalis punctata* Can. et Fanz., 1878, в Волгоградской области – *R. rossicus*, в Астраханской области – *D. marginatus*, *R. rossicus*, *D. niveus*, *R. schulzei* Olenov, 1929, *H. scupense*, в Республике Дагестан – *H. anatolicum*, в Республике Ингушетия – *B. annulatus*, *R. rossicus*, *Haem. otophila* Schulze, *D. marginatus* [3, 4, 11, 12, 14].

При активизации эпизоотических и эпидемических проявлений КГЛ в конце XX и начале XXI вв. выявлено расширение ареала клеща *H. m. marginatum*, но не равномерное, а с приуроченностью к определенным зональным типам ландшафтов, где

условия для функционирования составляющих паразитарных систем наиболее благоприятны [11, 12].

В Ростовской области переносчиками *Coxiella burnetii* – возбудителя коксиеллеза, являются *D. marginatus*, *H. m. marginatum*, *R. rossicus* и *I. ricinus*; в Ставропольском крае – *H. m. marginatum*, *D. marginatus*, *Haem. punctata* и *I. ricinus*; на территории Нижнего Поволжья, в Астраханской и Волгоградской области – *D. marginatus*, *I. ricinus* и *R. rossicus* [1, 7, 17].

Необходимо отметить, что возбудитель Лайм-боррелиоза – *Borrelia burgdorferi sensu stricto* – впервые в России выделен из клещей *I. ricinus* на территории Краснодарского края, геновиды боррелий – *B. afzelii* и *B. garinii* – обнаружены в пробах от иксодовых клещей этого вида в некоторых субъектах ЮФО [5, 6, 8].

Способность клещей *H. m. marginatum*, *D. marginatus*, *R. rossicus* к трансвариальной и трансфазовой передаче вируса ККГЛ, *I. ricinus* – коксиелл Бернетта, *Borellia* sp. и вируса клещевого энцефалита, *D. marginatus*, *H. m. marginatum* и *Haem. punctata* – *B. melitensis*, *B. abortus bovis* обуславливает их роль как биологических хозяев и резервуара в природных очагах [2, 9, 13].

В отсутствие способности клещей передавать возбудителей потомству резервуаром их являются дикие и синантропные животные – прокормители клещей [13]. При этом иксодовым клещам отводится при КГЛ, ЛКу, боррелиозах, туляремии, чуме, листериозе и других инфекционных болезнях определенная роль в поддержании эпизоотического процесса. Иксодовые клещи и их прокормители объединены между собой трофическими связями, что обеспечивает циркуляцию возбудителя в природном очаге.

Цель работы – изучение видового состава и ареала иксодовых клещей на территории Ростовской области, выявление территорий потенциального риска при КГЛ, ЛКу и ИКБ.

Материалы и методы

Изучение видового состава и ареала иксодовых клещей проведено на основании анализа результатов акарологических сборов (1999–2007 гг.) в 43 административных районах и 7 городах Ростовской области, осуществленных специалистами ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области». Учитывали распространение клещей, снятых с КРС и других прокормителей и собранных в открытых стациях, с использованием физико-географического районирования Ростовской области и зональных типов ландшафтов [19]. Сбор и учет полевого материала проводили в соответствии с общепринятыми методами [16], определение видового состава иксодовых клещей – с учетом определителя Н.А. Филипповой [18]. За указанный период собрано 161070 экз. клещей, в том числе *H. m. marginatum* – 68878, *D. marginatus* – 52384, *R. rossicus* – 17274, *Haem. punctata* – 2593, *I. ricinus* – 850, *H. scupense* – 19091 при обследовании 687794 голов КРС, а также 82952 экз. – в открытых стациях (пройдено 105159,4 фл-км), из них *H. m. marginatum* – 2422, *D. marginatus* – 65813, *R. rossicus* – 6932, *Haem. punctata* – 4256, *I. ricinus* – 3477, *H. scupense* – 52. С ежа сняты единичные экземпляры *I. laguri* Olenov, 1929. Определены индексы доминирования (ИД) и индексы обилия (ИО) для всех видов клещей, снятых с КРС (контрольные группы животных) [16], а также – среднегодовое показатели их численности. Численность клещей, собранных в открытых стациях, определяли с учетом числа особей, снятых с флага на 1 км маршрута [16]. Проведено ранжирование указанных показателей численности иксодовых клещей, снятых с КРС (*H. m. marginatum*), и собранных в открытых стациях (*D. marginatus*, *R. rossicus* и *I. ricinus*), с целью определения территорий потенциального риска по КГЛ, ЛКу и ИКБ.

Графики, а также определение тенденции (по прямолинейной линии тренда) в динамике среднегодовых показателей численности клещей выполнены в программе Microsoft Excel, 2007 г.

Результаты и обсуждение

Ростовская область расположена на юге физико-географической страны – Русской равнины, в пределах её Нижне-Донской области. По геоморфологическим и долготно-климатическим особенностям выделены две провинции: Доно-Донецкая (правобережная часть Дона) и Доно-Сало-Маньчская (левобережная). Доно-Донецкая провинция включает: Чиро-Донской и Донецко-Приазовский округа, пять физико-географических районов. В Доно-Сало-Маньчскую провинцию входят четыре округа: Донской, Сальский, Маньчский, Южно-Приазовский и 10 районов с разнообразными типами (зональные: степной, сухостепной, полупустынный; интразональные: луговой, степной и лесной), подти-

пами, вариантами и основными видами ландшафтов, растительности, почв и природных условий.

При изучении фауны иксодовых клещей на территории Ростовской области выявлено семь видов пяти родов иксодид – *Hyalomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Haemaphysalis*: *H. m. marginatum*, *H. scupense*, *D. marginatus*, *R. rossicus*, *I. ricinus*, *I. laguri* и *Haem. punctata*. Отмечено исчезновение двух видов, ранее характерных для дельты Дона, – *B. annulatus* и *Haem. otophila* [15]. Поскольку основными переносчиками возбудителей КГЛ, ЛКу, ИКБ и других инфекций являются иксодовые клещи *H. m. marginatum*, *D. marginatus*, *R. rossicus* и *I. ricinus*, изучение их ареала и других экологических аспектов проведено для указанных видов клещей.

H. m. marginatum (основной переносчик вируса ККГЛ) распространен в 40 районах и 9 городах, от Верхнедонского на севере до Песчанокопского на юге области, от Матвеево-Курганского и Неклиновского на западе до Заветинского и Ремонтненского на востоке. При этом установлено, что ареал клеща *H. m. marginatum* на севере включает населенные пункты (х. Базковский и Кукуевский) Верхнедонского района, находящегося на уровне 49,7° северной широты, что является северной границей его распространения в Ростовской области. Следует отметить, что ареал этого вида клеща несколько сместился на север, по сравнению с 2003 г., когда он был на уровне 49,2–49,5° с.ш., что указывает на продолжающееся расширение его ареала. На юге области граница ареала находится на уровне 46,0° с.ш.

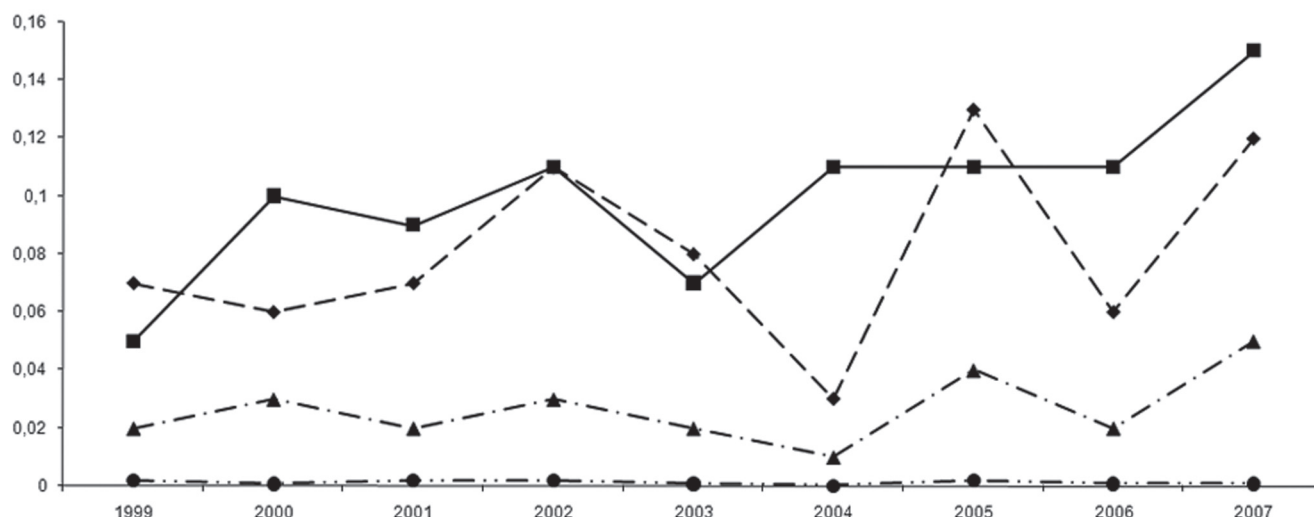
Экологически пластичный вид *D. marginatus* преобладает над другими и составляет основной фон фауны иксодовых клещей в области. Клещи этого вида распространены практически повсеместно, на территории 43 районов и 11 городов.

R. rossicus, включающийся в циркуляцию вируса ККГЛ и являющийся, по мнению В.Ф. Кондратенко [9], «одним из ведущих в поддержании энзоотичности очага» в Ростовской области, распространен на территории 38 районов и 10 городов.

Распространение лесного клеща *I. ricinus* на территории области неоднородно, мозаично. Его ареал установлен от Миллеровского района на севере до Сальского на юге, от Матвеево-Курганского на западе до Орловского на юго-востоке, на территории 11 районов и 8 городов области.

При анализе ИД иксодовых клещей на КРС установлено, что ИД *H. m. marginatum* варьировал от 29,4 до 56,4 %, *D. marginatus* – от 11,9 до 47,8 %, *R. rossicus* – от 4,3 до 14,5 % соответственно. При этом *H. m. marginatum* в течение шести лет из девяти доминировал среди других видов. ИД *I. ricinus* среди указанных видов был минимальным – от 0,2 до 1,1 %. Что касается *Haem. punctata* и *H. scupense*, то в сборах их удельный вес составил от 0,7 до 3,5 % и от 1,2 до 37 % соответственно.

В открытых стациях установлено доминирование *D. marginatus* – основного пастбищного кле-



Динамика среднееголетних показателей численности иксодовых клещей на КРС:

◆ – *D. marginatus*, ■ – *H. m. marginatum*, ▲ – *R. rossicus*, ● – *I. ricinus*.

По оси абсцисс – среднееголетние показатели численности (индексы обилия) клещей; по оси ординат – годы

ща – от 72,7 до 82,6%. Значение этого показателя варьировало для *H. m. marginatum* от 1,0 до 4,2 %, *R. rossicus* – 3,9–11,0 %, *I. ricinus* – 1,6–6,2 %, *Haem. punctata* – 1,6–11,4 %, *H. scupense* – 0,1–0,6 %.

При изучении динамики среднееголетних показателей численности иксодовых клещей, снятых с КРС по Ростовской области, выявлена тенденция роста для *H. m. marginatum* от 0,05 до 0,15, *D. marginatus* – от 0,07 до 0,12, *R. rossicus* – от 0,02 до 0,05 соответственно. Необходимо отметить стабильно низкие среднееголетние показатели *I. ricinus* (0,001–0,002), рисунок.

Установлено снижение среднееголетних показателей численности *D. marginatus* в открытых стациях от 0,70 до 0,48 и незначительные колебания численности *H. m. marginatum* (0,01–0,09), *R. rossicus* (0,03–0,07) и *I. ricinus* (0,02–0,03).

Анализ территориального распространения *H. m. marginatum*, снятых с КРС, позволил выделить группы районов и городов с низкими (0,01–1,0), повышенными (1,1–3,0) и высокими (3,1 и более) показателями. Административные районы (19) и г. Волгодонск с повышенными и высокими показателями расположены преимущественно на юге и юго-востоке в Доно-Сало-Маньчской провинции, в Донском, Сальском, Маньчском и Южно-Приазовском округах со степным и сухостепным, сухостепным и полупустынным типами ландшафтов и в определенных биотопах (Дубовский, Зимовниковский, Ремонтненский, Заветинский, Песчанокопский, Сальский районы и др.), где в современный период регистрируют КГЛ. Кроме того, районы с указанными показателями находятся в степном зональном с интразональным (луговым) типами ландшафтов в пойме рек Дон и Северский Донец – в Чиро-Донском, Донецко-Приазовском и Донском округах

Донецкой провинции в Каменском, Тацинском, Красносулинском, Усть-Донецком районах, где в 1960-е годы имела место КГЛ, а также Волгодонском, Цимлянском и др. районах с эпидемическими проявлениями в современный период.

D. marginatus с высокими значениями среднееголетних показателей численности (7,1 и более), собранных в открытых стациях, распространен преимущественно в районах и городах, расположенных в степном зональном типе ландшафта на севере и западе области; с повышенными значениями (3,1–7,0) – от степного до смешанного степного и сухостепного – во всех указанных выше провинциях и округах.

R. rossicus выявлен в 19 районах и 8 городах с высокими (3,1 и более) и повышенными (1,1–3,0) показателями преимущественно в степном типе ландшафта.

Что касается клеща *I. ricinus*, то он с повышенными (1,1–3,0) среднееголетними показателями численности преимущественно обнаружен в Доно-Донецкой провинции, Донецко-Приазовском округе со степным типом ландшафта с естественными и искусственными древесно-кустарниковыми насаждениями – лиственные и сосновые лесные массивы, лесные полосы и др. (Миллеровский, Куйбышевский, Матвеево-Курганский, Неклиновский, Родионов-Несветайский районы, города Донецк, Новошахтинск и Шахты). С высокими показателями – 3,1 и более – этот вид клеща встречается в Доно-Сало-Маньчской провинции, Сальском округе со смешанным степным и сухостепным и лесным интразональным типами ландшафта (Орловский район).

Необходимо отметить, что область распространения основного переносчика и резервуара вируса ККГЛ (клеща *H. m. marginatum*) в 40 районах совпадает с ареалом клеща *D. marginatus* и в 37 – с *R. ros-*

sicus, участвующих в циркуляции вируса ККГЛ и *C. burnetti*. В 11 районах и восьми городах выявлен клещ *I. ricinus* – переносчик и резервуар *B. burgdorferi sensu lato* и *C. burnetti*.

Все пять видов пастбищных иксодовых клещей сосуществуют в трех административных районах Ростовской области – Красносулинском, Семикаракорском и Константиновском. Четыре вида клеща – *H. m. marginatum*, *D. marginatus*, *R. rossicus* и *Haem. punctata* с различными показателями численности обитают в Цимлянском, Усть-Донецком, Аксайском, Багаевском, Волгодонском, Кагальницком, Зерноградском административных районах, городах Новочеркасск и Волгодонск. Четыре вида клеща – *H. m. marginatum*, *D. marginatus*, *R. rossicus* и *I. ricinus* выявлены с различными показателями численности в Матвеево-Курганском, Неклиновском, Родионовском, Несветайском, Орловском, Целинском, Сальском районах и городах Донецк, Каменск, Шахты. Это указывает на потенциальную возможность наличия сочетанных природных очагов клещевых инфекций, расположенных в физико-географических районах с различными типами ландшафтов, прежде всего, на их стыках.

Срок активности половозрелых и ювенальных форм *H. m. marginatum* – март – октябрь (ноябрь), *D. marginatus* – январь (февраль) – декабрь, *R. rossicus* – март (апрель) – сентябрь и *I. ricinus* – март – ноябрь.

Таким образом, изучение фоновых видов иксодовых клещей и их ареала позволило выявить продолжающееся распространение *H. m. marginatum* на север области, что, в соответствии с данными А.Д.Лебедева и др. [10], может быть обусловлено переносом личинок и нимф клещей птицами (враповыми), а также млекопитающими. Подтверждением этому является обнаружение впервые антигена вируса ККГЛ в пробах от птиц (Аксайский район, Ростов-на-Дону, 2003, 2006 гг.) и от млекопитающих – зайцурасак (Веселовский район, 2003 г.), где ранее его не обнаруживали [4]. В динамике среднесезонных показателей численности иксодовых клещей выявлена тенденция роста *H. m. marginatum*, *D. marginatus* и *R. rossicus*, что, согласно данным А.Д.Лебедева и др. [10], свидетельствует об активном состоянии природного очага КГЛ. Анализ территориального распределения *H. m. marginatum* с учетом среднесезонного индекса обилия на КРС, а также *D. marginatus*, *R. rossicus*, *I. ricinus* и других, собранных в природе, с учетом среднесезонных показателей их численности, позволил выявить потенциальные территории риска с переносчиками и резервуаром возбудителей таких клещевых инфекций, как Крымская геморрагическая лихорадка, лихорадка Ку, иксодовые клещевые бор-

релиозы и других, что имеет прогностическое значение. Это, в свою очередь, явилось обоснованием для проведения эпизоотологических обследований и проведения регламентированных профилактических мер борьбы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айдинов Г.Т., Зыкова Т.А., Говорухина М.В. и др. Клещевые инфекции в Ростовской области. В кн.: Арбовирусы и арбовирусные инф.: Матер. расширенного пленума пробл. комис. «Арбовирусы» и научн.-практ. конф. «Арбовирусы и арбовирус. инф.»; 17–20 октября 2006 г.; Астрахань. М.; 2007. С. 144 – 7.
2. Балашов Ю.С., Дайтер А.Б. Кровососущие членистоногие и риккетсии. Л.: Наука; 1973. 251 с.
3. Василенко Н.Ф., Ефременко В.И., Афанасьев Е.Н. и др. Применение молекулярно-биологических и иммунологических методов для диагностики Крымской-Конго геморрагической лихорадки и детекции ее возбудителя. Эпидемиол. и инф. бол. 2007; 1:30–4.
4. Водяницкая С. Ю. Крымская геморрагическая лихорадка в современный период (на примере Ростовской области) [автореф. дис. ... канд. мед. наук]. Ростов н/Д; 2005. 26 с.
5. Гальцева Г.В., Юничева Ю.В., Малай В.И. и др. Некоторые аспекты клещевого боррелиоза в Краснодарском крае. РЭТ-инфо. 2003; 1:53–6.
6. Горелова Н.Б., Коренберг Э.И., Постик Д. и др. Первая изоляция *Borellia burgdorferi sensu stricto* в России. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2001; 4:10–2.
7. Денисов А.А. Роль иксодовых клещей в распространении возбудителей инфекционных болезней на территории Нижнего Поволжья. Матер. докл. науч. конф. М.; 2007; 8:114–6.
8. Жуков А.Н., Тихонов Н.Г., Пашанина Т.П. и др. Иксодовый клещевой боррелиоз в Волгоградской области. В кн.: Природно-очаговые инфекции в Нижнем Поволжье: Сб. науч. тр. Волгоград; 2000. С. 87–92.
9. Кондратенко В.Ф. Важность иксодовых клещей в трансмиссии и сохранении агента Крымской геморрагической лихорадки на Нижнем Дону и Северном Кавказе в инфекционных фокусах. Паразитология. 1976; 10:297–302.
10. Лебедев А.Д., Пак Т.П., Бируля Н.Б. и др. Экологическая география вирусов Крымской геморрагической лихорадки и Конго. Мед. география. Геогр. среда и распространение бол. М.; 1977; 8:122–187.
11. Москвитина Э.А., Водяницкая С.Ю., Пичурина Н.Л. и др. Изучение современного состояния природного очага Крымской геморрагической лихорадки в Ростовской области. Пробл. особо опасных инф. 2004; 1(87):34–37.
12. Онищенко Г.Г., Ефременко В.И., Бейер А.П. Крымская геморрагическая лихорадка. М.: ГОУ ВУНМЦ; 2005. 269 с.
13. Петрищева П.А., редактор. Переносчики возбудителей природно-очаговых болезней. М.; 1962. 344 с.
14. Подсвилов А.В., Подсвилова В.В., Санджиева В. Б.-Х. и др. Эпизоотологическая и эпидемиологическая характеристика территории Республики Калмыкия по Крымской геморрагической лихорадке в 2000–2006 гг. В кн.: Арбовирусы и арбовирусные инф.: Матер. расширенного пленума пробл. комис. «Арбовирусы» и научн.-практ. конф. «Арбовирусы и арбовирусные инф.»; 17–20 октября 2006 г.; Астрахань. М.; 2007. С. 155–7.
15. Романова В.П., Боженко В.П., Яковлев М.Г. Материалы изучения пойменного туляремииочага. Природно-очаговые болезни человека и краевая эпидемиол. Павловский Е.Н., редактор. М.; 1955. С. 83–9.
16. Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих – переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций. МУ 3.1.1027-01. 66 с.
17. Тимченко Л.Д., Тинькова Е.Л. Совр. аспекты эпидемиол. надзора за особо опасными инф. забол. на юге России: Матер. науч.-практ. конф. Ставрополь; 2007. Ч. II. С. 129–31.
18. Филиппова Н.А. Иксодовые клещи подсемейства *Ixodinae*. В серии: Фауна СССР. Паукообразные. Л.; 1977. Т. 4, вып. 4. 396 с.
19. Хрусталева Ю.П., Смагина Т.А., Меринов Ю.Н. и др. Природа, хозяйство и экология Ростовской области. Ростов н/Д; 2002. 446 с.

Об авторах:

Кормиленко И.В. Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области. Ростов-на-Дону.

Москвитина Э.А. Ростовский-на Дону научно-исследовательский противочумный институт. Ростов на-Дону. E-mail: plague@ic.ru

I.V.Kormilenko, E.A.Moskvitina

Tick-Borne Natural Focal Infections in the Territory of the Rostov Region. Part 1. The Fauna of Ixodidae Ticks

Center for Hygiene and Epidemiology in the Rostov Region, Rostov Research Institute for Plague Control, Rostov-on-Don

Investigation of the fauna of *Ixodidae* ticks in the territory of the Rostov Region resulted in identification of the seven species belonging to five genera – *Hyalomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Haemaphysalis*: *H. m. marginatum*, *H. scupense*, *D. marginatus*, *R. rossicus*, *I. ricinus*, *I. laguri* and *Haem. punctata*. Continuous expansion of *H. m. marginatum* to

the northern part of the region was observed. Analysis of spatial distribution of *H. m. marginatum* as well as *D. marginatus*, *R. rossicus*, *I. ricinus* and other ticks using average indices of their long-term abundance permitted to identify groups of areas with low, increased and high indices of tick abundance. This allowed to determine potential risk areas, with the presence of vectors and a reservoir of tick-borne infections as Crimean hemorrhagic fever, Q fever and tick-borne borrelioses. The results obtained in the investigation could serve as a basis for carrying out epizootic surveys and implementation of specified preventive measures.

Key words: natural focal infections, *Ixodidae* ticks, risk areas.

Authors:

Kormilenko I.V. Center for Hygiene and Epidemiology in the Rostov Region. Rostov-on-Don .

Moskvitina E.A. Rostov Research Institute for Plague Control. Rostov-on-Don. E-mail: plague@ic.ru

Поступила 23.12.08.

А.Я.Никитин, Ю.А.Козлова, Т.С.Панова

**АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ
С АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ВАРИАЦИЕЙ У ИМАГО ТАЕЖНОГО КЛЕЩА
НА ТЕРРИТОРИИ ИРКУТСКОЙ ОБЛАСТИ**

ФГУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»

При исследовании пространственно-временной изменчивости признаков с альтернативной вариацией у самок таежного клеща из трех районов Иркутской области показано, что все выборки фенотипически гетерогенны. На этой основе рассчитан критерий идентичности по Л.А.Животовскому между отдельными сборами имаго. Для географически удаленных популяций показатель сходства примерно равен 0,9. У внутривидовых группировок, собранных с одной территории в разные сезоны, показатель сходства выше. Выявленная изменчивость создает основу для поиска морфологических маркеров между фенотипическими особенностями переносчика и его векторной способностью, изучения продолжительности жизненного цикла и других вопросов биологии клещей, в том числе с использованием коллекционных материалов, накопленных в предшествующие годы.

Ключевые слова: таежный клещ, морфологические признаки, имаго, самки, Иркутская область.

В Иркутской области резервуаром и основным переносчиком вируса клещевого энцефалита и боррелий является таежный клещ (*Ixodes persulcatus*). В литературе неоднократно подчеркивалось, что векторные способности переносчиков возбудителей болезней зависят от особенностей структуры их популяций [1, 2, 4]. Нами исследована пространственно-временная изменчивость морфологических признаков имаго таежного клеща в трех районах Иркутской области. В настоящем сообщении представлены данные, характеризующие изменчивость половозрелых самок клещей по качественным признакам.

Материалы и методы

Сбор самок *I. persulcatus* из пригородов Иркутска (52° северной широты, 104° восточной долготы, 2001, 2003, 2004 и 2006 гг.) и окрестностей поселка Большие Коты (51° с.ш., 105° в.д., 2006 г.) осуществлен на флаг с растительности. Выборка из пригородов Братска (56° с.ш., 101° в.д., 2007 г.) представлена особями, удаленными с людей в травмпунктах города. Всего проанализировано 267 самок. Для оценки сходства клещей из отдельных выборок использован критерий идентичности Л.А.Животовского [3].

Результаты и обсуждение

Считается, что именно самки клещей вследствие их малой индивидуальной изменчивости наиболее ценны для характеристики географической вариации [5]. Кроме того, они имеют большую эпидемиологическую значимость для человека по сравнению с другими возрастными группами переносчика и самцами. Выявленные по всем выборкам фены и частоты фенотипических признаков самок таежного клеща приведены в табл. 1. Очевидно, что все выборки фенотипически гетерогенны, и это позволяет провести оценку степени их сходства.

В табл. 2 рассчитаны меры сходства для выборок из трех географически удаленных популяций клещей

по признакам, приведенным в табл. 1. Все три пары коэффициентов сходства (r) значительно отличаются от единицы, то есть сравниваемые выборки принадлежат разным генеральным совокупностям. Причем это проявляется по большинству признаков. Так, при сравнении клещей из пригородов Иркутска и Братска их принадлежность к разным совокупностям подтверждается на достоверном уровне по всем семи исследованным особенностям строения имаго. При сравнении самок из окрестностей поселка Большие Коты с имаго из пригородов Братска и Иркутска в каждом случае коэффициенты сходства не значимы по двум признакам (в первом случае – № 7 и 12, а во втором – 17 и 37). В целом по всем выборкам из 21 сравниваемой пары признаков с альтернативной вариацией в 17 случаях статистически подтверждена их принадлежность к разным генеральным совокупностям, что составляет 81 %. Средний коэффициент фенотипического сходства самок из разных популяций равен $0,867 \pm 0,0360$.

Несколько иная картина наблюдается, если анализировать фенотипическое сходство клещей из разных выборок, полученных в пригородах Иркутска и относящихся к одной и той же популяции (табл. 3). Из данных табл. 3 следует, что хотя обобщенная по нескольким признакам оценка сходства выявляет во всех случаях достоверную принадлежность выборок разным генеральным совокупностям, величина связи между ними выше, чем между географически удаленными популяциями (средний $r = 0,938 \pm 0,0153$). Причем сходство самок разных лет сбора, но с одного участка (выборки 1–2, 1–3 и 2–3) примерно сопоставимо со сходством клещей, собранных в разные годы с территорий, удаленных на 20 км (все остальные выборки, кроме 1–4), что, по-видимому, свидетельствует в пользу принадлежности всех особей к одной популяции.

У самок клещей, предположительно относящихся к одной популяции, обобщенная по всем сравниваемым парам признаков доля случаев ста-

Таблица 1

Частота встречаемости фенотипов у самок таежного клеща

Признак (номер по журналу)	Фен (морфа)	Частота встречаемости фенотипов в выборках:					
		Иркутск, 23 км 2001 г., n=21	Иркутск, 23 км 2003 г., n=82	Иркутск, 23 км 2004 г., n=76	Иркутск, 43 км 2006 г., n=32	Коты, 2006 г., n=30	Братск, 2007 г., n=26
Форма скапул (№ 1)	А – остроугольные	0,429	0,049	0,236	0,219	0,069	0,056
	Б – тупоугольные	0,310	0,591	0,486	0,625	0,655	0,389
	В – прямоугольные	0,262	0,354	0,277	0,156	0,276	0,556
Вариация размеров латеральных зубцов (лз) кокс I и II пары ног (№ 12)	А – лз I = лз II	0,548	0,476	0,428	0,391	0,121	0,220
	Б – лз I < лз II	0,357	0,524	0,572	0,609	0,879	0,720
	В – лз I > лз II	0,095	0,0	0,0	0,0	0,0	0,060
Форма поровых полей (№ 7)	А – треугольная	0,0	0,0	0,0	0,203	0,0	0,100
	Б – овальная	0,675	0,220	0,554	0,203	0,121	0,200
	В – грушевидная	0,250	0,768	0,411	0,500	0,534	0,500
	Г – округлая	0,075	0,012	0,036	0,094	0,345	0,200
Форма вершины гипостомы (№ 13)	А – выраженная выемка	0,190	0,185	0,243	0,129	0,0	0,333
	Б – едва заметная выемка	0,190	0,173	0,149	0,097	0,167	0,583
	В – без выемки – плато	0,298	0,148	0,108	0,129	0,167	0,083
	Г – без выемки – округлая форма	0,381	0,494	0,500	0,645	0,667	0,0
Форма заднего края передней створки генитального клапана (№ 17)	А – прямая	0,143	0,210	0,219	0,281	0,267	0,0
	Б – волнистая	0,619	0,519	0,562	0,344	0,633	0,526
	В – с острым углом	0,143	0,123	0,110	0,156	0,067	0,158
	Г – дуговидная	0,095	0,074	0,110	0,219	0,0	0,263
	Д – особые (редкие) формы	0,0	0,0	0,0	0,0	0,033	0,053
Форма генитального клапана (№ 31)	А – овальная	0,692	0,541	0,730	0,438	0,933	0,350
	Б – ромбовидная	0,0	0,0	0,0	0,063	0,033	0,100
	В – лимон	0,231	0,457	0,257	0,375	0,0	0,400
	Г – треугольник вершиной вверх	0,077	0,0	0,014	0,031	0,033	0,100
	Д – треугольник вершиной вниз	0,0	0,0	0,0	0,094	0,0	0,0
	Е – грушевидная	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,05
Расположение медиальных рядов зубцов гипостомы (№ 37)	А – на некотором расстоянии	Нет данных	0,902	0,506	0,469	0,800	0,333
	Б – соприкасаются	Нет данных	0,098	0,494	0,531	0,200	0,667

тистически подтвержденной их принадлежности разным генеральным совокупностям составляет 62 % (то есть, значимо отличаются от единицы 23 коэффициента сходства), что на 19 % меньше, чем у особей из географически удаленных группировок. Аналогичный показатель для имаго с одного и того же участка сбора (23 км Байкальского тракта) равен 44 % (значимо отличаются от единицы 8 коэффициентов сходства), что на 37 % меньше, чем у самок из разных популяций.

Коэффициент сходства особей из выборок 1 и 3, хотя и не достоверно, но больше по значению, чем аналогичный показатель для самок из выборок 1–2 и 2–3 (табл. 3). Коэффициент идентичности (I) между выборками 1 и 3 наименьший из всех и близок к критической величине (23,7), соответствие которой или

более низкое значение свидетельствует о принадлежности имаго этих сборов единой генеральной совокупности. Интересно, что в рассматриваемом случае все клещи изначально относятся к одной популяции, но, исходя из наиболее вероятной продолжительно-

Таблица 2

Показатели сходства и критерий идентичности для трех географически удаленных популяций таежного клеща Иркутской области

Сравниваемые выборки	Оцениваемые показатели		
	$r \pm s_r$	df	I
Иркутск – Братск	0,890±0,0138	20	81,1***
Иркутск – Коты	0,914±0,0062	19	129,0***
Коты – Братск	0,796±0,0263	19	80,8***

Примечание. Здесь и табл. 3 * означает $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$.

Таблица 3

Показатели сходства и критерий идентичности для отдельных выборок таежного клеща из пригородов Иркутска

Сравниваемые выборки ¹	Оцениваемые показатели		
	$r \pm s_r$	df	I
1–2	0,927±0,0110	15	87,2***
1–3	0,975±0,0081	14	25,9*
1–4	0,871±0,0167	17	86,9***
2–3	0,970±0,0051	14	77,6***
2–4	0,946±0,0243	18	74,1***
3–4	0,937±0,0089	16	78,8***

Примечание. Выборки обозначены: 1 – самки собраны в 2001 г. на 23 км Байкальского тракта (шоссейная дорога протяженностью 70 км, которая соединяет Иркутск и поселок Листвянка, находящийся на берегу оз. Байкал); 2 – тот же район выборка 2003 г.; 3 – тот же район выборка 2004 г.; 4 – сбор клещей проведен в 2006 г. на 43 км Байкальского тракта.

сти жизненного цикла этого вида членистоногих в таежной зоне пригородов Иркутска, именно особи сбора № 3 могут являться прямыми потомками имаго выборки № 1.

Таким образом, анализ признаков с альтернативной вариацией у самок таежного клеща позволяет дифференцировать отдельные географически удаленные популяции. Коэффициент сходства в этом случае близок к 0,9 и меньше, чем при сравнении внутривидовых выборок. Наблюдаемые различия между сборами самок за разные годы позволяют допустить, что при достаточно больших объемах исследуемого материала можно будет характеризовать клещей по степени родства и выявлять эпизоды нарушенной по тем или иным причинам панмиксии. Вскрытая изменчивость создает основу для поиска морфологических маркеров между фенотипическими особенностями переносчика и его векторной способностью, изучения продолжительности жизненного цикла и других вопросов биологии клещей. Достоинством метода является возможность использования для решения поставленных задач коллекционных материалов, собранных за многие годы, то есть изучения хронологической вариации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев А.Н., Ботвинкин А.Д., Данчинова Г.А., Дубинина Е.В., Хаснашинов М.А. Гетерогенность популяций клещей иксодид – основа разнообразия генотипов вируса клещевого энцефалита Сибири и Дальнего Востока. Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2007; 3(55):69–73.
2. Базанова Л.П., Вержущий Д.Б., Никитин А.Я., Токмакова Е.Г., Хабаров А.В. Различия между двумя популяциями *Citellophilus tesquorum altaicus* из Тувинского природного очага чумы. Мед. паразитол. 2004; 1:37–9.
3. Животовский Л.А. Показатели популяционной изменчивости по полиморфным признакам. Фенетика популяций. М.: Наука; 1982; 38–44.
4. Коренберг Э.И., Баннова Г.Г., Ковалевский Ю.В., Караванов А.С. Внутривидовые различия инфицированных взрослых *Ixodes persulcatus* P. Sch. вирусом клещевого энцефалита и оценка его суммарного содержания в клещах. Вopr. вирусол. 1988; 33(4):456–61.
5. Львова Г.Н., Окулова Н.М. Изменчивость меристических признаков таежного клеща *Ixodes persulcatus* P. Sch. в пределах одной популяции. В кн.: Второе акарологическое совещание: Тез. докл. Ч. 1. Киев: Наукова думка; 1970. С. 288–90.

О авторах:

Никитин А.Я., Козлова Ю.А., Панова Т.С. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. 664047, Иркутск, ул. Трилессера, 78. Тел.: (395-2) 22-01-35. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

A. Ya. Nikitin, Yu. A. Kozlova, T. S. Panova

Analysis of Variability of Morphologic Characteristics with Alternative Variation in Imago of Taiga Tick in the Territory of the Irkutsk Region

Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East

Investigation of the spatial-temporal variability of characteristics with alternative variation in females of taiga tick from three district of the Irkutsk Region showed all samplings to be phenotypically heterogenous. Based on these results estimated was L.A. Zhivotovsky criterion of identity between separate imago collections. Similarity index for geographically remote populations was about 0.9. This index was higher in intrapopulation groups collected from one territory in different seasons. The elucidated variability creates the basis for selection of morphologic tags of vector transmitting capacity and ticks life cycle duration and other questions of their biology investigation which includes usage of collection materials accumulated previously.

Key words: taiga tick, morphologic characteristics, imago, females, the Irkutsk Region.

Authors:

Nikitin A. Ya., Kozlova Yu. A., Panova T. S. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 664047, Irkutsk, Trilissera St., 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Поступила 21.10.08.

Н.А.Видяева, Г.А.Ерошенко, Н.Ю.Шавина, О.С.Кузнецов, В.В.Кутырев

ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ ШТАММАМИ *YERSINIA PESTIS* ОСНОВНОГО И НЕОСНОВНЫХ ПОДВИДОВ И *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* НА МОДЕЛИ *CAENORHABDITIS ELEGANS*

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

Изучено формирование биопленки штаммами *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов и *Yersinia pseudotuberculosis* на модели нематоды *Caenorhabditis elegans*. Показано, что штаммы возбудителя чумы, не формирующие пигментированные колонии на среде с Конго красным (Pgm⁻), не образуют биопленку на головной и шейной поверхностях нематоды. Pgm⁺ штаммы основного и неосновных подвидов способны образовывать биопленку на кутикуле нематод *C. elegans*, хотя выраженность этого признака у разных штаммов была неодинаковой.

Ключевые слова: Возбудитель чумы, возбудитель псевдотуберкулеза, нематода, биопленка, пигментация.

Возбудитель псевдотуберкулеза *Yersinia pseudotuberculosis* является кишечным паразитом и передается фекально-оральным способом. Для выживания во внешней среде клетки псевдотуберкулезного микроба формируют так называемую биопленку – агрегаты бактерий, заключенные в полимерный матрикс, который представляет собой экзополисахарид, синтезируемый бактериями [8]. Чумной микроб произошел от псевдотуберкулезного несколько тысяч лет назад [6] и является внутриклеточным паразитом. Он передается через укус блошированной блохи. «Чумной блок», который формируется в преджелудке блохи во время кормления на инфицированном млекопитающем, также представляет собой биопленку [10]. Таким образом, роль биопленки у чумного микроба в процессе эволюции существенно изменилась. Она используется этим возбудителем для трансмиссии от зараженного животного к здоровому через укус блошированной блохи. В последнее время для изучения формирования биопленки у чумного и псевдотуберкулезного микробов предложена модель нематоды *Caenorhabditis elegans* как менее трудоемкая и более доступная, чем модель блохи [9]. Ранее показано, что штаммы *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, продуцирующие экзополисахарид, формируют биопленку на ротовой и боковой поверхностях нематоды, блокируя ее кормление [9, 11]. Исследования формирования биопленки на модели чумного микроба проводились на зарубежном лабораторном штамме основного подвида *Y. pestis* KIM. Однако на территории Российской Федерации и стран ближнего зарубежья расположены 42 природных очага чумы [5], на которых циркулируют не только штаммы высоковирулентного основного подвида, но и штаммы четырех неосновных подвидов – кавказского, алтайского, гиссарского и улзгейского. Они обладают рядом свойств, общих с близкородственным микробом – возбудителем псевдотуберкулеза, паразитируют на различных видах грызунов, передаются

разными видами блох и, по-видимому, являются более древними формами *Y. pestis* [3]. Изучение блокообразующей способности штаммов неосновных подвидов на модели блохи показало, что горно-алтайские, гиссарские [4] и кавказские [2] штаммы с меньшей эффективностью образуют блок преджелудка блохи, чем штаммы основного подвида. Однако причины меньшей способности неосновных подвидов к блокообразованию остаются до сих пор не установленными. Возможно, это связано с меньшей эффективностью образования биопленки на биотических поверхностях у неосновных подвидов чумного микроба.

В связи с малой изученностью продукции биопленки штаммами неосновных подвидов целью настоящей работы явилось сравнительное исследование способности образовывать биопленку штаммами возбудителя чумы основного и неосновных подвидов и возбудителя псевдотуберкулеза на биотической поверхности, а именно на модели нематоды *C. elegans*.

Материалы и методы

В работе были использованы 19 штаммов *Y. pestis* разных подвидов и 4 штамма *Y. pseudotuberculosis*. Изучение образования биопленки на биотической поверхности у штаммов основного и неосновных подвидов возбудителя чумы и штаммов возбудителя псевдотуберкулеза проводили на штамме нематоды *C. elegans* дикого типа N2 Bristol. Штамм нематоды был получен из *Caenorhabditis Genetics Center* (Университет Миннесоты, США) и поддерживался на *E. coli* OP50 – стандартном источнике питания *C. elegans*. Для продукции биопленки бактерии выращивали в течение ночи при 28 °C на агаре LB, готовили взвесь бактерий 10¹⁰ кл/мл в буфере M9 [7]. Аликвоты по 50 мкл раскапывали на среду для выращивания нематоды (NGM) на чашки Петри диаметром 9 см [7]. Бактериальный газон распределяли по

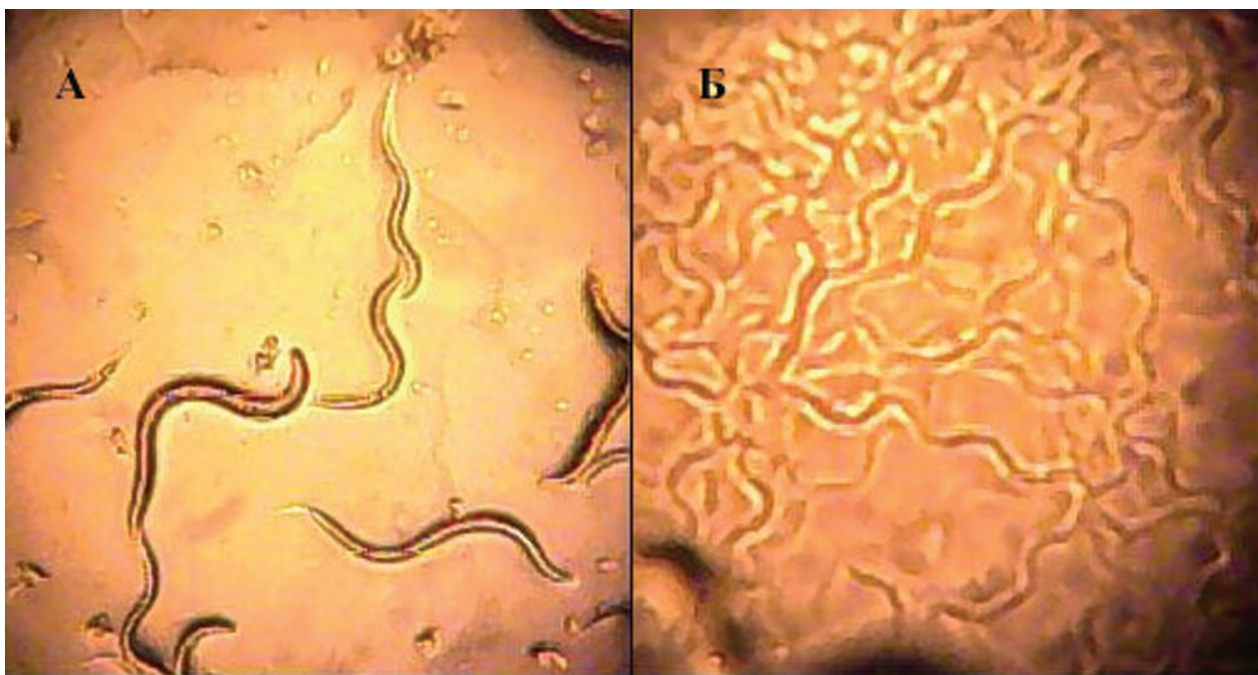


Рис. 1. Рост нематоды на штамме *Y. pestis* EV (Pgm⁻) – А, синусоидальные следы, оставленные *C. elegans* на газоне с *Y. pestis* EV – Б. ×80

агару шпателем, не доходя до края чашки 1–1,5 см. Перед нанесением нематод газоны выращивали в течение 16–24 ч при комнатной температуре. Затем на бактериальные газоны переносили беременных взрослых гермафродитов *C. elegans*, оставляли их для отложения яиц, и затем взрослых особей удаляли. Чашки культивировали при 17–20 °С в течение 3 дней. Формирование биопленки определяли на личиночных стадиях. Фотографирование объектов проводили с помощью WEB-камеры с разрешением 1,3 мегапикселя.

Для выявления признака пигментации клетки возбудителей чумы и псевдотуберкулеза высевали на цветную дифференциальную среду, содержащую Конго красный (производства института «Микроб», Саратов).

Результаты и обсуждение

По литературным данным, формирование биопленки у штамма основного подвида *Y. pestis* KIM, который относится к биовару *Mediaevalis*, коррелирует в основном с фенотипом пигментации (Pgm⁺). Было показано, что пигмент-негативный мутант этого штамма, у которого отсутствует *hms* локус, ответственный за фенотип пигментации, не способен вызывать формирование биопленки на *C. elegans* [12].

В наших экспериментах с использованием штаммов основного и неосновных подвигов, циркулирующих на территории РФ, стран СНГ и Монголии, также показано, что формирование биопленки на кутикуле нематод коррелирует с фенотипом пигментации. Pgm⁻ штаммы возбудителя чумы как основного (EV, A-161), так и неосновных (И-3069 – улэгейский,

И-2998 – алтайский) подвигов не продуцировали биопленку (рис. 1, А). Черви были способны свободно передвигаться по газону свойственным им синусоидальным образом, оставляя на газоне характерный след (рис. 1, Б). Штаммы *Y. pestis*, которые образовывали 30 % (И-2359 – алтайский) и 50 % пигментированных колоний (И-3131, А-1249, А-1725, А-1723 – гиссарские и А-1802 – таласский), блокировали незначительную часть нематод. На газонах, засеянных этими штаммами, встречались особи, у которых биопленка образовывалась на передней трети тела (рис. 2, Б). Она не препятствовала кормлению нематод, но ограничивала передвижение по газону, которое приобретало аберрантный характер и заключалось в том, что черви совершали резкие движения с большим изгибом тела. Нематоды, у которых биопленка формировалась на головной части, теряли способность передвигаться по газону, их тело продолжало изгибаться, как бы «пробуксовывая» на месте (рис. 2, А). Но большую часть нематод составляли свободно передвигающиеся особи, подобно тому, как это происходило у Pgm⁺ штаммов возбудителя чумы.

Практически такая же картина наблюдалась на газонах, засеянных культурами кавказских штаммов (818, 1146, 3544Арм.), которые на цветной дифференциальной среде растут в виде розовых колоний, в отличие от Pgm⁺ штаммов, которые формируют ярко красные колонии.

На газонах, засеянных штаммами, формирующими красные пигментированные колонии на цветной среде с Конго красным (И-1996 – основной подвид, И-2422, И-3130 – улэгейский, 2183 – алтайский, А-1728 – гиссарский и А-1815 – таласская группа),

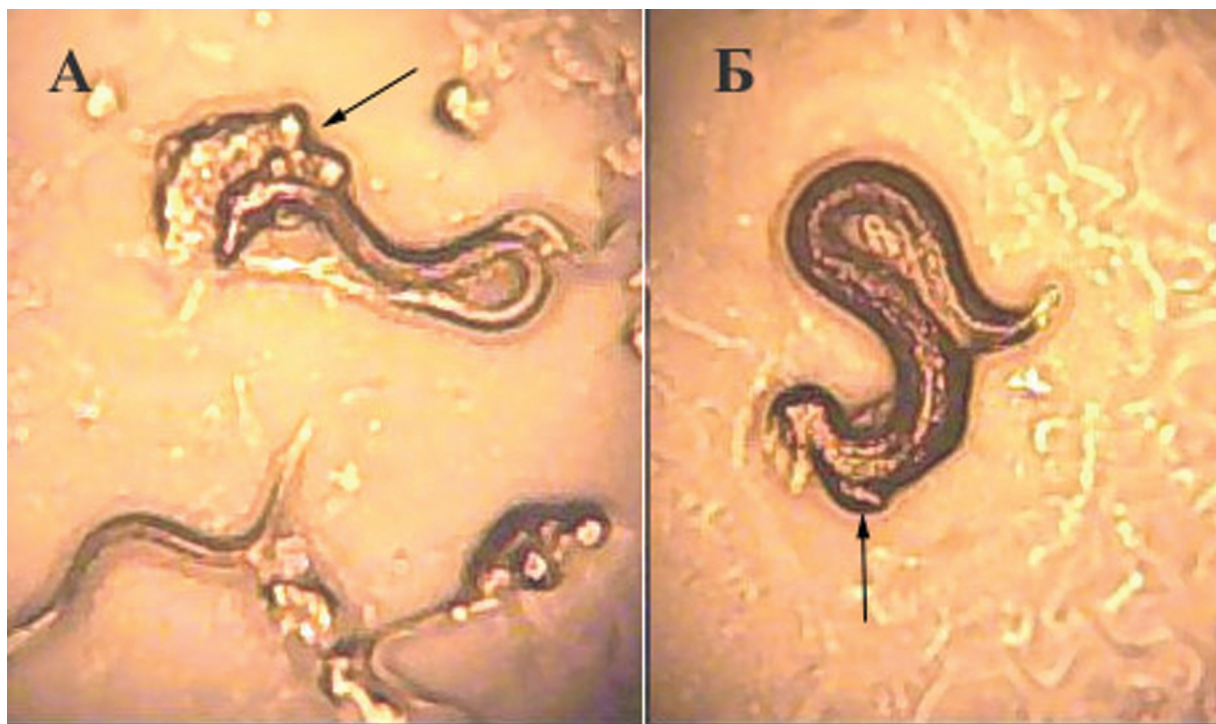


Рис. 2. Образование биопленки (показана стрелками) на головной (А) и шейной (Б) частях нематоды *C. elegans* штаммом *Y. pestis* A-1725 (Гиссарский). $\times 80$

также встречались и свободно живущие, и заблокированные особи *C. elegans* (рис. 2 А, Б), причем количество заблокированных и частично заблокированных нематод на этих штаммах было выше, чем на штаммах, которые формировали 30 и 50 % Pgm⁺ колоний на цветной среде с Конго красным и на кавказских штаммах. Помимо этого, на газонах с Pgm⁺ штаммами наблюдались формирования, состоящие из «клубков» личинок, окруженных матриксом (рис. 3), который, по-видимому, представляет собой биопленку. Подобные образования в литературе не описаны, поэтому говорить о природе внеклеточного матрикса, окружающего личинки, как о экзополисахаридах можно будет только после проведения специальных исследований.

Изученные нами штаммы псевдотуберкулезного микроба (2600, 417 – Бадхызские и 50-73, 312 – дальневосточные) не формировали биопленку на головной поверхности нематод. Особи свободно передвигались по поверхности газона характерным синусоидальным способом. По данным литературы, большинство штаммов возбудителя псевдотуберкулеза не способны блокировать нематод. G.W.Joshua *et al.* [11] показали, что из исследованного ими 41 штамма *Y. pseudotuberculosis*, которые представляли 21 серовар, 76 % не образовывали биопленку на поверхности нематод. По-видимому, изученные нами культуры возбудителя псевдотуберкулеза относятся к штаммам, не способным продуцировать биопленку.

Ранее нами было показано, что штаммы возбудителя чумы, сорбирующие Конго красный на цветной дифференциальной среде, и штаммы возбудителя псевдотуберкулеза на абиотической поверхности

(полистироловые чашки Петри) формируют хорошо выраженную биопленку [1], что также согласуется с литературными данными [11]. Вероятно, у *Y. pseudotuberculosis* механизмы формирования биопленок на биотических и абиотических поверхностях различаются между собой.

Таким образом, нами проведено исследование способности к образованию биопленки у штаммов основного и неосновных подвигов, выделенных на территории Российской Федерации и стран ближнего

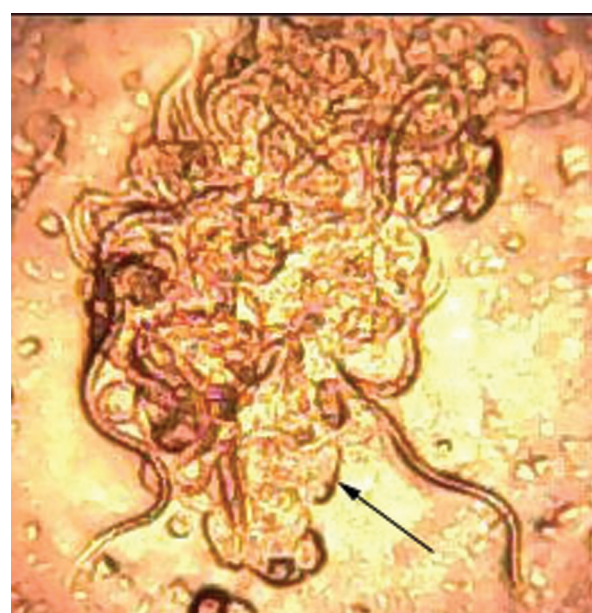


Рис. 3. Формирования, состоящие из «клубков» личинок, окруженных матриксом (показан стрелкой), на газоне *Y. pestis* И-1996. $\times 80$

зарубежья. Показано, что Pgm⁺ штаммы основного и неосновных подвидов, образующие пигментированные колонии на среде с красителем, способны образовывать биопленку на биотической поверхности – кутикуле нематод *C. elegans*, хотя выраженность этого признака у разных штаммов была неодинаковой.

Работа поддержана грантами РФФИ 07-04-0100 и 08-04-00731.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Видяева Н.А., Ерошенко Г.А., Шавина Н.Ю. и др. Изучение способности к образованию биопленок у штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов. Журн. эпидемиол. микробиол. и иммунобиол. Готовится к печати.
2. Елкин Ю.М., Осипова С.П., Юндин Е.В. К изучению эффективности блох обыкновенных полевок как переносчиков чумы. Особо опасные инфекции на Кавказе. Ставрополь; 1966. С. 78–80.
3. Куклева Л.М., Проценко О.А., Кутырев В.В. Современные представления о родстве возбудителей чумы и псевдотуберкулеза. Мол. ген. микробиол. и вирусол. 2002; 1:3–7.
4. Малафеева Л.С., Самойлова Л.В., Иванов В.А. О блокообразующей способности штаммов возбудителя чумы из разных природных очагов. Пробл. особо опасных инф. Саратов. 1979; 6:42–4.
5. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: «Медицина»; 2004. С. 10.
6. Achtman M., Zurth K., Morelli G. et al. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999; 96:14043–8.
7. Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics. 1974; 77:71–94.
8. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science. 1999; 284:1318–22.
9. Darby C., Hsu J.W., Ghori N. et al. *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. Nature. 2002; 417:243–4.
10. Jarrett C.O., Deak E., Isherwood K.E. et al. Transmission

of *Yersinia pestis* from an infectious biofilm in the flea vector. J. Infect. Dis. 2004; 190:783–92.

11. Joshua G.W.P., Karlyshev A.V., Smith M.P. et al. A *Caenorhabditis elegans* model of *Yersinia* infection: biofilm formation on a biotic surface. Microbiol. 2003; 149:3221–9.

12. Tan L., Darby C. A movable surface: formation of *Yersinia* sp. biofilms on motile *Caenorhabditis elegans*. J. Bacteriol. 2004; 186:5087–92.

Об авторах:

Видяева Н.А., Ерошенко Г.А., Шавина Н.Ю., Кузнецов О.С., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. Тел. (845-2) 26-21-31. E-mail: microbe@san.ru

N.A.Vidyaeva, G.A.Eroshenko, N.Yu.Shavina,
O.S.Kuznetsov, V.V.Kutyrev

Biofilm Formation in *Yersinia pestis* Strains of the Main and Non-Main Subspecies and *Yersinia pseudotuberculosis* on the Model of *Caenorhabditis elegans*

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Biofilm formation by *Yersinia pestis* strains of the main and non-main subspecies and *Yersinia pseudotuberculosis* was studied on the model of *Caenorhabditis elegans*. It was shown that plague agent strains that did not form pigmented colonies on a medium with Congo red (Pgm⁺) did not produce biofilm at the head and neck surfaces of nematode. Pgm⁺ strains of the main and non-main subspecies of plague microbe are able to form biofilm at cuticle of nematode *C. elegans*, the expression of this feature being unequal in various strains.

Key words: plague agent, pseudotuberculosis agent, nematode, biofilm, pigmentation.

Authors:

Vidyaeva N.A., Eroshenko G.A., Shavina N.Yu., Kuznetsov O.S., Kutyrev V.V. Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 15.12.08.

Ю.П.Волков, Г.А.Ерошенко

АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ МЕТОДОВ ПОСТРОЕНИЯ ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕРЕВЬЕВ, ИСПОЛЪЗУЕМЫХ ПРИ ОЦЕНКЕ ЭВОЛЮЦИОННОГО РОДСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ

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

В обзоре представлено описание некоторых методов построения филогенетических деревьев, используемых при оценке эволюционного родства различных организмов. Описаны преимущества и недостатки различных групп методов, применяемых при построении дендрограмм.

Ключевые слова: филогенетические деревья, дистанционно-матричные и дискретные методы построения дендрограмм, молекулярные часы эволюции.

Филогенетикой называют построение эволюционной истории некоторого набора организмов, которая обычно представлена в виде дерева (дендрограммы) с современными организмами (таксономическими группами, или таксонами), расположенными в его вершинах (листьях) и предковыми организмами, находящимися во внутренних узлах и корне дерева [8, 12]. Получение доступа к первичной структуре информационных макромолекул и возможность сравнения организмов по этим последовательностям создали новую науку – молекулярную филогенетику, новейший этап развития которой (генофилетика, иногда называемая филогеномикой) связан с изучением нуклеотидных последовательностей [12].

Сформировался также особый раздел новой филогенетики, разрабатывающий количественные методы оценки сходства организмов и конструирования филогенетических деревьев, – нумерическая филетика [7, 14]. В настоящее время эти методы в

филогенетике преобладают. По оценкам J.Felsenstein [5], количество доступных компьютерных программ превышает 385.

Имеется две различных формы представления филогенетической информации – кладограмма и филограмма [4, 11, 13]. Кладограмма (рис. 1, А) дает только взаимное расположение ветвей, длина ветвей при этом не известна. Филограмма (рис. 1, Б) показывает не только расположение ветвей, но и их длину. Деревья бывают двоичными (бинарными), когда от каждого узла отходит только две ветви и политомическими – более двух ветвей исходят из одного узла. Наиболее часто используются бинарные деревья, политомия является следствием малого расстояния между ветвями, неразрешимого с использованием выбранного метода.

Деревья бывают корневые, имеющие общего предка (рис. 1), и бескорневые (рис. 2), отражающие скорее взаимную связь между таксонами. В корне-

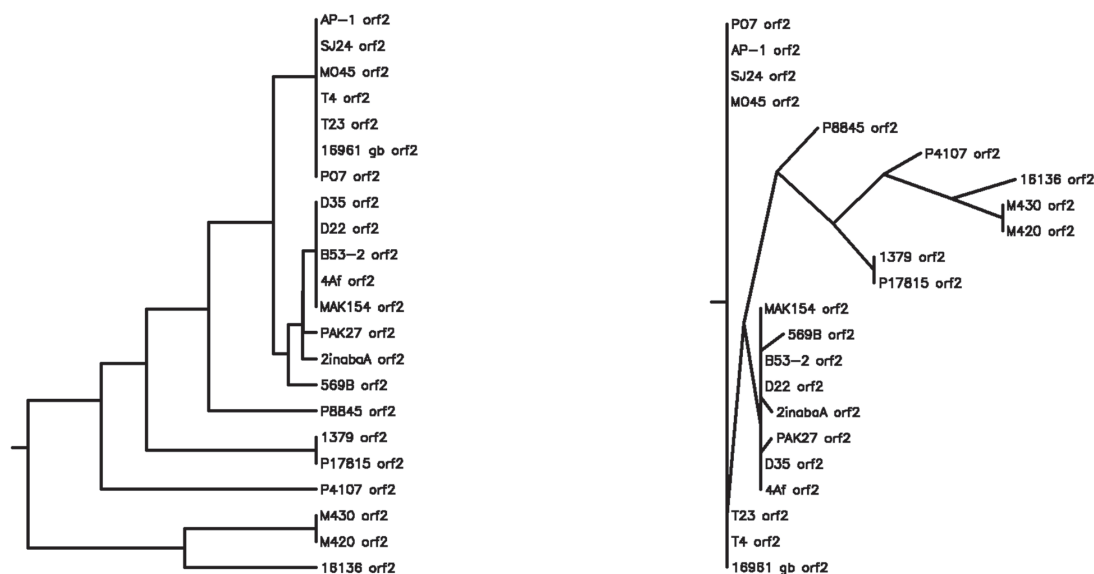


Рис. 1. Различные формы представления филогенетической информации:
А – филограмма, Б – кладограмма

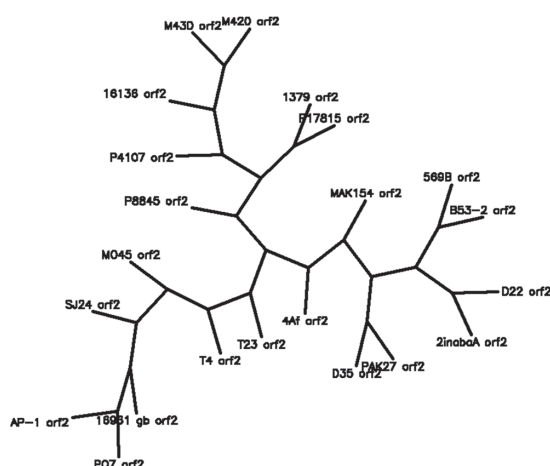


Рис. 2. Бескорневое дерево

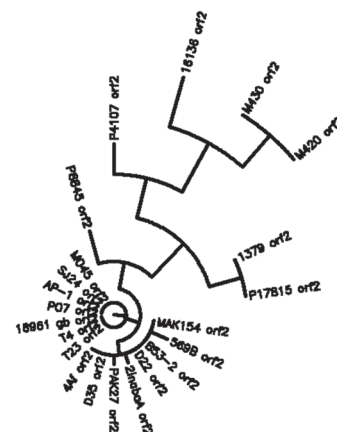


Рис. 3. Круговое дерево

вых деревьях, кроме взаимного расположения ветвей, можно измерять время эволюции, отсчитываемое от общего предка. Вид получаемого дерева зависит от выбранного метода его построения. Возможно искусственное преобразование бескорневого дерева в корневое, для чего используется два приема. В первом в качестве корня выбирается середина одной из ветвей, во втором корнем дерева часто выбирают некоторый таксон как наиболее удаленную группу (outgroup). Оба метода предполагают множественные решения [10], зачастую они не несут какого-либо биологического смысла и, в основном, применяются для улучшения вида дерева.

Реже используются другие формы представления дерева, например, круговая и некоторые другие (рис. 2, 3) [5].

При построении филогенетического дерева можно использовать последовательность нуклеотидов, если рассматриваются близкородственные организмы (ввиду более высокой скорости мутаций по сравнению с аминокислотами) или аминокислотную последовательность при анализе более удаленных организмов [3].

Для большинства используемых методов построения филогенетических деревьев в качестве входных данных необходимы выровненные последовательности оснований или аминокислот.

Стартовой процедурой для построения деревьев является выбор и выравнивание однотипных генов из сравниваемых видов организмов (таксонов). Различают парное (выравнивание двух последовательностей ДНК, РНК или белков) и множественное (выравнивание трех и более последовательностей). Наиболее популярной программой для множественного выравнивания последовательностей является Clustal (последняя версия Clustal X), представляю-

щая результаты в формате FASTA. Качество выравнивания оказывает большое влияние на топологию создаваемого дерева, поэтому, несмотря на достаточно высокое качество работы алгоритмов, для выравнивания зачастую требуется ручная корректировка данных [3].

После проведения выравнивания данные обрабатываются с помощью различных методов построения филогенетических деревьев. Имеются две группы различных методов построения филогенетических деревьев: дистанционно-матричные методы (UPGMA, NJ, FM) и дискретные методы. В дистанционно-матричных методах выровненные последовательности сравниваются друг с другом, вычисляются эволюционные дистанции между ними с помощью различных методов [1], и на основе полученных различий строится таблица различий (матрица расстояний) между каждой парой последовательностей. Из этого следует вывод, что размер и характер выборки может существенно повлиять на значения коэффициентов матрицы расстояний. Зачастую корректность выравнивания последовательностей и метод вычисления эволюционных дистанций оказывают гораздо большее влияние на топологию и длину ветвей дендрограммы, чем метод ее построения.

Далее на основе полученной матрицы строится филогенетическое дерево, в котором последовательности, имеющие меньшее расстояние, располагаются ближе друг к другу. Общим недостатком всех матричных методов является преобразование каждой последовательности в одно число, что неизбежно приводит к снижению количества информации.

Дискретные методы работают на принципе сравнения каждого отдельного символа в сопоставляемых последовательностях и в отличие от матричных методов не сводят сравниваемые последователь-

ности к единственному числу.

Дистанционно-матричные методы

Эти методы создают деревья по принципу объединения наименее отличающихся последовательностей или групп последовательностей. Пары наименее различающихся последовательностей объединяются в кластеры первого порядка, наименее различающиеся кластеры первого порядка – в кластеры второго порядка и т.д.

Метод попарного невзвешенного кластерирования с арифметическим усреднением UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) [2] наиболее простой, широко распространенный и имеющий высокую скорость работы, в результате применения которого строится единственное дерево с корнем.

Пары последовательностей, между которыми эволюционные дистанции минимальны, группируются, в первую очередь, и оказываются на соседних ветвях дерева. Эволюционное расстояние между двумя парными последовательностями считается равным двойной длине их ветви. Расстояние между двумя группами последовательностей равно среднему от значений матрицы расстояний каждой последовательности из одной группы с каждой последовательностью из другой.

Недостатками метода являются: предположение о равномерности скорости эволюции во всех ветвях последовательностей, т.е. работает принцип «моле-

кулярных часов», что на практике выполняется далеко не всегда, и требование к ультраметричности данных матрицы расстояний [1]. Неравномерная скорость мутаций в сравниваемых последовательностях, приводит к неправильному виду создаваемого дерева (рис. 4). Ультраметричность данных также выполняется далеко не всегда [1] и предполагает выполнение условия трех точек. Согласно этому условию для любых трех таксонов А, В и С расстояние между А и С должно не превышать максимального из расстояний АВ и ВС {dist AC ≤ max (distAB, distBC)}.

На практике данный метод нужно использовать с достаточной осторожностью, поскольку получаемое дерево, при несоблюдении вышеуказанных условий, может быть значительно искажено. Поэтому данный метод на практике используется достаточно редко, после проведения дополнительных тестов на соблюдение условий ультраметричности данных.

Метод связывания ближайших соседей (neighbour-joining) не накладывает требования ультраметричности исходных данных и позволяет строить адекватные деревья для данных с различной скоростью эволюции [2, 3]. Метод работает следующим образом. Первоначально предполагается полностью неразрешенное дерево (структура типа звезда – каждый таксон связан с общей центральной точкой). Выбирается одна из последовательностей и сравнивается поочередно со всеми остальными и определяется ближайшая к ней последовательность. После этого данные последовательности объединяются, на строящемся дереве появляется новый узел, и пересчитываются расстояния от него до остальных последовательностей. Объединенные последовательности далее не участвуют в построении дерева, и процесс повторяется для других последовательностей до момента исчерпания всех данных. При этом строится неукорененное дерево. Преимущества метода: высокая скорость и, следовательно, возможность обработки больших объемов данных (например, полученных при bootstrap анализе), возможность построения дерева при различной скорости мутаций, возможность коррекции для множественных замещений (multiple substitutions), простота алгоритма.

Недостатки метода заключаются в том, что строится только одно из возможных деревьев (определяется первой выбранной последовательностью), имеется сильная зависимость от используемой модели эволюции и исключается возможность применения принципа «молекулярных часов», то есть нельзя рассчитать примерное время дивергенции между сравниваемыми последовательностями.

Метод Фитча-Маргулиша (Felsenstein-Fitch-Margoliash) называемый также методом Fitch-Margoliash или FITCH) взвешенных средних квадратов.

В данном методе рассматриваются все возможные топологии деревьев с заданным числом таксонов и из них выбирается наилучшее [2].

Работа алгоритма начинается со случайного выбора двух таксонов в матрице расстояний, которые

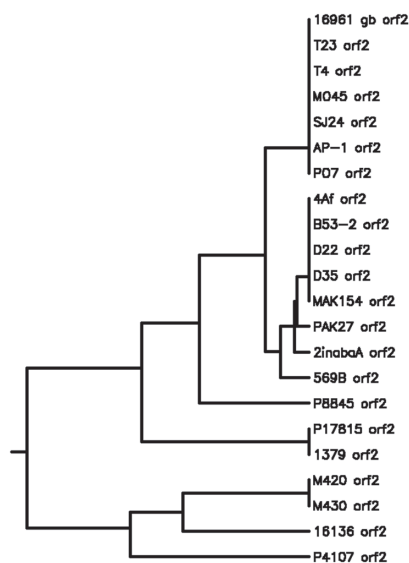


Рис. 4. Построение филогенетического дерева с помощью метода UPGMA на основе последовательностей фрагмента гена orf2 (373 п.н.) у штаммов *V. cholerae*:

серогруппы O1 биовара эльтор, вирулентные – N16961 (GenBank), T23, T4; O1 серогруппы классического биовара, вирулентные – MAK154, 569B, B53-2, D22, Zinaba A, PAK27, D35, 4Af; O139 серогруппы, вирулентные – P07, AP-1, SJ24, MO45; O1 серогруппы, авирулентные – 1379, P-17815; O139 серогруппы, авирулентные – M420, M430; не O1 / не O139 серогруппы, вирулентные – P16136; не O1 / не O139 серогруппы, авирулентные – P-8845, P-4107. Не полностью разрешенное дерево. Вирулентные вибрионы O1 серогруппы биовара эльтор и O139 серогруппы расположены на одной линии, хотя относятся к разным группам *V. cholerae*

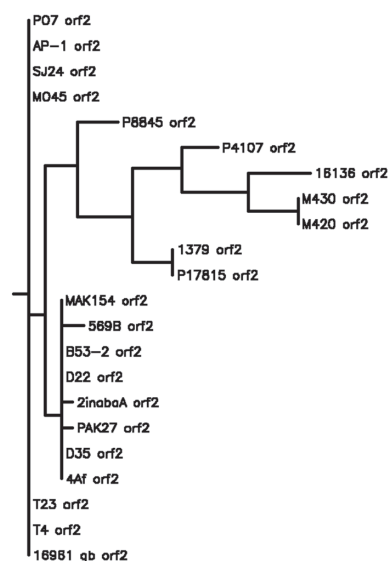


Рис. 5. Построение филогенетического дерева штаммов *V. cholerae* (ген *orf2*) с помощью метода Фитча–Моргулиса. Разрешенное дерево, на котором вирулентные вибрионы O1 серогруппы биовара эльтор и O139 вибрионы расположены на разных ветвях одной линии (близкие родственники)

объединяются и рассматриваются как две ветви, исходящие из общего узла. На основании решения трех линейных уравнений находят длину данных ветвей (причем не предполагается, что они равны друг другу). Далее эти объединенные таксоны рассматриваются как один, и пересчитывается матрица расстояний от данного объединенного таксона до всех оставшихся. После этого процесс повторяется для всех остальных пар таксонов до полного построения дерева. Затем все повторяют для следующей случайно выбранной начальной пары таксонов, и таким образом получают все возможные топологии деревьев для данного количества таксонов.

Из полученных деревьев выбирают дерево, имеющее минимальное отклонение между расстояниями, вычисленными по длине ветвей, и расстояниями, заданными в исходной матрице [3]. Имеется ряд модификаций данного метода, основанных на различных весах получаемых разностей [2]. Достоинства метода: не предполагается постоянной скорости эволюции («молекулярных часов») для сравниваемых последовательностей и, следовательно, можно строить деревья с различной длиной ветвей, исходящих из общего узла; анализируются все возможные топологии деревьев (рис. 5). Недостатком является большой объем анализируемых деревьев и низкая скорость вычислений.

Метод минимальной эволюции – *minimum evolution* (разработан Rzhetsky and Nei, 1992) строит деревья аналогично методу Fitch-Margoliash и анализирует все возможные топологии деревьев, при этом использует другой критерий выбора оптимального дерева. Оптимальным считается дерево, имеющее минимальную длину (длиной дерева называют сумму

длин всех входящих в него ветвей) [3]. Минимальная длина ветвей означает минимальное количество мутаций, а следовательно, «минимальную эволюцию». Достоинства и недостатки метода те же, что и у метода Fitch-Margoliash. Кроме того, показано, что для несмещенных данных получаемое дерево соответствует его истинной топологии. Однако при наличии в данных статистического смещения топология получаемого дерева может не соответствовать истинной, и, следовательно, необходима проверка исходных данных на статистическую достоверность (например, методом bootstrap).

При сравнении дистанционно-матричных методов, наилучшие результаты дают методы Fitch-Margoliash и минимальной эволюции (они дают близкие результаты). Метод ближайшего соседа является наиболее быстрым и создает деревья, близкие к получаемым методом минимальной эволюции [2]. Использование метода UPGMA не рекомендуется, ввиду весьма существенных допущений и ограничений, заложенных в его основе.

Дискретные методы

Метод максимальной экономии (*maximum parsimony*) является дискретным методом, в котором сравниваются не расстояния между выровненными последовательностями, а отдельные сайты в данных последовательностях [9]. Метод основан на анализе всех возможных топологий деревьев и выбора тех, для которых последовательность эволюционных шагов для получения анализируемых последовательностей минимальна. Другими словами, выбирается дерево с минимальной длиной (длиной дерева называют суммарную длину всех его ветвей). Шагами считаются замены оснований или аминокислот в секвенированной последовательности или случаи появления или потери сайта рестрикции.

В приложении к белкам метод рассматривает каждый сайт как символ с 20 возможными состояниями (аминокислоты) или может использовать генетический код и ряд мутаций в состояниях 1, 2, 3 кодона для объяснения наблюдаемого изменения аминокислоты (последний подход реализован в программе PROTPARS пакета PHYLIP (Felsenstein, 1993) [5].

Поскольку метод исследует все возможные топологии дерева, количество которых резко возрастает при увеличении числа исследуемых последовательностей, например для 10 таксонов число деревьев 34459425, а для 15 равно уже $2,13 \cdot 10^{15}$, его невозможно использовать при достаточно больших количествах таксонов (больше 12), даже на современных мощных компьютерах, ввиду слишком большого времени вычислений.

Для уменьшения времени вычислений рассматриваются не все сайты в сравниваемой последовательности, а только информативные. Сайт называется информативным, когда в нем имеется не менее двух разных типов нуклеотидов и каждый присутствует как минимум в двух исследуемых последовательностях. Рассмотрение только информативных

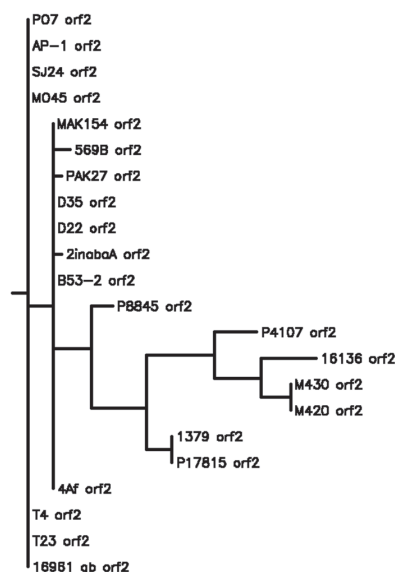


Рис. 6. Построение филогенетического дерева штаммов *V. cholerae* (ген *orf2*) с помощью метода максимальной экономии (maximum parsimony)

сайтов значительно сокращает время счета, однако подобное уменьшение приводит к снижению количества информации, а следовательно, к ухудшению качества построенного дерева.

Для каждого информативного сайта строятся все возможные деревья (количество которых определяется количеством сравниваемых последовательностей), и вычисляется количество мутаций (длины деревьев). Затем длины деревьев, одной топологии для всех информативных сайтов, складываются, и выбирается дерево с меньшей суммой (максимально экономное по количеству мутаций).

Имеется ряд модификаций данного метода [6], отличающихся различной величиной, добавляемой к длине дерева для различных мутаций (таким образом, делается попытка учета модели эволюции сравниваемых последовательностей). В модификации Wagner метода parsimony вероятность изменения состояния сайта с 2 на 3 равна вероятности изменения с 2 на 1. Под состоянием сайта подразумевается основание ДНК (4 состояния) или аминокислота (20 состояний). Величина, добавляемая к длине дерева, равна разности состояний (например, переход из состояния 4 в состояние 1 добавляет $4-1=3$). Данный метод хорошо описывает мутации с переходом сайта последовательно через все промежуточные состояния. Однако возможна прямая мутация из одного состояния в другое (например, из 1 в 3), для учета которой предложена разновидность Fitch parsimony, отличающаяся тем, что к длине дерева всегда добавляется 1 вне зависимости от разницы состояний сайтов. Разновидность Dollo parsimony учитывает возможную разницу в мутациях сайта в разных направлениях (вероятность мутации из состояния 3 в 4

значительно выше чем из 3 в 2).

Преимущества метода максимальной экономии: не уменьшает объем исходной информации (использует саму секвенированную последовательность), рис. 6, исследует все возможные топологии дерева, пытается предсказать последовательности предков. Недостатками являются: более низкая скорость работы по сравнению с дистанционно-матричными методами, использует не всю секвенированную последовательность, а только информативные сайты, не дает информацию о длине ветвей дерева (строит кладограмму), обладает высокой чувствительностью к смещению (bias) в исходных данных, не корректирует множественные мутации (не включает в себя эволюционную модель).

Поскольку метод может давать более одного оптимального дерева, для получения окончательного результата необходимо построение консенсусного дерева.

Метод наибольшего правдоподобия (likelihood method) [10] основан на максимизации критерия правдоподобия на основе выбранной модели. Это весьма мощный метод, позволяющий построить дерево для последовательностей с низким сходством и учитывающий модель эволюции.

В данном методе анализируются все сайты в сравниваемых последовательностях. Строятся и оцениваются все возможные топологии деревьев. Для каждой топологии и каждого сайта рассматриваются все возможные варианты мутаций, приводящие к заданным значениям сайта, и из них выбирается наиболее правдоподобный вариант. Наиболее правдоподобным считается вариант с минимальным количеством мутаций (критерий аналогичен используемому в методе максимальной экономии).

Вначале задается таблица, определяющая в соответствии с выбранной моделью эволюции коэффициенты мутаций из одного состояния нуклеотида (или аминокислоты) в другое. Далее на основе данной таблицы оценивается правдоподобие каждого строимого дерева. Из полученных значений выбирается наибольшее, которое и определяет наиболее правдоподобную структуру (топологию) дерева. После этого возможно изменить параметры эволюционной модели, и повторить все вычисления для новых значений. Возможно также в ходе вычислений изменять вероятности отдельных ветвей, оставляя остальные постоянными с целью максимизации критерия правдоподобия для данного дерева, что приведет к возможности вариации скорости эволюции каждого сайта в каждой последовательности отдельно.

Как видно, для получения данных в этом методе требуется весьма много вычислений, поэтому для снижения времени расчетов иногда строят деревья только для некоторой части сайтов. Возможно повторение данной процедуры для различной части сайтов и сравнение полученных деревьев с целью обнаружения наиболее правдоподобное дерево. Однако данный метод не дает гарантии обнаружения опти-

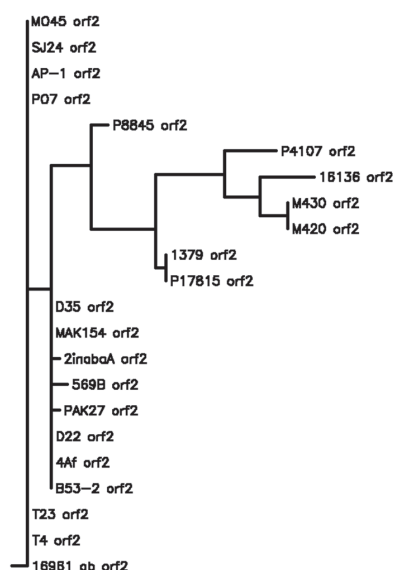


Рис. 7. Построение филогенетического дерева штаммов *V. cholerae* (ген *orf2*) с помощью метода наибольшего правдоподобия (likelihood method)

мального дерева.

Преимущества метода — одновременно с построением дерева (рис. 7) дается оценка его качества (правдоподобия), возможность задавать различные скорости мутаций, а также использовать различные модели эволюции (например, Jukes-Cuntor, Kimura и др.) [2, 8]. Данный метод позволяет обнаруживать сходство даже для эволюционно удаленных последовательностей. Главным недостатком его является наибольшая затратность с вычислительной точки зрения (по сравнению с остальными методами) и, следовательно, наименьшая скорость работы, что не позволяет проводить исследования более чем для 20 последовательностей.

Применение различных методов построения дерева зависит от многих факторов и нельзя с уверенностью выбрать априори тот или иной метод для каждого конкретного случая, однако рекомендуется следующая схема выбора [14]. Если выровненные последовательности имеют очень высокое сходство, то можно использовать метод максимальной экономии, если сходство не очень высокое, но заметное, используются матричные методы, если сходство весьма слабое, то используется метод максимального правдоподобия.

Для статистического подтверждения корректности создаваемых тем или иным методом деревьев было предложено много методов, однако, большая часть из них основана на алгоритме бутстрэп (bootstrap) [5]. Для каждого метода построения деревьев существует несколько специальных разновидностей метода бутстрэп (параметрический и непараметрический бутстрэп, Jack-knife). Наиболее часто используется метод непараметрического бутстрэпа.

Метод основан на построении серии данных путем создания многочисленных последовательностей из случайных выборок исходной последовательности и позволяет проверить наличие статистических ошибок и смещения (bias) в исходных данных, а следовательно, для проверки достоверности дерева. Метод бутстрэп работает следующим образом. Пусть имеются данные, состоящие из n выровненных последовательностей, содержащих m сайтов каждая. Далее создаются данные бутстрэп, в которых каждый сайт исходной последовательности повторяется случайное число раз. При этом длина создаваемой последовательности равна исходной.

После создания подобным образом нескольких сот новых последовательностей, для каждой из них строится дерево, потом все деревья объединяются в одно методом консенсуса. Для достоверности анализа количество бутстрэп данных должно быть не менее 100 (в идеале требуется m^m , где m — количество сайтов).

Если данные не содержат смещения (bias) и других стохастических искажений, то все деревья, построенные на основе бутстрэп данных, будут иметь практически одинаковую топологию. Если положение ветви в одном из новых деревьев соответствует ее положению в исходном, индекс BCL (bootstrap confidence level) данной ветви принимает значение 1, в обратном случае BCL — 0. Такая процедура выполняется для каждого вновь построенного дерева (несколько сот раз), и каждый раз индексы BCL определяются для всех ветвей. Далее для каждой ветви вычисляется среднее значение BCL (результат деления суммы значений всех индексов на количество деревьев). После этого строится согласованное с тестом бутстрэп дерево, в котором средние значения BCL для каждой ветви должны быть больше 0,95.

Следует отметить, что корректные результаты вышеописанный статистический тест дает только в том случае, если исследуемые последовательности содержат достаточное число нуклеотидов (или аминокислот).

В процессе случайного «перемешивания» участков последовательностей нарушается порядок их расположения, в результате чего последовательность с относительно большим числом нуклеотидов проявляет низкое сродство со всеми относительно короткими последовательностями. Таким образом, тест бутстрэп должен применяться только для выборок с примерно одинаковыми длинами последовательностей.

Метод jack-knife (складной нож) — специальный случай метода бутстрэп, в котором в исходных последовательностях удаляется случайным образом половина сайтов [14] и таким образом создается ряд последовательностей. Далее для каждой из полученных последовательностей строится дерево, затем ищется консенсусное дерево. Преимущество метода jack-knife состоит в ускорении работы за счет уменьшения длины последовательности, а недостаток заклю-

чается в том, что половина из данных утрачивается и, следовательно, результаты его применения нельзя сравнивать с результатами метода бутстрэп [9].

Параметрический бутстрэп (parametric bootstrap) [12] подобно методу бутстрэп также создает последовательность того же размера, что и исходные данные, однако при этом учитываются особенности эволюции последовательностей на основе выбранной модели (включая ранее определенную топологию дерева). Далее полученные данные обрабатываются аналогично методу бутстрэп.

Имеются также другие статистические тесты. Например, Kishino-Nasegawa и Shimodaira-Hasegawa тесты используются для сравнения значимости двух филогенетических деревьев и проверки насколько одна из топологий дерева лучше другой [3].

Работа поддержана грантами РФФИ № 07-04-00100, 08-04-00731 и 08-04-12082 офи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гасфилд Дж. Строки, деревья и последовательности в алгоритмах: Информатика и вычислительная биология. СПб.: Невский диалект, БХВ-Петербург; 2003. 654 с.
2. Baxevanis A.D., Francis-Ouellette B.F. Bioinformatics. A practical guide to the analysis of genes and proteins. N.Y.: John-Wiley; 2001. 470 p.
3. Chuang Peng. Distance based methods in phylogenetic tree construction. 2007. P. 1–11. Available from: <http://biochem218.stanford.edu/Projects%20Winter%202007/Peng1.pdf>
4. DeSalle R., Giribet G., Wheeler W. Techniques in molecular systematics and evolution. Birkhauser; 2002. 420 p.
5. Felsenstein J. PHYLIP – Phylogeny Inference Package (version 3.2). *Cladistics*. 1989; 5:164–6. Available from: <http://evolution.genetics.washington.edu/phytip.html>.
6. Foley P.L., Humphries C.J., Kitching I.L. *Cladistics: A practical course in systematics*. Oxford: Oxford Univ. Press; 1992. 507 p.
7. Friedman A., Costner C. *Tutorials in mathematical bio-*

sciences IV. Springer; 2007. 210 p.

8. Gascuel O. *Mathematics of evolution and phylogeny*. Oxford: Clarendon Press; 2004. 33 p.

9. Kitching I.J., Forey P.L., Humphries C.J., Williams D.M. *Cladistics. The theory and practice of parsimony analysis*. Oxford University Press; 1998. 228p.

10. Mount D.W. *Bioinformatics. Sequence and genome analysis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003. 550 p.

11. Page R. Parallel phylogenies: Reconstructing the history of host-parasite assemblages. *Cladistics*. 1994; 10:155–73.

12. Semple C., Steel M. *Phylogenetics*. Oxford University Press; 2003. 256 p.

13. Skelton P., Smith A. *Cladistics, a practical primer on CD-ROM*. Cambridge University Press; 2002. 79 p.

14. Xiong Jin. *Essential bioinformatics*. Cambridge University Press; 2006. 361 p.

Об авторах:

Волков Ю.П., Ерошенко Г.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. Тел. (845-2) 26-21-31. E-mail: microbe@san.ru

Yu.P.Volkov, G.A.Eroshenko

Analysis of the Efficiency of Some Methods of Construction of Phylogenetic Trees Used in Evaluation of Microorganisms Evolutionary Relations

Russian Anti-Plague Research Institute “Microbe”, Saratov

The review presents description of some methods of phylogenetic trees construction used in evaluation of different organisms evolutionary relations. Described are advantages and disadvantages of different groups of methods applicable for dendrograms construction.

Key words: phylogenetic trees, distance matrices and discrete methods of dendrograms construction, evolution molecular clock.

Authors:

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

Поступила 02.12.08.

И.В.Грачева, Т.Б.Каравая, Т.К.Меркулова, О.П.Плотников

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ КЛАССИФИКАЦИИ НЕКОТОРЫХ ПАТОГЕННЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДОВ *BACILLUS*, *BRUCELLA*, *BURKHOLDERIA*, *FRANCISELLA*, *VIBRIO*, *YERSINIA*

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

В работе рассмотрены современные принципы классификации прокариот, определение и границы прокариотического вида как единицы классификации и идентификации, критерии законности научных названий микроорганизмов. Прослежены основные изменения в классификации некоторых патогенных представителей родов *Bacillus*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Francisella*, *Vibrio*, *Yersinia*, в первую очередь патогенов I–II групп, после выхода в 1980 г. Одобренных списков названий бактерий. Рассмотрены перспективы развития и совершенствования прокариотической классификации, основанной на филогении 16S рПНК.

Ключевые слова: *Bacillus*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Francisella*, *Vibrio*, *Yersinia*, таксономия, классификация, филогения.

Классификация прокариотических организмов и систематика в целом являются очень динамичными разделами биологии. Новые методологии в изучении прокариот, накопление данных об их свойствах и структуре генома являются основой для совершенствования классификаций и их периодического пересмотра. Изменения в иерархической классификации прокариот в последние два десятилетия являются результатом использования молекулярных методов в таксономических исследованиях, в первую очередь секвенирования 16S рПНК или кодирующих ее генов (16S рДНК).

Цель классификации – упорядочение большого числа реально существующих в природе биологических объектов в систему, состоящую из формальных групп (таксонов) и основанную на принципах подобия и эволюционной связанности. Для прокариотической систематики характерен постоянный поиск объективных методов классификации изолятов в гомогенные группы для создания иерархической эволюционной системы, полезной в практической и научной работе. Первые фенотипические классификации были основаны на подобии классифицируемых объектов по морфологическим, затем физиологическим, биохимическим, хемотаксономическим признакам. Достижения в области молекулярной биологии в конце 70-х годов позволили начать разработку новых подходов к классификации, основанных на сравнении геномов. В 1987 г. экспертами Международного комитета по систематике бактерий (МКСБ, в последующем Международный комитет по систематике прокариот – МКСП) было определено, что самым надежным основанием для классификации прокариот является филогения, и она должна определять их таксономию.

Современное направление в таксономии прокариот называют таксономией согласия или полифазной таксономией [19, 37]. Она основана на учете филогенетических, генетических, фенотипических, хемотаксономических критериев при классификации.

В качестве филогенетического маркера, «молекулярного хронометра» эволюции прокариот, позволяющего измерять относительное время дивергенции организмов, в настоящее время принято использовать последовательности генов 16S рПНК или 16S рДНК, на основании которых построена современная иерархическая классификация [38].

Базовой единицей классификации биологических объектов является вид. Среди микробиологов нет согласия по вопросу определения вида у прокариот [2, 10, 11, 33, 34]. Экспертами МКСП сформулированы компромиссные рабочие определения прокариотического вида, как базовой единицы классификации и идентификации. Последнее определение было представлено в сообщении специального комитета по пересмотру определения вида в бактериологии в 2002 г. [37].

Описание прокариотического вида на современном этапе стало достаточно прагматичным. Экспертами МКСП рекомендованы формальные молекулярные критерии границ прокариотического вида, в соответствии с которыми расхождение в последовательностях 16S рПНК (16S рДНК) более 1 % свидетельствует о принадлежности бактерий к разным видам [37, 39]. Если процент гомологии более 99, помещение изолятов в один или два разных вида устанавливается по результатам ДНК-ДНК гибридизации. К одному виду, как правило, относят штаммы, показывающие не менее 70 % подобия ДНК с ДНК типового штамма, определяемого в строго стандартизированных условиях. Эти два подхода являются «золотыми» стандартами в современных таксономических исследованиях при определении границ вида (ДНК-ДНК гибридизация) и при выяснении филогенетических отношений таксонов более высоко ранга (секвенирование 16S рДНК) и применяются при описании подавляющего большинства новых видов. Однако данные рекомендации не должны использоваться как установленное правило. Для многих патогенных микроорганизмов значение ДНК-ДНК подо-

бия не учитывается для лучшей корреляции фено- и генотипических данных и экологических особенностей [37]. Учитывая недостатки метода гибридизации, применяемого в таксономии более 30 лет, МКСП поощряет исследователей использовать другие молекулярные методы при описании видов, показывающие высокую корреляцию с ДНК-ДНК гибридизацией в пределах описываемого таксона, чтобы в будущем дополнить и заменить основной на сегодня формальный критерий вида у прокариот [37].

Для упорядочения классификации на внутривидовом и внутривидовом уровне в качестве перспективных рассматриваются методы сравнения целых геномов (AFLP-анализ полиморфизма длин амплифицированных фрагментов, RAPD-метод амплификации полиморфной ДНК с произвольно выбранными праймерами, PFGE-гель-электрофорез в пульсирующем поле), отдельных кластеров генов, межгенных областей 16S-23S рДНК, мультилокусного секвенирования консервативных генов [37, 41]. В качестве альтернативы ДНК-ДНК гибридизации предлагается использование метода определения средней идентичности нуклеотидов (ANI), вычисленной от попарного сравнения общих генов двух штаммов [34]. На примере 70 близко связанных и полностью секвенированных геномов показано, что 70 % ДНК-ДНК подобие соответствует приблизительно 95 % средней идентичности нуклеотидов.

Фенотипические признаки являются такими же важными при описании нового вида, как и молекулярные, особенно те, которые позволяют дифференцировать его от других близкородственных видов. Специалистами в области популяционной генетики и микробной экологии обсуждается необходимость учета экологических особенностей в классификации при определении границ вида прокариот, а также предлагается введение нового подвидового таксона – эковара, определяемого на основе нуклеотидной последовательности метаболических генов [13, 15, 16, 33]. Экологический критерий имеет приоритетное значение в классификации патогенных бактерий, для которых достаточно четко определены занимаемые экологические ниши [37]. Определение границ таксонов высокого ранга в настоящее время остается более субъективным, существует необходимость в руководящих принципах для обозначения подвидов [18].

В современной прокариотической систематике не существует понятия «официальная классификация» [18]. Вопросы таксономии – это вопросы научного суждения и общего соглашения. Описание новых таксонов является ответственностью предложивших их авторов, при этом определены правила составления, предложения и использования научных названий таксонов. Международные согласованные принципы и правила номенклатуры сформулированы в Международном кодексе номенклатуры бактерий (Бактериологический кодекс, 1990 г., пересмотр), разработанном МКСБ [5, 17]. Бактериологический кодекс определяет использование в научном сообще-

стве только законно изданных названий таксонов, имеющих положение в официальной номенклатуре.

Название таксона является законно изданным в случае соблюдения одного из нижеследующих критериев [5, 17]:

1. Название процитировано в Одобренных списках названий бактерий (Validation Lists – Одобренные списки), изданных Юридической комиссией МКСБ в 1980 г. Одобренные списки временно устранили постоянную проблему систематики – синонимии. В литературе для большинства давно описанных микроорганизмов можно найти несколько различных латинских видовых названий, отражающих изменение принципов и критериев классификации и взглядов микробиологов на положение микроорганизма в существующей системе. За прошедшие почти 30 лет после опубликования Одобренных списков произошли значительные изменения в классификации прокариот, что естественно привело к изменению их номенклатуры. Из более чем 6500 законно изданных на 2002 г. названий бактерий треть уже является синонимами.

2. Название должно быть предложено в статьях, опубликованных в Международном журнале систематической бактериологии (МЖСБ до 1999 г. включительно) или в Журнале систематической и эволюционной микробиологии (МЖСЭМ после 2000 г.) в соответствии с требованиями Бактериологического кодекса, который определяет обязательное открытое депонирование типового штамма нового вида или референтного для подвида в двух признанных коллекциях, находящихся в разных странах, что гарантирует доступность штамма для исследователей.

3. Название может быть предложено в статьях, изданных в признанных научных журналах на доступном для большинства бактериологов языке в соответствии с правилами Бактериологического кодекса. Для получения статуса законно опубликованного названия позднее оно должно быть процитировано в Validation Lists, публикуемых в МЖСЭМ, и дата этой публикации определяет приоритет названия [18].

Хотя понятия «официальная прокариотическая классификация» не существует, и бактериолог может использовать любое законно опубликованное название, соответствующее правильной с его точки зрения классификации, на практике придерживаются классификации, приводимой в Руководстве (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) и Определителях Берджи (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology). Эти периодические издания учитывают все законно изданные названия прокариотических таксонов и соответствующие им изменения в классификации.

В 2001 г. вышел первый том второго издания Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, в который вошли законно опубликованные названия новых видов, их положение в классификации, основанной на филогении 16S рРНК. В новом издании представлены два новых таксона самого высокого ранга – домены и филумы [цит. по 9].

Использование молекулярно-генетических методов в таксономических исследованиях привело к изменению систематического положения давно описанных видов. Новые таксономические подходы были применены в исследованиях патогенных микроорганизмов, в том числе относимых к I–II группе патогенности. Изменился видовой состав родов и родовой состав семейств, включающих патогены, на основе филогении 16S рРНК определено их положение в современной иерархической классификации на уровне таксонов высокого ранга. Изменения в номенклатуре (в классификации на уровне рода и вида) произведены только для возбудителей сапа и мелиоидоза, что в значительной степени связано с действием Правила 56а Бактериологического кодекса, которое вводит понятие рискованного имени (*nomina periculosis*). Это название, использование которого в бактериологии подвергает опасности жизнь и здоровье людей [5, 17]. МКСП также рекомендовано в случае патогенных бактерий, имеющих медицинское и ветеринарное значение, не следовать текущим генетическим критериям при классификации, если это возможно (и должно), вести и сохранять номенклатуру, отличающую таксоны очень близкие в генетическом плане [37]. Для патогенных микроорганизмов стабильность номенклатуры рассматривается как важнейший принцип их классификации. Этой точки зрения придерживаются все бактериологи и Юридическая комиссия МКСП.

Рассмотрим основные изменения в классификации некоторых патогенных видов родов *Bacillus*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Francisella*, *Vibrio*, *Yersinia* после выхода Одобрённых списков (1980) на уровне таксонов, охваченных правилами Бактериологического кодекса (выше ранга подвида и ниже ранга класса).

Род *Bacillus*. Классификация рода *Bacillus* очень динамична. Это связано, во-первых, с описанием новых видов бацилл. Род *Bacillus* на 01.01.1980 г. включал 31 вид, объединённый на основании фенотипических признаков [6]. За последние 1,5 года описано 3 новых вида рода *Bacillus* [18]. Во-вторых, в последние годы род подвергся реклассификации. Разделение в восемь родов базировалось на секвенировании 16S рРНК, структуре пептидогликана, форме клетки и споры, способности к анаэробному росту, способности роста на средах с 10 % NaCl, составе жирных кислот [38]. Реклассификация рода и семейства идет медленными темпами, что связано с существенными различиями между фенотипической классификацией и филогенетическим положением видов.

Проблемой классификации бацилл является наличие генетически родственных видов, отличающихся по комплексу фенотипических признаков. Первые эксперименты по ДНК-ДНК гибридизации бацилл показали ДНК-ДНК подобие на уровне одного вида для *B. anthracis*, *B. cereus* и *B. thuringiensis*, классифицированных как самостоятельные таксоны на основании фенотипических признаков, значительная часть которых детерминирована плазмид-

ными генами, и экологических особенностей [18, 38]. Филогенетические исследования 3 видов бацилл свидетельствуют о более чем 99 % гомологии их 16S рРНК. Сравнительный анализ геномов показывает сохранение набора общих генов (75–80 %) между видами, что, вероятно, связано с недавним расхождением от общей предковой формы [44]. На основании молекулярных исследований бацилл и рекомендованных формальных критериев вида неоднократно предлагалось объединить *B. anthracis*, *B. cereus* и *B. thuringiensis* в один вид *B. anthracis* с тремя подвидами [19, 26]. По соображениям медицинской важности *B. anthracis* и *B. cereus*, способного вызывать пищевые отравления при накоплении в продуктах питания, экономического значения *B. thuringiensis*, используемого в биологической борьбе с насекомыми, в соответствии с Правилем 56а Бактериологического кодекса для этих бактерий сохранен видовой статус и оставлены разные названия в использовании [19, 37].

Возбудитель сибирской язвы является гомогенным видом по фено- и генотипическим свойствам, что связывают с низкой частотой внутривидовой и внутривидовой рекомбинации, обусловленной особенностями жизненного цикла: длительным нахождением в состоянии анабиоза в виде спор и взрывным развитием в период вегетативной фазы [44]. Систематическое положение возбудителя сибирской язвы в текущей классификации представлено в табл. 1.

На сегодняшний день род остается гетерогенным, и классификация бацилл будет подвергаться дальнейшим изменениям для создания монофилетических видов и родов.

Род *Brucella*. В соответствии с Одобрёнными списками род *Brucella* на 01.01.1980 г. включал 6 видов, классифицированных на основании фенотипических признаков, различной патогенности для человека и вида основного хозяина. Положение бруцелл в иерархической системе классификации долгое время не было определено, и его относили к родам с неясным систематическим положением [8].

Виды рода *Brucella* характеризуются ДНК-ДНК подобием в гибридизации на уровне одного геномо-

Таблица 1

Иерархическая классификация <i>B. anthracis</i> , <i>Brucella</i> spp., <i>B. mallei</i> , <i>B. pseudomallei</i>			
Ранг таксона	Название таксона		
Вид	<i>B. anthracis</i>	<i>Brucella</i> spp.	<i>B. mallei</i> , <i>B. pseudomallei</i>
Домен	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteria</i>
Филум	<i>Firmicutes</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>
Класс	<i>Bacilli</i>	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Betaproteobacteria</i>
Порядок	<i>Bacillales</i>	<i>Rhizobiales</i>	<i>Burkholderiales</i>
Семейство	<i>Bacillaceae</i>	<i>Brucellaceae</i>	<i>Burkholderiaceae</i>
Род	<i>Bacillus</i>	<i>Brucella</i>	<i>Burkholderia</i>
Типовой вид	<i>B. subtilis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. cepacia</i>

вида (более 70 %). На основании ДНК-ДНК гибридизации было предложено объединить известные виды бруцелл в один *B. melitensis* с 18 биоварами [43]. Изменения были обсуждены и одобрены на заседании подкомитета по таксономии бруцелл в Манчестере в 1986 году [28]. Юридической комиссии предложено изменить таксономическое мнение относительно рода, как моновидового, на основании только ДНК-ДНК гибридизации. Пять номенклатурных видов получили такой же статус, как и биовары, выделенные в пределах видов *B. abortus*, *B. ovis*, *B. melitensis*.

Новая классификация не нашла широкой поддержки среди бактериологов, и на практике продолжали использовать законно опубликованные в Одобренных списках названия классических видов бруцелл.

В 1994 г. на очередном заседании члены подкомитета по таксономии бруцелл отметили отсутствие четкой концепции вида и биовара в пределах рода *Brucella* и предложили сохранить классификацию, в которой номенклатурный вид эквивалентен эковиду, до получения дополнительных геномных доказательств моноопределенности рода [29]. Через 10 лет члены подкомитета на заседании в Испании единодушно высказались за возвращение к классификации бруцелл, существовавшей до 1986 г., когда каждый эковид бруцелл имел статус номенклатурного вида, и обратились в Юридическую комиссию с запросом об изменении таксономического мнения о роде *Brucella* [30]. По мнению подкомитета, «манчестерская» классификация рассматривается как правильная на основании генетических исследований, но вводит в заблуждение эпидемиологов, рассматривающих связанность номенклатурного вида с определенным видом животного и географическим распространением.

В соответствии с текущей классификацией род включает 9 видов. В 1994 г. появилось сообщение о выделении на побережье Шотландии от морских млекопитающих семейства китовых новых видов бруцелл. Названия новых видов *B. ceti* и *B. pinnipedialis* законно опубликованы в 2007 г. [31]. В период эпизоотии на юге Моравии в 1999 г. от больных диких полевок выделены культуры, соответствующие по фено- и генотипическим свойствам роду *Brucella*. Название нового вида *B. microti* законно опубликовано в 2008 г. [31].

Филогенетические исследования бруцелл показали их близкую связь с родами *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum* [9, 23, 29]. Положение бруцелл в иерархической системе классификации, представлено в табл. 1.

Современные таксономические исследования бруцелл направлены на разработку альтернативных фено- и генотипических критериев видов и биоваров рода *Brucella*. Подкомитет по таксономии бруцелл считает необходимым дополнить критерии определения видов рода *Brucella* с учетом новых видов,

развивать филогенетически-эволюционный подход к таксономии бруцелл, где важнейшими критериями вида являются патогенность и экологическая характеристика.

Род *Burkholderia*. В соответствии с Одобренными списками возбудители сапа и мелиоидоза входили в род *Pseudomonas*, включавший на 01.01.1980 г. 87 видов с типовым *P. aeruginosa*, объединенных на основании фенотипических признаков [6]. Род был гетерогенным по фенотипическим, хемотаксономическим свойствам видов, нуклеотидному составу ДНК [1]. Внутри рода по результатам ДНК-рРНК гибридизации было выделено 5 рРНК-групп, менее родственных друг с другом, чем с некоторыми другими грамнегативными родами. Исследовательской группой E.Yabuuchi *et al.* в 1993 г. на основании секвенирования 16S рРНК, ДНК-ДНК гибридизации, изучения жирно-кислотного состава, фенотипических свойств было предложено выделить II РНК гомологичную группу рода *Pseudomonas* в новый самостоятельный род *Burkholderia* с типовым видом *B. cepacia* [45]. Всего в новый род было включено 7 видов, в их числе возбудители сапа и мелиоидоза. После 1993 г. было законно опубликовано более 20 новых названий и новых комбинаций видов буркхолдерий [18]. Позднее часть видов буркхолдерий была выделена в новые роды семейства *Burkholderiaceae* (*Ralstonia*, *Pandorea*).

B. mallei и *B. pseudomallei* классифицированы как самостоятельные виды на основании фенотипических свойств, экологических и эпидемиологических особенностей. Молекулярные исследования двух патогенных видов показали высокий уровень их геномного родства, на основании чего выдвинута гипотеза о том, что *B. mallei* является клоном *B. pseudomallei*, возникшим в результате перехода к облигатному паразитическому образу жизни [24]. Для этих патогенов экологические особенности также имеют приоритетное значение перед молекулярными при определении таксономического положения. Считается, что именно экологические различия явились причиной изменения фенотипа и редукции генома возбудителя сапа [24, 34].

Род *Burkholderia* является типовым родом семейства *Burkholderiaceae*. Вместе с семействами *Oxalobacteriaceae*, *Alcaligenaceae*, *Comammodaceae* формирует порядок *Burkholderiales* класса *Beta-proteobacteria* (табл. 1).

Род *Francisella*. На 01.01.1980 г. род *Francisella* в соответствии с Одобренными списками включал 2 вида – *F. tularensis* и *F. novicida* [6]. Последний вид длительное время после описания был представлен одним штаммом, выделенным из воды в 1951 г. в штате Юта. Положение рода в иерархической системе классификации не было определено, и его относили к родам с неясным систематическим положением [8].

В 1989 г. по предложению D.G.Hollis *et al.* в род *Francisella* в качестве вида *F. philomiragia* были включены микроорганизмы, классифицированные

в 1969 г. как *Yersinia philomiragia* [6, 27]. Их предложение было основано на уникальном для рода *Francisella* составе жирных кислот изученных микроорганизмов, комплексе биохимических и физиологических признаков. Более поздние исследования по секвенированию 16S рРНК подтвердили филогенетическое родство двух видов [20]. В 2008 г. законно опубликовано название нового вида *F. piscicida* – патогена морских промысловых рыб [18, 35].

Внутривидовая классификация возбудителя туляремии была разработана отечественными исследователями Н.Г.Олсуфьевым и И.С.Мещеряковой еще в 70-х годах прошлого века [7]. Внутри вида *F. tularensis* было выделено 3 подвида *holarctica*, *nearctica*, *mediasiatica*, отличающиеся по патогенности для человека и животных, биохимическим свойствам, экологии, ареалу распространения. В 1983 г. названия подвигов были законно опубликованы и имеют положение в официальной номенклатуре [18]. Подвидовой эпитет самого вирулентного подвида *nearctica* в соответствии с правилами Бактериологического кодекса был заменен на *tularensis*.

Во втором издании Bergey's Manual of Systematic Bacteriology в вид *F. tularensis* включен четвертый подвид *novicida* [цит. по 32]. Название нового подвида не было предложено в строгом соответствии с правилами Бактериологического кодекса, но данная классификация, в соответствии с которой вид включает 4 подвида с разной патогенностью для человека, используется в научных публикациях. Изменение таксономического статуса *F. novicida* произведено на основании исследований D.G.Hollis et al., показавших 86–95 % ДНК-ДНК подобие *F. novicida* и *F. tularensis* [27]. На основании текущих молекулярных критериев вида было предложено включить их в вид *F. tularensis* в качестве биовара, а названия *F. tularensis* и *F. novicida* рассматривать как субъективные синонимы.

В соответствии с текущей классификацией род *Francisella* является типовым и пока единственным родом семейства *Francisellaceae*. Наиболее филогенетически близкими для франциселл являются эндосимбионты клещей вида *Wolbachia persica* [32]. Молекулярные исследования экологических объектов показывают, что патогенные для человека виды

рода *Francisella* представляют только часть биоразнообразия франциселл. Исследования объектов внешней среды на наличие ДНК *F. tularensis*, которые трудно выделить в чистой культуре из экологических образцов, показали наличие в пробах почвы ДНК, филогенетически родственные франциселлам, но не принадлежащие известным подвидам, видам и родам [13]. По мнению исследователей ДНК представляет новые подвиды, виды и рода семейства *Francisellaceae*. Поэтому классификация семейства *Francisellaceae* и рода *Francisella* будет меняться.

Род *Vibrio*. Род *Vibrio* является типовым и самым крупным родом семейства *Vibrionaceae*. На 01.01.1980 г. в него входило 9 видов, в том числе *V. cholerae*, включающий возбудителя тяжелого инфекционного заболевания [6]. После 1980 г. было описано и законно опубликовано более 50 названий новых видов в основном морских вибрионов [18]. Классификация рода очень динамична. Некоторые из вновь описанных видов были реклассифицированы в другие рода на основании филогенетических исследований как в пределах семейства *Vibrionaceae* (*Photobacterium*, *Salinivibrio*, *Grimontia*), так и вне его (*Colwellia*, *Shewanella*, *Moritella*) [18, 41].

Современная классификация вибрионов на уровне таксонов выше ранга рода основана в первую очередь на последовательности 16S рРНК. Семейство *Vibrionaceae* является одним из примеров несоответствия классификаций, основанных на классических фенотипических признаках и филогенетических критериях. С 1965 г. в семейство *Vibrionaceae* входили рода *Aeromonas* и *Plesiomonas*, объединенные на основании значительного фенотипического сходства их представителей. На основании ДНК-ДНК гибридизации и секвенирования 16S рРНК видов вибрионов род *Aeromonas* выделен в самостоятельное семейство *Aeromonadaceae*, а род *Plesiomonas* переведен в семейство *Enterobacteriaceae* [8]. В соответствии с текущей классификацией семейство включает пять родов – *Vibrio*, *Photobacterium*, *Salinivibrio*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, последние три выделены из рода *Vibrio* [18, 41].

Для упорядочения классификации вибрионов на внутриродовом уровне, наряду с ДНК-ДНК гибридизацией широко используется метод AFLP, мультилокусное секвенирование генов «домашнего хозяйства» (housekeeping genes) [41, 42]. Метод AFLP рассматривается для вибрионов как альтернатива ДНК-ДНК гибридизации. Подобие образцов AFLP на уровне 60–70 % соответствует ДНК-ДНК подобию в гибридизации выше 70 % [41]. Филогенетически информативными для вибрионов являются последовательности генов 23S рДНК, *pyrH*, *gapA*, *gyrB*, *hsp60*, *rpoA*, *recA*, характеризующиеся большей дифференцирующей способностью, чем 16S рДНК.

Типовой вид рода *Vibrio* – *V. cholerae*. Вид *V. cholerae* является гетерогенным по фенотипическим свойствам входящих в него вибрионов, в первую очередь по составу О-антигена и патогенности

Таблица 2

Иерархическая классификация видов
F. tularensis, *V. cholerae*, *Y. pestis*

Ранг таксона	Название таксона		
Вид	<i>F. tularensis</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>Y. pestis</i>
Домен	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Bacteria</i>
Филум	<i>Proteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>
Класс	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>
Порядок	<i>Thiotrichales</i>	<i>Vibrionales</i>	<i>Enterobacteriales</i>
Семейство	<i>Francisellaceae</i>	<i>Vibrionaceae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
Род	<i>Francisella</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Yersinia</i>
Типовой вид	<i>F. tularensis</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>Y. pestis</i>

для человека. Вид традиционно подразделяют на внутривидовые таксоны (биовары, серовары, серогруппы). В 1985 г. по результатам ДНК-ДНК гибридизации в вид включены вибрионы, описанные как *V. albensis*, а название вида рассматривается в качестве синонима *V. cholerae* [4, 25].

Филогенетические исследования гена *recA* холерных вибрионов подтвердили гетерогенность вида [40]. В соответствии с этим исследованием токсигенные эпидемически опасные штаммы холерного вибриона, независимо от серогруппы, формировали два компактных кластера, филогенетически не связанных с нетоксигенными штаммами вида. В то же время авторами показано отсутствие строгой корреляции между серотипом и филогенией гена *recA*, что связывают с горизонтальным переносом генов, детерминирующих синтез боковых цепей липополисахарида. Положение вида *V. cholerae* в современной иерархической классификации представлено в табл. 2.

Будущие филогенетические исследования вибрионов безусловно приведут к изменению текущей классификации рода и семейства. Уже сегодня предлагается на основании секвенирования филогенетически значимых последовательностей 16S рДНК, *recA*, *rpoA*, *pyrH* выделить роды *Photobacterium*, *Salinivibrio*, *Enterovibrio* + *Grimontia* в самостоятельные семейства, а кластеры филогенетически родственных видов рода *Vibrio* – в самостоятельные роды [41]. Независимо от будущих изменений типовой вид рода *Vibrio* – *V. cholerae* всегда будет связан с данным родом и семейством *Vibrionaceae*.

Род *Yersinia*. Род *Yersinia* на 01.01.1980 г. включал 5 видов [6]. В 1989 г. вид *Y. philomiragia* был реклассифицирован в род *Francisella* [27]. За период с 1981 по 2008 год было описано 8 новых видов иерсиний *Y. aleksiciae*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. rohdei*, *Y. aldovae*, *Y. kristensenii*, *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*, последние 4 выделены из гетерогенного по фенотипическим признакам вида *Y. enterocolitica* [8, 18]. В 2002 г., по предложению H. Neubauer, внутри вида *Y. enterocolitica* выделено два подвида *enterocolitica* и *paleartica*, включающие соответственно американские и европейские изоляты [18]. Обсуждается возможность выделения третьего подвида [22]. Последний из описанных видов иерсиний *Y. aleksiciae* выделен из вида *Y. kristensenii* на основании секвенирования 16S рДНК, ДНК-ДНК гибридизации и фенотипа [36].

Типовой вид рода *Y. pestis* – возбудитель тяжелого инфекционного заболевания. Использование молекулярно-генетических подходов в таксономических исследованиях иерсиний показало геномное родство *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* на уровне одного вида (ДНК-ДНК подобие выше 70 %). На основании ДНК-ДНК гибридизации H. Bercovier *et al.* предложили объединить два вида в один *Y. pseudotuberculosis* с подвидами *pseudotuberculosis* и *pestis* [14]. Новые названия были законно опубликованы в 1980 г. [18]. Впоследствии Юридической комиссией

по настоянию медицинской общественности законно изданные названия были помещены в список отвергнутых названий [17]. Последующие молекулярные исследования двух видов иерсиний подтвердили их геномное родство и позволили выдвинуть гипотезу о том, что *Y. pestis* является клоном *Y. pseudotuberculosis*, возникшим 20000 лет назад [12].

Внутри вида *Y. pestis* выделено 4 биовара *antiqua*, *mediavalis*, *microtus*, *orientalis*, на которые не распространяются принципы и правила Бактериологического кодекса [3, 5]. Названия описанных отечественными исследователями подвигов чумного микроба – *pestis*, *altaica*, *caucasica*, *hissarica*, *ulegeica* не были опубликованы в соответствии с правилами Бактериологического кодекса. Поэтому сегодня подвиды не имеют положения в официальной международной номенклатуре [3, 15]. Положение *Y. pestis* в текущей классификации представлено в табл. 2.

Современная иерархическая классификация прокариот, базирующаяся на гомологии 16S рДНК и 16S рДНК, подвергается критике и безусловно будет меняться [2, 15, 16]. По оптимистическому мнению ведущих систематиков, эти изменения не будут столь масштабными и радикальными как последние, а произойдут в пределах таксонов общего генеалогического происхождения, даже в случаях изменения формальных видовых границ, поскольку филогения является надежным основанием для прокариотической классификации [38]. Классификация патогенов I–II групп остается достаточно стабильной, что связано с рекомендациями МКСП, в соответствии с которыми экологические особенности патогенных микроорганизмов имеют приоритетное значение перед текущими молекулярными границами прокариотического вида. Современное состояние знаний о молекулярно-генетической организации прокариот еще не позволяет говорить о ревизии формальных видовых границ, которые, с учетом практики классификации патогенов, являются слишком широкими [16, 34]. Необходимо накопление и глубокий анализ данных о молекулярной организации различных таксономических групп бактерий, в том числе патогенных видов, для создания теоретической базы определения вида у бактерий. МКСП ориентирует микробиологов на поиск филогенетических маркеров, независимых от 16S рДНК генов, адаптацию инновационных методов молекулярной биологии для целей прокариотической систематики, таких как мультилокусное секвенирование метаболических генов, методы сравнения полных геномов, в том числе DNA arrays [37]. Среди систематиков найдено согласие, что филогенетическая классификация может быть улучшена на основе мультигенных деревьев, созданных на базе последовательностей не менее пяти консервативных генов, кодирующих метаболические функции. Альтернативные филогенетические маркеры должны отвечать нескольким требованиям. Гены должны быть широко распространены среди геномов прокариот, присутствовать в единственной

копии в пределах данного генома, содержать значительный объем информации (900–2250 нуклеотидов), должна быть высокая корреляция филогении таксонов, определенной на основании этой последовательности, 16S рДНК и ДНК-ДНК подобия [37]. Реализация проектов по секвенированию геномов прокариот позволило выявить гены, перспективные для филогенетических исследований на уровне таксонов разного ранга [цит. по 41].

Будущее прокариотической классификации связано с развитием не только микробиологии, включая популяционную генетику и микробную экологию, но и математики, разрабатывающей алгоритмы методов классификации, информатики, создающей интегрированные базы микробиологических данных, способные анализировать возрастающие объемы информации о свойствах и структуре генома прокариот и делающие определение таксономических рангов более прагматическим.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Блохина И.Н., Леванова Г.Ф., Антонов А.С. Систематика бактерий (с основами геносистематики). Нижний Новгород; 1992. 170 с.
2. Головлев Е.Л. Микробиология. 1998; 67(2):281–6.
3. Домарадский И.В. Чума. М.: Медицина; 1998. 175 с.
4. Изменения в таксономии и номенклатуре бактерий. Клини. микробиол., антимикроб. химиотер. 2004; 6(1):4–9.
5. Международный кодекс номенклатуры бактерий. М.; 1978. 207 с.
6. Одобренные списки названий бактерий. Ереван; 1982. 420 с.
7. Олсуфьев Н.Г., Мецгерякова И.С. Внутривидовая таксономия возбудителя туляремии *Francisella tularensis* McCoy et Chapin. Журн. гигиены, эпидемиол., микробиол. и иммунол. 1982; 26(3):281–91.
8. Определитель бактерий Берджи. 9-е изд. М.; 1997. 799 с.
9. Романовская В.А., Рокитко П.В. Второе издание «Bergey's Manual of Systematic Bacteriology». Микробиол. журн. 2006; 68(3):72–85.
10. Рятис Л.А., Беляков В.Д. Бактериальные виды и их структура. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1997; 5:110–4.
11. Рятис Л.А. Концепция бактериального вида и эволюция генома прокариот. Там же. 2006; 6:97–101.
12. Achtman M., Zurth K., Morelli G. et al. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1999; 96:14043–8.
13. Barns S.M., Grow C.C., Okinaka R.T. et al. Detection of diverse new *Francisella*-like bacteria in environmental samples Appl. Environ. Microbiol. 2005; 71(9):5494–5500.
14. Bercovier H., Molaret H., Alonso J. et al. Intra- and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and its relationship to *Yersinia pseudotuberculosis*. Curr. Microbiol. 1980; 4(4):225–9.
15. Cohan F.M. Towards a conceptual and operational union of bacterial systematics, ecology, and evolution. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2006; 361(1475):1985–96.
16. Cohan F.M., Perry E.B. A systematics for discovering the fundamental units of bacterial diversity. Current Biology. 2007; 17(10):R373–86.
17. Definitions and abbreviations. Available from: <http://www.bacterio.cict.fr>.
18. List of bacterial names with standing in nomenclature Available from: <http://www.bacterio.cict.fr>.
19. Ezéby J.P. Definitions d'une genospecies et d'une espece bacterienne. Available from: <http://www.bacterio.cict.fr>.
20. Forsman M., Sandström G., Sjöstedt A. Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. Int. J. Syst. Bacteriol. 1994; 44(1):38–46.
21. Gevers D., Dawyndt P., Vandamme P. et al. Stepping stones towards a new prokaryotic taxonomy. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2006; 361(1475):1911–6.
22. Gierczyński R., Golubov A., Neubauer H. et al. Development of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for *Yersinia enterocolitica* subsp. *paleartica* and its application to bioserogroup 4/O3 subtyping. J. Clin. Microbiol. 2007; 45(8):2508–15.
23. Godfroid J., Cloeckaert A., Liautard J.-P. et al. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. Vet. Res. 2005; 36(3):313–26.
24. Godoy D., Randle G., Simpson A.J. et al. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. J. Clin. Microbiol. 2003; 41(5):2068–79.
25. Hada H.S., Stemmler J., Grossbard M.L. et al. Characterization of non-O1 serovar *Vibrio cholerae* (*Vibrio albensis*). Syst. Appl. Microbiol. 1985; 6(2):203–9.
26. Helgason E., Okstad O.A., Caugant D.A. et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. Appl. Environ. Microbiol. 2000; 66(6):2627–30.
27. Hollis D.G., Weaver R.E., Steigerwalt A.G. et al. *Francisella philomiragia* comb. nov. (formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* biogroup *novicida* (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease. J. Clin. Microbiol. 1989; 27(7):1601–8.
28. International Committee on Systematic Bacteriology; Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*. Correspondence Report (Interim Report), 1991–1993. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006; 56:1167–8.
29. International Committee on Systematic Bacteriology; Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*: Minutes of the meeting, 5 and 7 July 1994, Prague, Czech Republic. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006; 56:1169–70.
30. International Committee on Systematics of Prokaryotes; Subcommittee on the taxonomy of *Brucella*: Minutes of the meeting, 17 September 2003, Pamplona, Spain. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006; 56:1173–5.
31. International Committee on Systematics of Prokaryotes. Subcommittee on the Taxonomy of *Brucella*. Available from: <http://www.the-ictp.org/subcoms/Brucella.htm>
32. Keim P., Johansson A., Wagner D.M. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 2007; 1105:30–66.
33. Koeppl A., Perry E.B., Sikorski J. et al. Identifying the fundamental units of bacterial diversity: a paradigm shift to incorporate ecology into bacterial systematics. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 2008; 105(7):2504–9.
34. Konstantinidis K.T., Ramette A., Tiedje J.M. The bacterial species definition in the genomic era. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 2006; 361(1475):1929–40.
35. Ottem K.F., Nylund A., Karlsbakk E. et al. New species in the genus *Francisella* (Gammaproteobacteria: Francisellaceae); *Francisella piscicida* sp. nov. isolated from cod (*Gadus morhua*). Arch Microbiol. 2007; 188(5):547–50.
36. Sprague L.D., Neubauer H. *Yersinia aleksiciae* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2005; 55:831–5.
37. Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G.M. et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002; 52:1043–7.
38. Stackebrandt E. Defining Taxonomic Ranks. In: Dworkin M., Falkow S. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. 3rd ed. Springer, 2006. P. 29–57.
39. Stackebrandt E., Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. Microbiol. Today. 2006; 33:152–5.
40. Stine O.C., Sozhamannan S., Gou Q. et al. Phylogeny of *Vibrio cholerae* based on recA sequence. Infect. Immun. 2000; 68(12):7180–5.
41. Thompson F.L., Iida T., Swings J. Biodiversity of vibrios. Microbiol Mol Biol Rev. 2004; 68(3):403–31.
42. Thompson F.L., Gevers D., Thompson C.C. et al. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. Appl. Environ. Microbiol. 2005; 71(9):5107–15.
43. Verger J.M., Grimont F., Grimont P.A.D., Grayon M. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridization. Int. J. Syst. Bacteriol. 1985; 35(3):292–5.
44. Vilas-Boas G.T., Peruca A.P.S., Arantes O.M. Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. Can. J. Microbiol. 2007; 53(6):673–87.
45. Yabuuchi E., Kosako Y., Oyaizu H. et al. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. Microbiol. Immunol. 1992; 36(12):1251–75.

Об авторах:

Грачева И.В., Караваева Т.Б., Меркулова Т.К., Плотников О.П. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. Тел. (845-2) 26-21-31. E-mail: microbe@san.ru

I.V.Gracheva, T.B.Karavaeva, T.K.Merkulova,
O.P.Plotnikov

**Present-Day State of Classification
of Some Pathogenic Representatives of the *Bacillus*, *Brucella*,
Burkholderia, *Francisella*, *Vibrio*, *Yersinia* Genera**

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Considered are modern principles of prokaryotes classification, definition and limits of prokaryotic species as classification and identification unit, criteria of validity of scientific names of the microorganisms. Traced are main alterations in classification of some pathogenic representatives of the *Bacillus*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Francisella*, *Vibrio*, *Yersinia* genera, first of all – of

I–II groups pathogens, after Validation Lists of Bacterial Names were issued in 1980. Prospects of development and refinement of prokaryotic classification based on 16S rRNA phylogeny are discussed.

Key words: *Bacillus*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Francisella*, *Vibrio*, *Yersinia*, prokaryotic classification, phylogeny.

Authors:

Gracheva I.V., Karavaeva T.B., Merkulova T.K., Plotnikov O.P. Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 18.09.08.

С.В.Дентовская, М.Е.Платонов, Т.И.Комбарова, Г.М.Титарева, И.В.Бахтеева, Р.З.Шайхутдинова,
С.А.Иванов, А.П.Анисимов

УКОРОЧЕНИЕ КОРА ЛИПОПОЛИСАХАРИДА СНИЖАЕТ ВИРУЛЕНТНОСТЬ *YERSINIA PESTIS*

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

Ранее с помощью сайт-направленного мутагенеза генов, отвечающих за биосинтез корового олигосахарида липополисахарида, получен изогенный набор штаммов *Y. pestis*, включающий штамм дикого типа 231 и его производные с делециями структурных генов *wabD*, *waaL*, *waaQ*, *waaE* и *hldE*. В этой работе показано, что постепенное укорочение корового олигосахарида сопровождается снижением вирулентности при подкожном способе заражения мышей и морских свинок.

Ключевые слова: чумной микроб, ЛПС, кор, вирулентность.

Липополисахарид (ЛПС) – основной фактор патогенности грамотрицательных бактерий. В ходе своей дивергенции с возбудителем псевдотуберкулеза чумной микроб утратил способность синтезировать S-форму ЛПС [7], что необходимо для проявления способности протеазы Pla активировать плазминоген. О-боковые полисахаридные цепи, характерные для S-формы ЛПС, синтезируемой *Yersinia pseudotuberculosis*, ингибируют активаторную способность Pla [6], что коррелирует со значительно выросшей, по сравнению с *Y. pseudotuberculosis*, вирулентностью *Y. pestis* при подкожном способе заражения животных [4]. В серии предварительных экспериментов мы определили гены, ответственные за синтез корового олигосахарида *Y. pestis*, сконструировали наборы изогенных мутантов, отличающихся по степени редуцированности кора, и установили, что постепенное укорочение олигосахарида сопровождалось повышением чувствительности бактерий возбудителя чумы к действию факторов врожденного иммунитета

(комplementу сыворотки и катионным пептидам) [5] и утратой активатором плазминогена фибринолитической и плазмокоагуляционной активностей [2]. Целью настоящего исследования была оценка влияния степени укорочения корового олигосахарида на вирулентность *Y. pestis* при подкожном заражении мышей и морских свинок.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы и условия культивирования. Используемые в работе штаммы *Y. pestis* представлены в таблице. Бактерии выращивали на питательной среде на основе сердечно-мозговой вытяжки (ВНИ), pH 7,2. ВНИ агар с 5 % сахарозы использовали для селекции двойных рекомбинантов *Y. pestis*, полученных с помощью гибридных плазмид на основе суицидного вектора pCVD442 [3]. В случае необходимости в питательные среды добавляли антибиотики: ампициллин – 100 мкг/мл, канамицин –

Вирулентность экспериментальных штаммов возбудителя чумы при подкожном заражении лабораторных животных

Штаммы <i>Y. pestis</i>	Форма олигосахарида кора *	Мыши		Морские свинки	
		LD ₅₀ КОЕ **	средние сроки жизни, сут	LD ₅₀ КОЕ	средние сроки жизни, сут
231	Gal/DD-Hep-Hep Glc Ko GlcNAc---Hep-Hep-Kdo-LA	2 (1–4)	4,7±1,2	7 (2–27)	8,5±0,8
231ΔwabD	DD-Hep-Hep Glc Ko GlcNAc---Hep-Hep-Kdo-LA	8 (1–32)	4,2±0,7	н/д ***	н/д ***
231ΔwaaL	Gal/DD-Hep-Hep Glc Ko Hep-Hep-Kdo-LA	13 (2–50)	4,5±0,8	32 (8–126)	9,0±1,5
231ΔwaaQ	Glc Ko GlcNAc---Hep-Hep-Kdo-LA	5 (1–16)	4,3±0,9	15 (4–58)	10,0±1,1
231ΔwaaE	Ko GlcNAc---Hep-Hep-Kdo-LA	32 (8–126)	7,9±0,8	> 10 ⁴	> 21
231ΔhldE	Ko Kdo-LA	2,0·10 ⁵ (5,0·10 ⁴ –7,9·10 ⁵)	11,5±0,5	> 10 ⁴	> 21

* Базовые структуры кора ЛПС и функции ферментов биосинтеза ЛПС *Y. pestis* дикого типа и мутантов, выращенных при 25 °С. Gal – β-D-галактоза; DD-Hep – D-глицеро-α-D-манно-гептоза; GlcNAc – β-D-глюкозамин; Glc – β-D-глюкоза; Hep – L-глицеро-α-D-манно-гептоза; Kdo – 3-деокси-α-D-манно-окт-2-улозоновая кислота; Ko – D-глицеро-α-D-галакто-окт-2-улозоновая кислота; LA – липид A. GlcNAc присутствует в нестехиометрическом количестве; остаток Ko частично заменен на остаток Kdo; глицин на остатке LD-HepI не показан.

** 95 % доверительный интервал представлен в круглых скобках.

*** Нет данных.

40 мкг/мл, полимиксин В – 100 мкг/мл.

Мутагенез. Нокаутные мутанты получали с помощью конъюгативной передачи в клетки *Y. pestis* плазмид на основе суицидного вектора pCVD442 [3]. Верификацию замены генов проводили с помощью полимеразой цепной реакции.

Оценку вирулентности проводили на мышах (18±2) г и морских свинок (260±20) г при подкожном введении десятикратных разведений (10^7 КОЕ–1 КОЕ и 10^4 КОЕ– 10^1 КОЕ соответственно) 28-градусных культур *Y. pestis* в изотоническом растворе NaCl в объеме 0,1 мл на животное. Одной дозой заражали 5 мышей и 3 морские свинки. Наблюдение за зараженными животными проводили в течение 21 сут. Животных, погибших в ходе эксперимента или умерщвленных после его завершения, вскрывали и подвергали бактериологическому исследованию. Вычисление величин LD₅₀ проводили по методу Kärber в модификации И.П.Ашмарина и А.А.Воробьева [1].

Результаты и обсуждение

Укорочение кора сопровождалось снижением вирулентности мутантов для лабораторных животных (таблица). Величина LD₅₀ и средние сроки жизни мышей и морских свинок при заражении штаммами с мутациями по генам *wabD*, *waaL*, *waaQ* (отвечающими за синтез галактозилтрансферазы, О-лигазы и гептозилтрансферазы III соответственно) были сопоставимы с результатами, полученными для исходного штамма 231. При этом для штамма Δ*waaQ* отсутствовала строгая корреляция между вирулентностью и устойчивостью к факторам врожденного иммунитета. Чувствительный к полимиксину В и сыворотке крови *waaQ* мутант [5] сохранял вирулентность на уровне исходного штамма 231. При заражении мышей дальнейшее укорочение кора сопровождалось достоверным увеличением LD₅₀ и средней продолжительности жизни для мутанта *waaE* (нарушен синтез глюкозилтрансферазы). Мутант *hldE* (отсутствие продукции бифункциональной гептоза-7-фосфатакиназы / гептоза-1-фосфат-аденилилтрансферазы), сохранивший из структур кора только остатки Кдо, был наименее вирулентен. При заражении морских свинок оба мутанта (*waaE* и *hldE*) не вызывали гибели животных в течение 21 сут.

Бактериологическое исследование селезенки всех животных, павших в ходе эксперимента, показало массивное обсеменение *Y. pestis*. Из органов животных, выживших после заражения исходным штаммом 231 и его мутантами по генам *wabD*, *waaL*, *waaQ* (мыши и морские свинки) и *waaE* (мыши) на 22-е сутки после заражения выделить культуры чумного микроба не удалось. В то же время из селезенки обоих видов животных, зараженных штаммом 231Δ*hldE*, и селезенки морских свинок, инфицированных культурой 231Δ*waaE*, на 22-е сутки после заражения удавалось стабильно высевать единичные

колонии возбудителя чумы.

Таким образом, укорочение кора «дикого типа» (9 моносахаридных остатков) до 5 моносахаридных остатков приводит к снижению вирулентности (при наблюдении за подкожно зараженными животными в течение 21 сут) для морских свинок не менее чем на 3 порядка, а до 3 моносахаридных остатков – к утрате вирулентности для обоих видов животных. Нельзя исключить, что при увеличении периода наблюдения за животными, из селезенки которых высеивали *Y. pestis*, в поздние сроки эксперимента могла бы произойти генерализация инфекции, ведущая к их гибели.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 06-04-49280-а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. С. 85–104.
2. Дентовская С.В., Платонов М.Е., Бахтеева И.В., Анисимов А.П. Наличие полной структуры кора липополисахарида необходимо для активации плазминогена возбудителя чумы. Пробл. особо опасных инф. 2007; 1(93):49–51.
3. Donnenberg M.S., Kaper J.B. Construction of an eae deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. Infect. Immun. 1991; 59(12):4310–7.
4. Guinet F., Avé P., Jones L., Huerre M., Carniel E. Defective innate cell response and lymph node infiltration specify *Yersinia pestis* infection. PLoS ONE. 2008; 3(2):e1688.
5. Knirel Y.A., Dentsovskaya S.V., Bystrva O.V., Kocharova N.A., Senchenkova S.N., Shaikhutdinova R.Z. et al. Relationship of the lipopolysaccharide structure of *Yersinia pestis* to resistance to antimicrobial factors. Adv. Exp. Med. Biol. 2007; 603:88–96.
6. Kukkonen M., Suomalainen M., Kyllönen P., Lähteenmäki K., Lång H., Virkola R. et al. Lack of O-antigen is essential for plasmidogen activation by *Yersinia pestis* and *Salmonella enterica*. Mol. Microbiol. 2004; 51(1):215–25.
7. Skurnik M., Peippo A., Ervelä E. Characterization of the O-antigen gene clusters of *Yersinia pseudotuberculosis* and the cryptic O-antigen gene cluster of *Yersinia pestis* shows that the plague bacillus is most closely related to and has evolved from *Y. pseudotuberculosis* serotype O:1b. Mol. Microbiol. 2000; 37(2):316–30.

Об авторах:

Дентовская С.В., Платонов М.Е., Комбарова Т.И., Титарева Г.М., Бахтеева И.В., Шайхутдинова Р.З., Иванов С.А., Анисимов А.П. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Оболensk. E-mail: dentovskaya@obolensk.org

S.V.Dentovskaya, M.E.Platonov, T.I.Kombarova, G.M.Titareva, I.V.Bakhteeva, R.Z.Shaikhutdinova, S.A.Ivanov, A.P.Anisimov

Truncation of Lipopolysaccharide Core Decreases *Yersinia pestis* Virulence

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

The isogenic set of *Yersinia pestis* strains including wild-type strain 231 and its mutants with deletions of the structural genes, *wabD*, *waaL*, *waaQ*, *waaE*, and *hldE*, responsible for core oligosaccharide synthesis was generated using site directed mutagenesis. It was shown that gradual decrease of the core-oligosaccharide length was accompanied by reduction of mutants' virulence in subcutaneously infected mice and guinea pigs.

Key words: plague agent, LPS, core, virulence.

Authors:

Dentovskaya S.V., Platonov M.E., Kombarova T.I., Titareva G.M., Bakhteeva I.V., Shaikhutdinova R.Z., Ivanov S.A., Anisimov A.P. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk. E-mail: dentovskaya@obolensk.org

Поступила 16.09.08.

Г.А.Ерошенко, Г.Н.Одинокоев, Я.М.Краснов,
Н.П.Гусева, В.В.Кутырев

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ГЕНОВ *ASP* У ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* ОСНОВНОГО И НЕОСНОВНЫХ ПОДВИДОВ

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

Показана вариабельность нуклеотидной последовательности гена *aspA* у штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов, выделенных в Российской Федерации и ближнем зарубежье. У штаммов алтайского и гиссарского подвидов, также как и у штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*, в позиции 363 белка AspA находится аминокислота валин. У штаммов кавказского и улэгейского подвидов в этой позиции присутствует серин, а у штаммов основного подвида – лейцин. Вариабельность гена *aspA* может быть использована для генотипирования штаммов возбудителя чумы.

Ключевые слова: возбудитель чумы, вариабельность нуклеотидных последовательностей генов, аспартаза, генотипирование штаммов.

В настоящее время для создания эффективной системы молекулярного типирования возбудителя чумы, использование которой позволит с высокой достоверностью определять происхождение штамма и его принадлежность к одному из пяти подвидов *Y. pestis* (отличающихся по вирулентности), проводится поиск вариабельных ДНК-локусов в геноме этого возбудителя. Ранее нами была показана перспективность применения для этих целей хромосомных генов *rhaS* и *araC*, контролирующих ферментацию моносахаридов рамнозы и арабинозы [1, 2]. Недавно зарубежными исследователями у ряда штаммов *Y. pestis* выявлена вариабельность нуклеотидной последовательности гена *aspA*, кодирующего биосинтез аспартат-аммонийлиазы (синоним аспартаза) – AspA [3, 6]. Белок AspA катализирует дезаминирование L-аспартата с образованием фумарата – компонента цикла трикарбоновых кислот [3].

Целью этой работы было изучение вариабельности нуклеотидной последовательности гена *aspA* у штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвидов, выделенных в Российской Федерации, других странах СНГ и Монголии, для установления возможности использования *aspA* в системе мультилокусного секвенирования штаммов возбудителя чумы разного происхождения. Всего исследовано 19 штаммов *Y. pestis* основного (3 штамма), алтайского (4), кавказского (4), улэгейского (4) и гиссарского (4) подвидов, изолированных в природных очагах России и ближнего зарубежья (таблица). Штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб». Кроме того, с помощью алгоритма BLAST проведен компьютерный анализ 7 штаммов *Y. pestis*: KIM (биовар *medievalis*), CO92 (биовар *orientalis*), Antiqua (биовар *antiqua*), Angola, Nepal516, 91001 (биовар *microtus*), Pestoides F (кавказский подвид) и 4 штаммов *Y. pseudotuberculosis*: PB1/+ (1 серовара), IP32953 (1 серовара), IP 31758 (1 серовара), YPIII (3 серовара), полные нуклеотидные последовательности геномов которых представлены

в базе данных NCBI GenBank. На основе сравнения последовательностей генов *aspA* у штаммов *Y. pestis* (GenBank) определен вариабельный локус гена *aspA* (в позиции 1087–1089 от начала гена) и рассчитаны олигонуклеотидные праймеры, фланкирующие этот участок гена. Они имеют следующий состав: Asp 400S GAAGCGACCTCTGATTGC и Asp400As AAGTGACGATGCCTATGG. Амплификацию фрагмента гена *aspA* в ПЦР осуществляли по следующей схеме: 1 цикл 94 °C в течение 5 мин, затем 35 циклов при 94 °C 45 с, 55 °C 1 мин, 72 °C 45 с и завершающий цикл 3 мин при 72 °C. Определение нуклеотидной последовательности полученных фрагментов *aspA* проводили по методу F.Sanger *et al.* с использованием прямых и обратных праймеров [5]. Выравнивание и сравнение нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием программ MEGA4. Полученные экспериментальные данные, а также результаты проведенного компьютерного анализа суммированы в таблице.

В результате сравнения полученных последовательностей фрагментов гена *aspA* установлено, что у штаммов алтайского (*Y. pestis* 4857, И-2998, И-3085, KM1203) и гиссарского (*Y. pestis* A-1633, A-1730, A-1249, A-1728) подвидов в позиции 1087–1089 от начала гена *aspA* находится тот же триплет GTG, что и у штаммов *Y. pseudotuberculosis*, представленных в базе GenBank (таблица), который кодирует аминокислоту валин, расположенную в положении 363 в белке AspA. Таким образом, у штаммов алтайского и гиссарского подвидов в геноме присутствуют гены *aspA* «дикого» типа. В отличие от них у штаммов двух других подвидов – кавказского (*Y. pestis* 3551, 376, 1470, 818) и улэгейского (*Y. pestis* И-3069, И-3131, И-2422, И-3071) в этой позиции гена *aspA* находится другой триплет – TCG, который кодирует аминокислоту серин. По данным S.W.Bearden *et al.* [3] замена аминокислотного остатка валина на серин не оказывает влияния на активность белка AspA. Еще у двух штаммов *Y. pestis* Angola и Nepal516 (GenBank) в позиции

Вариабельность нуклеотидной последовательности гена *aspA* у штаммов *Y. pestis*

Штамм	Источник выделения	Триплет в позиции 1087–1089	Аминокислотный остаток в позиции 363
<i>Y. pestis</i> основной п/в			
A-1836	Серый сурок	TTG	Leu
A-161	Блохи большой песчанки	«	«
2638	Полуденная песчанка	«	«
Кавказский п/в			
3551	Блохи гнезда обыкновенной полевки	TCG	Ser
376	Обыкновенная полевка	«	«
1470	Обыкновенная полевка	«	«
818	Блохи гнезда обыкновенной полевки	«	«
Улегейский п/в			
И-3069	Полевка Брандта	TCG	Ser
И-3131	Монгольская пищуха	«	«
И-2422	Блохи монгольской пищухи	«	«
И-3071	Монгольская пищуха	«	«
Алтайский п/в			
4857	Труп монгольской пищухи	GTG	Val
И-2998	Монгольская пищуха	«	«
И-3085	Полевка Брандта	«	«
КМ1203	Блохи монгольской пищухи	«	«
Гиссарский п/в			
A-1633	Блохи арчевой полевки	GTG	Val
A-1730	Блохи гнезда арчевой полевки	«	«
A-1249	Арчевая полевка	«	«
A-1728	Арчевая полевка	«	«
<i>Y. pestis</i> , данные GenBank			
KIM б/в <i>medievalis</i>		TTG	Leu
CO92 б/в <i>orientalis</i>		TTG	Leu
<i>Antiqua</i> б/в <i>antiqua</i>		TTG	Leu
Angola		TTT	Phe
Nepal516		TTT	Phe
91001 б/в <i>microtus</i>		GTG	Val
<i>Pestoides</i> F кавказский п/в		TCG	Ser
<i>Y. pseudotuberculosis</i> , данные GenBank			
PB1/+		GTG	Val
IP 32953		GTG	Val
IP 31758		GTG	Val
YPIII		GTG	Val

363 находится аминокислота фенилаланин, наличие которой в этом локусе приводит к снижению (но не потере) активности фермента аспартазы [3].

У трех изученных нами штаммов основного подвида (*Y. pestis* A-1836, A-161 и 2638), а также у штаммов основного подвида, представленных в GenBank в позиции 1087–1089 гена *aspA* находится триплет TTG, который кодирует аминокислоту лейцин (таблица). R.E.Viola *et al.* [6] показали, что наличие аминокислоты лейцина в позиции 363 аспартазы является причиной отсутствия активности этого фермента у штаммов основного подвида. По гипоте-

зе R.R.Brubaker *et al.* [4], отсутствие активности фермента аспартазы приводит к развитию острой формы заболевания, вызываемой основным подвидом *Y. pestis*. Штаммы пестоидов (неосновных подвигов) обладают сниженной вирулентностью из-за наличия активного фермента – аспартазы [3, 4, 6].

Таким образом, нами показана вариабельность гена *aspA* у штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвигов, выделенных на территории Российской Федерации и ближнего зарубежья. Изменчивость последовательности гена *aspA* в сочетании с вариабельностью других генов, может быть использована для

проведения внутривидовой дифференциации возбудителя чумы, а наличие специфического триплета в позиции 1087–1089 гена *aspA* может служить генетической меткой штаммов *Y. pestis* разных подвидов.

Работа поддержана грантами РФФИ № 07-04-00100, 08-04-00731 и 08-04-12082 ОФИ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ерошенко Г.А., Видяева Н.А., Одинокоев Г.Н. и др.. Структурно-функциональный анализ гена *agaC* у штаммов различного происхождения. Мол. генетика, микробиол. и вирусол. 2009; (2): (в печати).
2. Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Куклев В.Е. и др. Исследование вариативности нуклеотидной последовательности генов *rha* локуса у штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов. Мол. генетика, микробиол. и вирусол. 2008; 2:23–7.
3. Bearden S.W., Sexton C., Pare J. et al. Attenuated enzootic (pestioides) isolates of *Yersinia pestis* express active aspartase. Microbiology. 2009; 155:198–209.
4. Brubaker R.R. Intermediary metabolism Na^+ , the low calcium response and acute disease. In: Perry R.D., editor. The genus *Yersinia*: from genomics to function. New York: Springer; 2007. P. 116–29.
5. Sanger F., Nicklen L., Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977; 74:5463–7.
6. Viola R.E., Yerman L., Fowler J.M. et al. A missense mutation causes aspartase deficiency in *Yersinia pestis*. Microbiology. 2008; 154:1271–80.

Об авторах:

Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. Тел. (845-2) 26-21-31. E-mail: microbe@san.ru

G.A.Eroshenko, G.N.Odinokov, Ya.M.Krasnov, N.P.Gooseva, V.V.Kutyrev

Variability of the *aspA* Genes in *Yersinia pestis* Strains of the Main and Non-Main Subspecies

Russian Anti-Plague Research Institute “Microbe”, Saratov

Demonstrated was variability of the *aspA* gene nucleotide sequence in *Yersinia pestis* strains of the main and non-main subspecies isolated in the Russian Federation and neighboring countries. Strains of *altaica* and *hissarica* subspecies, just as *Yersinia pseudotuberculosis*, possess valine in position 363 of the AspA protein. Strains of *caucasica* and *ulegeica* subspecies carry serine in this position, while strains of the main subspecies carry leucine. The *aspA* gene variability is thought to be applicable for genotyping of plague agent strains.

Key words: plague agent, gene nucleotide sequence variability, aspartase, genotyping of the strains.

Authors:

Eroshenko G.A., Odinokov G.N., Krasnov Ya.M., Gooseva N.P., Kutyrev V.V. Russian Anti-Plague Research Institute “Microbe”. 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 20.02.09.

Е.А.Пронина¹, Г.М.Шуб¹, А.П.Креницкий², А.В.Майбородин², О.В.Бецкий³, Ю.В.Гуляев³

ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ КАТАЛАЗЫ И СУПЕРОКСИДИСМУТАЗЫ БАКТЕРИЙ ПРИ ДЕЙСТВИИ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ЧАСТОТЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО СПЕКТРА ПОГЛОЩЕНИЯ И ИЗЛУЧЕНИЯ АТМОСФЕРНОГО КИСЛОРОДА

¹ГОУВПО «Саратовский государственный медицинский университет», ²ОАО Центральный НИИ измерительной аппаратуры, Саратов; ³Институт радиотехники и электроники РАН, Москва

Описана динамика изменения уровня активности каталазы и супероксиддисмутазы золотистого стафилококка, кишечной и синегнойной палочек при действии электромагнитного излучения на частоте молекулярного спектра поглощения и излучения атмосферного кислорода. Выявлено повышение активности названных ферментов изучаемых штаммов, наиболее выраженное при 45-минутной экспозиции.

Ключевые слова: каталаза, супероксиддисмутаза, электромагнитное излучение, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

В последние годы опубликовано значительное количество работ, посвященных поиску эффектов и механизмов действия электромагнитного излучения крайневисоких частот (ЭМИ КВЧ) на биологические объекты различного уровня организации – от одиночных клеток до целостного организма, в частности, изучению первичных звеньев реакции живых систем [2, 5, 10].

При облучении молекул энергия КВЧ-излучения расходуется на переходы молекул из одного состояния в другое. При совпадении частоты проводимого облучения с частотой вращения полярных молекул возможна перекачка энергии излучения молекуле, сопровождающаяся увеличением ее вращательной кинетической энергии, что влияет на их реакционную способность. Поскольку фундаментальной основой функционирования сложных биологических систем являются молекулы-метаболиты, детерминированное управление их реакционной способности излучением, совпадающим со спектрами их излучения и поглощения, может направленно регулировать процесс метаболизма в среде. Известно, что вращательные молекулярные спектры резонансного поглощения и излучения молекул важнейших клеточных метаболитов (NO, CO, O₂, CO₂) находятся именно в КВЧ диапазоне [1].

Изучение действия ЭМИ КВЧ на микроорганизмы может конкретизировать представления о возможных путях восприятия организмами этого вида излучения. Так, под воздействием ЭМИ КВЧ обнаружено ингибирование ряда ферментов у *Clostridium sporogenes*, увеличение фибринолитической активности у *Aspergillus orizal*, изменение скорости деления клеток и скорости роста у дрожжей и кишечной палочки. Эффекты были обнаружены на частотах излучения 42, 66, 69, 71, 73 и 136 ГГц [4, 10, 12, 13].

Важнейшим регулятором биологических процессов в клетках является кислород в его реактивных формах (РФК), выполняющих роль внутриклеточных и межклеточных мессенджеров. Установлено, что электромагнитное облучение на указанных выше

частотах также способствует образованию РФК. Можно полагать, что при использовании частот молекулярного спектра поглощения и излучения (МСПИ) кислорода эти процессы будут активизироваться.

От состояния антиоксидантных систем микробов в большой мере зависит их способность противостоять окислительному взрыву в клетках макроорганизма. Утилизация супероксид-аниона и перекиси водорода, образующихся при фагоцитозе, реализуется, главным образом посредством супероксиддисмутазы и каталазы.

В этой связи целью работы явилось экспериментальное изучение влияния ЭМИ на частоте молекулярного спектра поглощения и излучения атмосферного кислорода (129 ГГц) на каталазную и супероксиддисмутазную активность бактерий.

Сведения по влиянию электромагнитного излучения на частоте МСПИ атмосферного кислорода на перечисленные выше ферменты бактерий в доступной литературе отсутствуют.

Материалы и методы

В работе использовали генератор O₂, разработанный в ОАО ЦНИИИА.

Для решения поставленной задачи использовался панорамно-спектрометрический комплекс с квазиоптическим трактом, в котором возбуждались электромагнитные КВЧ колебания, имитирующие структуру молекулярного спектра поглощения и излучения атмосферного кислорода (МСПИ) [7, 9].

Точное значение заданной частоты определяли в соответствии с международной базой данных молекулярных спектров высокого разрешения HITRAN (созданной с участием космического агентства) и с учетом поправок на атмосферное давление и температуру окружающей среды [3].

Объектом исследования были эталонные штаммы *Escherichia coli* ATCC 25922 (K-12), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и по 5 клинических штаммов каждого вида.

Из суточных культур испытуемых микроорганизмов, выращенных на мясо-пептонном агаре, готовили взвесь по 10^9 м.к. в 1 мл. По 1,5 мл этой взвеси вносили в пробирки типа «Эппендорф» и подвергали воздействию ЭМИ на частоте МСПИ O_2 (129 ГГц) в течение 10, 30, 45 и 60 мин. Контролем служили необлученные культуры.

Активность каталазы определяли колориметрическим методом [6]. Принцип метода основан на способности перекиси водорода образовывать с солями молибдена стойкий окрашенный комплекс. В опыте использовались холостая, контрольная и опытная пробы. В каждую пробу вносили 1 мл 0,05М трис-НСI буфера (рН 7,8), в холостую и опытную – по 2 мл перекиси водорода, а в контрольную – 2 мл дистиллированной воды; в контрольную и опытные пробы затем прибавляли по 0,1 мл бактериальной взвеси. Реакцию останавливали через 10 мин добавлением 1 мл 4 % раствора молибдата аммония во все пробирки, после этого в холостую пробу приливали 0,1 мл взвеси. Интенсивность окраски в каждой пробе измеряли на спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО, Россия) при длине волны 410 нм против контрольной пробы.

Активность каталазы рассчитывали по формуле:

$$E = (A_{\text{хол}} - A_{\text{оп}}) \cdot V \cdot t \cdot K,$$

где E – активность каталазы (мкат/мл); $A_{\text{хол}}$ и $A_{\text{оп}}$ – экстинкция холостой и опытной проб; V – (0,1 мл) объем вносимой пробы; t – время инкубации (600 с); K – коэффициент миллимолярной экстинкции H_2O_2 ($22,2 \cdot 10^3 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$).

За единицу активности каталазы принимали то количество фермента, которое участвует в превращении 1 мкат перекиси водорода за 1 с при заданных условиях.

Активность СОД определяли по методике, описанной Чевари С. и соавт. [11]. Принцип метода основан на способности конкурировать с нитросиним тетразолием (НСТ) за супероксидные анионы, образующиеся в результате взаимодействия восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида (НАД·Н) и феназинметасульфата (ФМС). В результате этой реакции НСТ восстанавливается с образованием гидразинтетразолия. В присутствии СОД процент восстановления НСТ уменьшается. Количественные параметры протекающей реакции определяли на спектрофотометре СФ-46 путем измерения оптической плотности реакционной смеси при длине волны 540 нм. После перемешивания компонентов пробы в кювете устанавливали начальную экстинкцию. Через 10 мин измеряли нарастание оптической плотности раствора.

Расчет вели по формуле:

$$\frac{E_0 - E_{\text{пр}}}{E_0} \cdot 100\% = \% \text{ блокирования},$$

где E_0 – экстинкция реакционной смеси в отсутствие СОД (нулевая проба),

$E_{\text{пр}}$ – исследуемой пробы (опытная проба).

За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для снижения оптической плотности в процессе восстановления НСТ в опытной пробе на 50 %. Активность СОД выражали в усл. ед. на 1 мл взвеси.

Статистическую обработку результатов проводили с применением стандартных методов вариационной статистики [8].

Результаты и обсуждение

Из представленных данных (рис. 1) видно, что

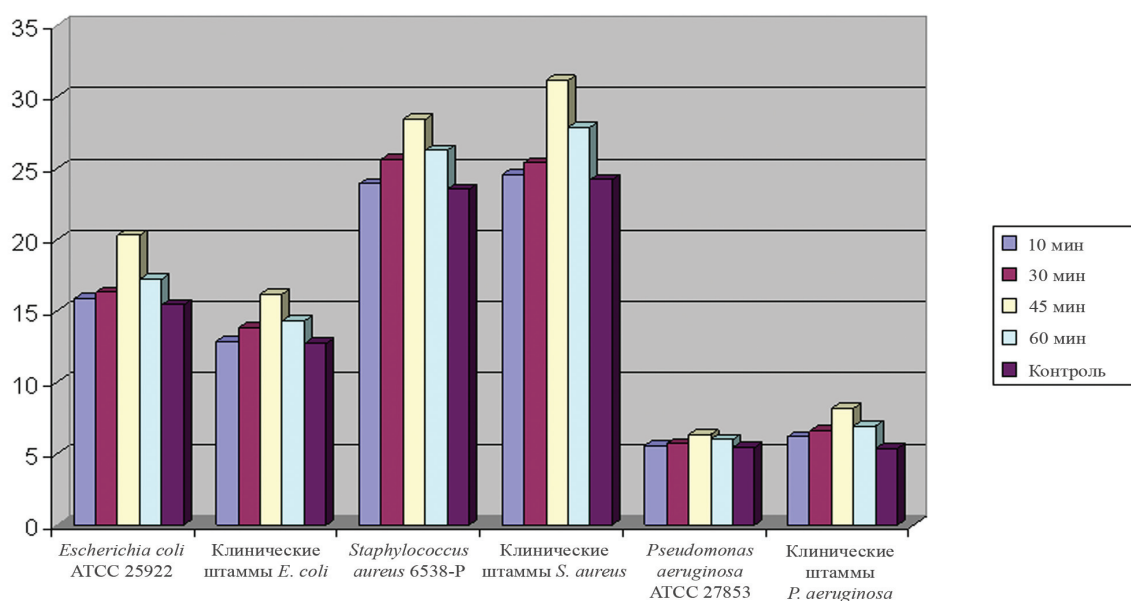


Рис. 1. Динамика изменения активности каталазы (мкат/мл) при разном времени воздействия ЭМИ МСПИ атмосферного кислорода на различные виды бактерий

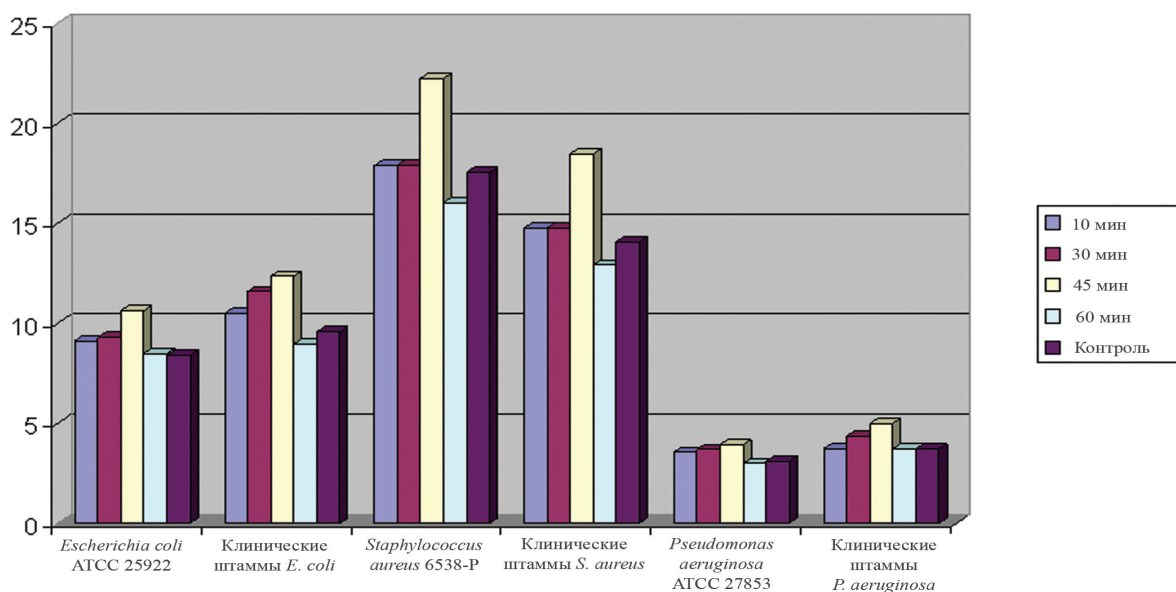


Рис.2. Динамика изменения активности супероксиддисмутазы (усл.ед./мл) при разном времени воздействия ЭМИ МСПИ атмосферного кислорода на различные виды бактерий

уровень каталазы при облучении ЭМИ на частоте излучения и поглощения молекулярного кислорода в течение 30 мин возрастал на 9 % у эталонного штамма *S. aureus* и на 5 % у клинических штаммов этого вида; на 6 % у эталонного штамма *E. coli* и на 8 % – у клинических штаммов; на 5 % у эталонного штамма *P. aeruginosa* и на 13 % – у клинических штаммов.

При облучении ЭМИ на частоте молекулярного кислорода в течение 45 мин активность каталазы также увеличивалась по сравнению с контролем и достигала максимального значения у всех штаммов, возрастала на 21 % у эталонного штамма *S. aureus* и на 29 % у клинических штаммов; на 32 % у эталонного штамма *E. coli* и на 27 % у клинических штаммов; на 17 % у эталонного штамма *P. aeruginosa*, и на 33 % у клинических штаммов. Полученные данные статистически достоверны ($p < 0,05$).

Далее при облучении в течение 60 мин уровень каталазы начинал падать, он был несколько меньше показателей при 45-минутной экспозиции, но превышал контрольные значения на 12 и 15 % у *S. aureus*, на 12 у *E. coli* и на 11 и 13 % у *P. aeruginosa*.

При облучении в течение 10 мин изменение активности каталазы было незначительным и является достоверным только для клинических штаммов синегной палочки.

При изучении динамики изменения активности СОД (рис. 2) видно, что уровень активности данного фермента после облучения ЭМИ в течение 30 мин возрастал на 2 % у эталонного штамма *S. aureus* и на 5 % у клинических штаммов этого вида; на 10 % у эталонного штамма *E. coli* и на 21 % у клинических штаммов; на 19 % у эталонного и на 17 % у клиниче-

ских штаммов *P. aeruginosa*.

При облучении ЭМИ на частоте молекулярного кислорода в течение 45 мин активность СОД также увеличивалась по сравнению с контролем у всех штаммов. Активность супероксиддисмутазы возрастала на 27 % у эталонного штамма *S. aureus* и на 31 % у клинических штаммов; на 26 % у эталонного штамма *E. coli* и на 29 % у клинических штаммов; на 26 % у эталонного штамма *P. aeruginosa*, и на 34 % у клинических штаммов.

Далее при облучении в течение 60 мин уровень активности СОД так же, как и уровень активности каталазы начинал падать. Данный показатель был меньше контрольных значения на 9 и 8 % у *S. aureus*, на 1 и 6 % у *E. coli* и на 4 % у *P. aeruginosa*.

При облучении в течение 10 мин уровень активности СОД имел тенденцию к повышению в отличие от уровня активности каталазы. Он превышал контрольные значения на 2 и 5 % у *S. aureus*, на 8 и 10 % у *E. coli* и на 14 % у *P. aeruginosa*.

Таким образом, облучение бактериальных взвесей стафилококка, кишечной и синегной палочек ЭМИ МСПИ атмосферного кислорода приводит к однонаправленному повышению каталазной и супероксиддисмутазной активности. Данный процесс, при различном времени экспозиции от 10 до 60 мин, развивается постепенно и достигает максимума к 45 мин для супероксиддисмутазы и каталазы. Более длительная экспозиция приводит к торможению активности и каталазы, и супероксиддисмутазы. Выявленная динамика характерна для всех трех изученных видов бактерий, хотя они и различаются между собой по уровню исходной активности – наибольшей у стафилококка и наименьшей у псевдомонад.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Башаринов А.Е., Тучков Л.Г., Поляков В.М. и др. Измерение радиотепловых и плазменных излучений в СВЧ-диапазоне. М.: Советское радио; 1968.
2. Бецкий О.В., Девятков Н.Д., Кислов В.В. Миллиметровые волны низкой интенсивности в медицине и биологии. Биомедицинская радиоэлектроника. 1998; 4:13–29.
3. Бецкий О.В., Креницкий А.П., Майбородин А.В. и др. Молекулярные HITRAN-спектры газов-метаболитов в терагерцевом и ИК-диапазонах частот и их применение в биомедицинских технологиях. Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. 2007; 8–9:27–43.
4. Брюхова А.К., Буяк Л.И., Зиновьева Н.А. и др. Некоторые особенности действия электромагнитных излучений миллиметрового диапазона на микроорганизмы. В кн.: Девятков Н.Д., редактор. Медико-биологические аспекты миллиметрового излучения низкой интенсивности. М.: ИРЭ АН СССР; 1987. С. 98–103.
5. Девятков Н.Д., Голант М.Б., Бецкий О.В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности. М.: Радио и связь; 1991.
6. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. Лаб. дело. 1988; 1:16–9.
7. Креницкий А.П., Майбородин А.В., Бецкий О.В. и др. Квазиоптический КВЧ генераторный комплекс моделирования детерминированных шумов для биофизических исследований. Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. 2003; 2:5–11.
8. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа; 1990.
9. Майбородин А.В., Креницкий А.П., Туликин В.Д. и др. Панорамно-спектрометрический комплекс для исследования тонких структур молекулярных спектров физических и биологических сред. Биомедицинская радиоэлектроника. 2001; 8:35–47.
10. Тамбиев А.Х. Миллиметровые волны и фотосинтезирующие организмы. М.: Радиотехника; 2003.
11. Чевари С., Чаба И., Секей И. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах. Лаб. дело. 1985; 11:678–81.
12. Grundler W., Kaiser F., Keilmann F., Walleczek J. Mechanisms of electromagnetic interaction with cellular systems. Naturwissenschaften. 1992; 79:551–9.
13. Webb S.J., Dodds D.D. Inhibition of bacterial cell growth by 136 gc microwaves. Nature. 1968; 218:374–5.

Об авторах:

Пронина Е.А., Шуб Г.М. Саратовский государственный медицинский университет. 410012, Саратов, ул. Б.Казачья, д. 112. Тел. (845-2) 66-98-20.

Креницкий А.П., Майбородин А.В. ОАО Центральный НИИ измерительной аппаратуры. 410002, Саратов, ул. Московская, д. 66. Тел. (845-2) 74-02-75.

Бецкий О.В., Гуляев Ю.В. Институт радиотехники и электроники РАН. 125009, Москва, ул. Моховая, д. 11. Тел. (495) 203-47-89.

E.A.Pronina, G.M.Shub, A.P.Krenitskiy, A.V.Maiborodin, O.V.Betskiy, Yu.V.Gulyaev

Alteration of Activity of Bacterial Catalase and Superoxide Dismutase under the Action of Electromagnetic Radiation at a Frequency of Molecular Absorption Spectrum and Atmosphere Oxygen Emission

Saratov State Medical University, Central Research Institute of Measuring Instrumentation, Saratov; RAS Institute of Radiotechnology and Radioelectronics, Moscow

Described is dynamics of alteration of the level of activity of catalase and superoxide dismutase of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* under the action of electromagnetic radiation at a frequency of molecular absorption spectrum and atmosphere oxygen emission. Increase of the named enzymes activity in strains under research was determined, most pronounced at 45 min exposition.

Key words: catalase, superoxide dismutase, electromagnetic radiation, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Authors:

Pronina E.A., Shub G.M. Saratov State Medical University. 410012, Saratov, B.Kazach'a St., 112.

Krenitskiy A.P., Maiborodin A.V. Central Research Institute of Measuring Instrumentation.

Betskiy O.V., Gulyaev Yu.V. RAS Institute of Radiotechnology and Radioelectronics. Moscow.

Поступила 23.12.08.

Г.А.Афанасьева¹, Н.П.Чеснокова¹, В.В.Кутырев², Г.Н.Маслякова¹, Ю.Ф.Хоркин¹**О РОЛИ АКТИВАЦИИ ПРОЦЕССОВ ЛИПОПЕРОКСИДАЦИИ
В СТРУКТУРНОЙ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ДЕЗОРГАНИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ
В ДИНАМИКЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЭНДОТОКСИКОЗА**¹ГОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет»,²ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Целью настоящей работы явилось изучение патогенетической взаимосвязи выраженности патоморфологических проявлений и изменений активности процессов липопероксидации в органах, участвующих в инактивации и элиминации токсинов (печени, почках, кишечнике) в динамике эндотоксикоза, достигаемого введением ЛПС *Yersinia pestis*. Обнаружены выраженные дистрофические, некробиотические изменения, а также нарушения микроциркуляции в изучаемых органах, сочетающиеся с накоплением продуктов липопероксидации в гомогенатах и крови, коррелирующие с тяжестью клинических проявлений патологии. Полученные результаты позволяют предположить, что эфферентным звеном цитопатогенных эффектов ЛПС чумного микроба является активация свободнорадикального окисления в динамике чумной интоксикации.

Ключевые слова: *Y. pestis*, ЛПС, эндотоксикоз, липопероксидация.

Как известно, липополисахариды (ЛПС) – высокореактогенные компоненты эндотоксинов грамотрицательных бактерий, интенсивное исследование которых связано, с одной стороны, с их ведущей ролью в патогенезе ряда инфекций, а с другой стороны, перспективами использования этого биополимера для диагностики и профилактики инфекционных заболеваний. Являясь одним из основных компонентов наружной мембраны клеточной оболочки грамотрицательных бактерий, ЛПС находятся в тесном контакте с мембранными белками и обеспечивают стабильность мембраны, ее селективную проницаемость и межклеточные взаимодействия [5, 6, 9, 12].

В настоящее время установлена гетерогенность клеточноопосредованных системных эффектов эндотоксина. Так, основными биологическими свойствами ЛПС, обуславливающими системные проявления эндотоксикоза, являются токсичность, пирогенное действие, способность вызывать местный и генерализованный феномен Шварцмана, активировать продукцию белков острой фазы воспаления, обеспечивать развитие гиперлипидемии и диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови. Для системной эндотоксемии характерна сердечная недостаточность многофакторного генеза, которая обуславливает значительные нарушения кровотока в различных органах и тканях. Наиболее тяжелой клинической формой эндотоксикоза является шок [6, 9].

Ведущая роль в патогенезе чумы, как и ряда других заболеваний, индуцируемых грамотрицательными бактериями, принадлежит именно ЛПС. ЛПС *Y. pestis* выделяется во внеклеточную среду в основном при разрушении бактериальных клеток. Анализ данных литературы свидетельствует о множествен-

ности клеточных акцепторов ЛПС чумного микроба и разнообразии посредников, участвующих в реализации системных эффектов эндотоксина. Мишенями для эндотоксина являются клеточные элементы различных органов и тканей, в частности клетки крови, эндотелий сосудов [5, 9, 14, 15].

Рецепция эндотоксина может носить неспецифический характер, однако на поверхности клеток имеются и специфические для эндотоксина белковые рецепторы CD14, CD18, CD54, Toll-рецепторы и другие [9, 14, 15].

В настоящее время очевидно, что на высоте развития клинических проявлений чумной инфекции и интоксикации формируются такие типовые патологические процессы, как воспаление, лихорадка, нарушения кислотно-основного и электролитного баланса, гипоксия. В то же время развиваются геморрагический синдром, а также выраженные расстройства регионарного кровотока и микроциркуляции, определяющие в целом формирование полиорганной недостаточности и исход заболевания.

Установлено, что гипоксический синдром при чумной инфекции и интоксикации имеет сложный генез, включая циркуляторную, дыхательную, гемическую и тканевую гипоксию [6, 12]. Эфферентным звеном гипоксического некробиоза тканей является активация свободнорадикальной дезорганизации биологических мембран клеток [1–3, 8, 10, 12]. Между тем, до настоящего момента не систематизированы сведения о роли активации процессов липопероксидации (ЛПО) в развитии структурно-функциональных нарушений в различных органах и тканях при эндотоксикозе.

В связи с вышеизложенным, целью настоящей

работы явилось изучение патогенетической взаимосвязи степени выраженности патоморфологических проявлений в печени, почках и тонком кишечнике, то есть в органах, обеспечивающих элиминацию бактериальных токсинов из системного кровотока с изменением состояния ЛПО и антирадикальной защиты клеток различной морфо-функциональной организации.

Материал и методы

Исследования проведены на стадиях ранних и выраженных клинических проявлений чумной интоксикации, развивающихся соответственно спустя 1,5–2,0 и 4,0 ч после внутрибрюшинного введения беспородным белым мышам обоего пола массой 18–20 г ЛПС чумного микроба штамма 358/12 в дозе, эквивалентной ЛД₅₀. ЛПС получен в ФГУЗ «Российский НИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. Материал от 40 мышей, использованных в экспериментах, получали после декапитации животных в лабораторных условиях в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

В различных вариантах моделирования бактериального эндотоксикоза проведена сравнительная оценка патоморфологии паренхиматозных элементов и микроциркуляторного русла в печени, почках, кишечнике, участвующих в инактивации и элиминации токсинов, а также состояния процессов ЛПО тех же органов. Морфологические исследования проводились с использованием стандартных методов фиксации и проводки материала. Срезы окрашивались гематоксилином и эозином.

Для оценки активности процессов ЛПО крови и тканей исследовали содержание гидроперекисей липидов (ГПЛ) и малонового диальдегида (МДА) в плазме крови, эритроцитах и гомогенатах органов общепринятыми спектрофотометрическими методами [11]. Одновременно изучали состояние ферментного и неферментного звеньев антиоксидантной системы (АОС): определяли активность супероксиддисмутазы (СОД) в цельной крови и гомогенатах печени, почек и кишечника, активность каталазы и содержание α -токоферола в плазме крови, эритроцитах и гомогенатах указанных органов [4, 7, 13].

Результаты проведенных экспериментов обработаны параметрическим статистическим методом с использованием стандартных компьютерных программ (Microsoft «XL», «Statgraphics 5,0») с расчетом средней арифметической, критерия Стьюдента, достоверности различий.

Результаты исследования и их обсуждение

Оценка метаболического статуса и патоморфологии органов проведена в динамике интоксикации. Как оказалось, уже на стадии ранних клинических проявлений, то есть спустя 2 ч после введения ЛПС

белым мышам, в печени возникали выраженные изменения микроциркуляторного русла, характеризующиеся развитием ишемии и, соответственно, ишемического стаза. В то же время на фоне сохраненной балочной структуры долек появлялись признаки слабой пролиферации ретикулоэндотелиальных элементов, в цитоплазме определялась зернистость, хроматин в ядрах гепатоцитов становился «пылевидным».

В указанный период интоксикации отмечалось неравномерное кровенаполнение клубочков почек: сочетание полнокровия одних и малокровия других на фоне сохранения их структуры. В эпителии дистальных канальцев и собирательных трубочек обнаруживались явления зернистой и гидropической дистрофии.

В срезах препаратов тонкого кишечника определялись некроз и десквамация эпителия слизистой оболочки, умеренная инфильтрация лимфоцитами стромы ворсин, гиперплазия лимфоидных фолликулов. Указанные патоморфологические изменения сочетались с ишемией всех слоев стенки и развитием ишемического стаза.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют заключить, что на ранней стадии чумной интоксикации в печени, почках и кишечнике возникают выраженные изменения тонуса сосудов в виде сочетания спазма и участков вазодилатации, а также развитие ишемического стаза и дистрофических изменений в органоспецифических элементах. Обнаруженные факты, безусловно, свидетельствуют о раннем формировании циркуляторной гипоксии в органах, обеспечивающих инактивацию и элиминацию токсина, а также о возможности образования активных форм кислорода в динамике гипоксического синдрома.

В связи с этим, представлялось целесообразным установить значение активации процессов ЛПО в механизмах опосредования цитопатогенных эффектов эндотоксина *Y. pestis* в указанный период интоксикации. Результаты проведенных экспериментов позволили выявить общую закономерность метаболических сдвигов в органах и тканях различной морфофункциональной организации в ранний период интоксикации. Последняя заключалась в чрезмерном накоплении продуктов ЛПО в крови и гомогенатах изучаемых органов (таблица, рис. 1).

Полученные результаты делали очевидной необходимость установления патогенетической значимости недостаточности механизмов антиоксидантной защиты крови и тканей в патогенезе свободнорадикальной дезорганизации клеток различных органов и тканей.

Как показали результаты проведенных экспериментов, имело место снижение активности СОД только в гомогенатах почек ($p < 0,001$). Как известно, все разновидности СОД, различаясь по строению активного центра и полипептидной цепи, являются металлоферментными факторами АОС, инактивирующими супероксидный анион-радикал в реакции

Содержание продуктов липопероксидации
в крови белых мышей при чумной ЛПС-интоксикации
(ЛПС в дозе, эквивалентной LD₅₀)

Показатели	Контроль	Стадии интоксикации	
		ранняя	выраженных клинических проявлений
	M±m	M±m	M±m
МДА (плазма), мкмоль/мл	0,89±0,03	1,14±0,04*	1,24±0,05*
МДА (эритроциты), мкмоль/мл	2,23±0,03	5,57±0,2*	6,35±0,17*
ГПЛ (плазма), Ед/ мл	1,55±0,05	1,66±0,06	3,58±0,04*
ГПЛ (эритроциты), Ед/мл	21,2±0,4	37,3±0,7*	48,3±2,0*

* Достоверные различия с соответствующими показателями контрольной серии ($p < 0,001$). Во всех сериях экспериментов $n = 15-20$.

дисмутации с образованием перекиси водорода [13].

В то же время в гомогенатах всех изучаемых органов имело место снижение активности каталазы ($p < 0,001$), которая разлагает перекись водорода [7]. СОД и каталаза представляют собой единую сбалансированную ферментную систему антирадикальной защиты клеток.

В сериях экспериментов по изучению содержания α -токоферола – одного из неферментных антирадикальных факторов, способных нейтрализовать кислородные радикалы на этапах продолжения и разветвления цепей свободнорадикального окисления – было обнаружено уменьшение его уровня в плазме крови ($p < 0,001$), эритроцитах ($p < 0,001$), а также в гомогенатах почек ($p < 0,001$) и тонкого кишечника ($p < 0,001$) (рис. 2).

Касаясь значимости выявленного нами феномена активации процессов ЛПО, следует отметить, что избыточное накопление ГПЛ и МДА в крови, печени, почках, кишечнике на фоне недостаточности ферментного и неферментного звеньев АОС являет-

ся весомым механизмом дезорганизации липидных компонентов биологических мембран клеток и субклеточных структур. Причем, как известно, активация ЛПО носит неспецифический характер и, по всей вероятности, является ведущим патогенетическим фактором развития нарушений микроциркуляции, эндотелиальной дисфункции, а также гипоксической дистрофии и некробиоза тканей при условии недостаточности антирадикальной защиты клеток.

Последующие эксперименты, проведенные по мере прогрессирования интоксикации спустя 4 ч после введения ЛПС белым мышам, свидетельствовали об усилении расстройств микроциркуляции, дистрофии и некроза в изучаемых органах и тканях. Выраженные расстройства кровотока отмечались в ткани почек, где в мозговом веществе ишемический стаз сопровождался появлением мелких и крупных полей некроза, а в корковом веществе чередовались участки малокровных и полнокровных венул. В этом звене микроциркуляторного русла развивалась агрегация эритроцитов. В корковом слое наряду с сохранившимися встречались спавшиеся сосудистые клубочки. В сохранившихся клубочках отмечено значительное повреждение внутренней стенки микрососудов: отек и набухание эндотелиальных клеток, их вакуолизация и десквамация, что отражает реакцию эндотелия на действия эндотоксина.

В период выраженных клинических проявлений интоксикации в паренхиме печени обнаруживались расстройства микроциркуляции в виде умеренного венозного полнокровия центральных вен, отека с расширением пространств Диссе. Нарушения микроциркуляции в ткани печени сопровождалось появлением отдельных некротизированных гепатоцитов.

В стенке кишечника обнаружено малокровие, причем сосуды были в состоянии умеренного спазма, не содержали форменных элементов крови. В срезах препаратов кишечника наблюдались признаки повышенной проницаемости сосудов, десквамация эн-

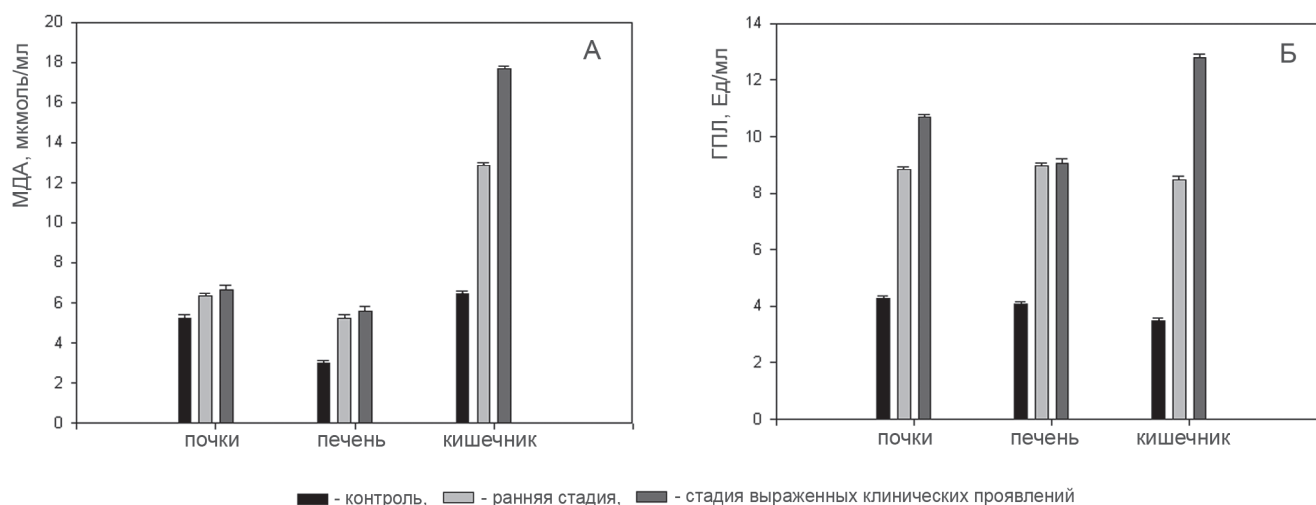


Рис. 1. Изменения содержания малонового диальдегида (А) и гидроперекисей липидов (Б) в гомогенатах органов белых мышей в динамике чумной ЛПС-интоксикации

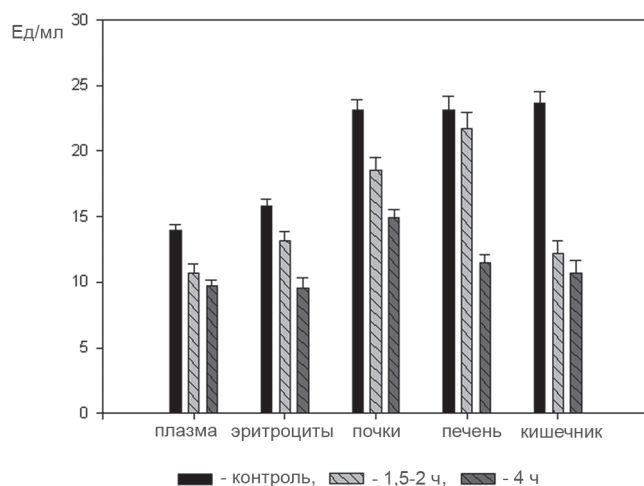


Рис. 2. Содержание α -токоферола в крови и гомогенатах тканей в динамике чумной ЛПС-интоксикации (ЛПС в дозе, эквивалентной ЛД₅₀)

дотелиоцитов, явления сладжа, агрегации и адгезии форменных элементов в микрососудах. В слизистой оболочке кишечника отмечались некротические изменения в апикальных отделах ворсин, умеренная лимфоцитарная инфильтрация их стромы.

Обнаруженные нами расстройства микроциркуляции, дистрофические и некротические изменения в тканях на стадии выраженных клинических проявлений интоксикации, как и на более ранней стадии, сочетались с активацией процессов ЛПО. Об этом свидетельствовало избыточное накопление ГПЛ и МДА в крови и гомогенатах тканей. Причем содержание МДА в эритроцитах и ГПЛ в плазме крови и эритроцитах прогрессирующе нарастало по сравнению с таковым в ранний период интоксикации (таблица). В почках уровень МДА оставался высоким, как и на предыдущей стадии интоксикации, а ГПЛ – прогрессирующе нарастал. В гомогенатах печени спустя 4 ч после введения токсина экспериментальным животным сохранялось чрезмерно высокое содержание промежуточных продуктов ЛПО, как и на стадии ранних клинических проявлений (рис. 1). Между тем, наиболее выраженное прогрессирующее накопление ГПЛ и МДА отмечалось в гомогенатах кишечника.

Одновременно усугублялась и недостаточность АОС: прогрессирующе снижалась активность СОД крови ($p < 0,001$). Аналогичная недостаточность активности указанного фермента отмечалось в гомогенатах печени ($p < 0,001$) и кишечника ($p < 0,001$) как по сравнению с предыдущей стадией интоксикации, так и по сравнению с показателями контрольной группы животных. Причем, в гомогенатах почек обнаруживалась корреляция тяжести интоксикации и прогрессирующего снижения активности СОД ($p < 0,001$). Результаты экспериментов свидетельствовали также о прогрессирующей абсолютной недостаточности каталазы в гомогенатах всех исследованных органов

($p < 0,001$). При одновременном исследовании неферментного звена АОС обнаружено низкое содержание α -токоферола в плазме крови ($p < 0,001$), гомогенатах печени ($p < 0,001$) и тонкого кишечника ($p < 0,001$). Обнаружена коррелятивная взаимосвязь между углублением тяжести клинических проявлений интоксикации и прогрессирующим снижением уровня α -токоферола в эритроцитарной массе ($p < 0,001$) и гомогенатах почек ($p < 0,001$) (рис. 2).

Полученные нами результаты позволяют заключить, что в динамике чумной интоксикации, достигаемой введением ЛПС *Y. pestis* в дозе, эквивалентной ЛД₅₀, возникают выраженные изменения в микроциркуляторном русле и органоспецифических элементах органов и тканей, участвующих в инактивации и элиминации токсина, коррелирующие с тяжестью клинических проявлений патологии, избыточным накоплением продуктов ЛПО и недостаточностью механизмов антиоксидантной защиты.

Активация ЛПО является одним из признаков усиленного образования активных форм кислорода (синглетного кислорода, гидроксильных и супероксидных анион-радикалов, перекиси водорода и др.) и свободнорадикальной дезинтеграции биомембран. Образование свободных радикалов в условиях циркуляторной гипоксии, сопровождающей развитие эндотоксикоза при чумной интоксикации, может быть обеспечено утечкой электронов из дыхательной цепи митохондрий, в связи с их набуханием и образованием активных форм кислорода в процессе одно- и трехэлектронного его восстановления [8, 10, 12].

Вышеизложенное позволяет заключить, что активация процессов ЛПО в условиях недостаточности ферментного и неферментного звеньев АОС при чумной ЛПС-интоксикации, по всей вероятности, являются одними из ведущих патогенетических факторов развития нарушений микроциркуляции, гипоксической дистрофии и некробиоза в различных тканях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афанасьева Г.А., Чеснокова Н.П. О новых объективных критериях оценки степени тяжести чумной интоксикации. Паллиативная медицина и реабилитация. 2006; 2:6.
2. Афанасьева Г.А., Чеснокова Н.П. О роли активации процессов перекисного окисления липидов в патогенезе бактериального эндотоксикоза. Фундаментальные исследования. 2008; 3:53–6.
3. Афанасьева Г.А., Чеснокова Н.П., Будник И.А. О патогенетической значимости активации процессов липопероксидации в механизмах нарушений реологических свойств крови при бактериальном эндотоксикозе. Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. 2008; 1:3–8.
4. Габриэлян Н.И., Левицкий Э.Г., Щербакова О.И. Методы определения витамина Е в сыворотке крови. Тер. архив. 1983; 6:76–8.
5. Дальвадянц С.М., Белобородов Р.А. Изучение токсических свойств антигена, изолированного из чумного микроба по методу Вестфал-Людерица. Пробл. особо опасных инф. 1969; 2(6):138–42.
6. Домарадский И.В. Чума. М.: Медицина; 1998.
7. Королук М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. и др. Метод определения активности каталазы. Лаб. дело. 1988; 1:16–9.
8. Ленинджер А. Молекулярные основы структуры и функ-

ции клетки. Биохимия. М.: Мир; 1999. С. 390–422.

9. Рябиченко Е.В., Бондаренко В.М. Роль кишечной бактериальной микрофлоры и ее эндотоксина в патологии человека. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 3:103–11.

10. Скулачев В.П. Явления запрограммированной смерти. Митохондрии, клетки и органы: роль активных форм кислорода. Соровский Образовательный Журнал. 2001; 7(6):4–10.

11. Суплютов С.Н., Баркова Э.Н. Суточные и сезонные ритмы перекисей липидов и активности супероксиддисмутазы в эритроцитах у жителей средних широт и крайнего Севера. Лаб. дело. 1986; 8:459–63.

12. Чеснокова Н.П., Моррисон В.В., Бриль Г.Е. и др. Инфекционный процесс. М.: Академия естествознания; 2006.

13. Fried R. Enzymatic and non-enzymatic assay of Superoxide Dismutase. Biochimie. 1975; 57:657–60.

14. Heumann D. CD14 and LPB in endotoxemia and infections caused by Gram-negative bacteria. J. Endotox. Res. 2001; 7(6):439–41.

15. Savidge T.C., Newman P.G., Pan W.H. Lipopolysaccharide-induced human enterocyte tolerance to cytokine mediated interleukin-8 production may occur independently of TLR-4/MD-2 signaling. Pediatr. Res. 2006; 59(1):89–95.

Об авторах:

Афанасьева Г.А., Чеснокова Н.П., Маслякова Г.Н., Хоркин Ю.Ф. Саратовский государственный медицинский университет. 410012, Саратов, ул. Б. Казачья, д. 112. Тел. (845-2) 66-97-91. E-mail: gafanaseva@yandex.ru

Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, д. 46. Тел. (845-2) 26-21-31. E-mail: microbe@san.ru

G.A.Afanasieva, N.P.Chesnokova, V.V.Kutyrev, G.N.Maslyakova, Yu.F.Khorkin

The Role of Lipoperoxidation Processes in Structural and Functional Disorganization of Biological Systems in Dynamics of Bacterial Endotoxemia

Saratov State Medical University, Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

The purpose of the study was to investigate the pathogenetic interrelation between the intensity of lipoperoxidation and pathomorphological changes in organs that are responsible for toxin inactivation and elimination (liver, kidneys, bowels) in dynamics of intoxication caused by *Yersinia pestis* lipopolysaccharide (LPS). We have demonstrated that dystrophic and necrobiotic changes as well as microcirculation disturbances in the organs progressed as lipoperoxidation products in homogenates and blood accumulated. Noted abnormalities correlated with severity of clinical manifestations of the pathology. The results obtained in this study allow to suppose that activation of free radical oxidation in dynamics of plague intoxication is an efferent segment of cytopathogenic effects of *Y. pestis* LPS.

Key words: *Y. pestis* LPS, bacterial endotoxemia, lipoperoxidation

Authors:

Afanasieva G.A., Chesnokova N.P., Maslyakova G.N., Khorkin Yu.F. Saratov State Medical University. 410012, Saratov, B.Kazach'a St., 112. E-mail: gafanaseva@yandex.ru

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

Поступила 23.09.08.

И.С.Барулина¹, Л.В.Саяпина¹, Н.П.Байдалова², И.И.Хорева², И.С.Мещерякова³,
М.И.Кормилицына³, С.А.Коровкин⁴

ОЦЕНКА ПОКАЗАТЕЛЯ «СПЕЦИФИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ» ЖИВОЙ ТУЛЯРЕМИЙНОЙ ВАКЦИНЫ

¹ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича, Москва; ²Филиал ФГУП НПО «Микроген» «Омское предприятие по производству бакпрепаратов»; ³ГУ НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН, Москва;

⁴ФГУП НПО «Микроген», Москва

Проведен анализ результатов контроля специфической безопасности вакцины туляреминой живой сухой, применяемой для профилактики туляремии. В период с 1997 по 2006 год выявлена нестабильность данного показателя. Специфическая безопасность вакцины является одним из основных показателей качества вакцины и несоответствие его при контроле требованиям нормативной документации (НД) является одной из основных причин брака. Предложено внести изменения в НД и использовать при контроле стандартных животных, строго соблюдая условия их содержания.

Ключевые слова: профилактика туляремии, оценка качества вакцин, туляреминая вакцина, специфическая безопасность.

Актуальность профилактики туляремии определяется наличием природных очагов этой инфекции, распространенных практически во всех регионах России. В последние годы отмечается тенденция к увеличению числа спорадических или небольших групповых случаев заболеваний. Это, прежде всего, связано с сокращением объемов профилактических и противоэпидемических мероприятий. Эффективность вакцинации населения против туляремии определяют данные по ее заболеваемости. [4–6]. Для иммунопрофилактики туляремии в нашей стране применяют живую туляремию вакцину, которую производит филиал ФГУП НПО «Микроген» «Омское предприятие по производству бакпрепаратов».

Общие требования к качеству вакцин, основанные на рекомендациях ВОЗ, касаются, прежде всего, их безопасности и специфической активности [3]. В соответствии с действующей нормативной документацией специфическая безопасность (безвредность) туляреминой вакцины определяется в опытах на морских свинках. Безопасными считаются те серии препарата, введение которых подкожно во внутреннюю поверхность бедра в дозе $5 \cdot 10^9$ м.к. в 1,0 мл не вызывает гибели животных в течение 15 сут. В месте инъекции возможен некроз тканей (кожи и подкожной клетчатки). Это согласуется с литературными данными, которые были использованы при разработке критериев оценки качества туляреминой вакцины [2, 5, 7].

По ранее действующей нормативной документации [1] специфическую безопасность оценивали на 3 морских свинках массой (400 ± 25) г при подкожном введении им $5 \cdot 10^9$ м.к./мл вакцины. На протяжении ряда лет (1987–1995 гг.) туляреминая вакцина соответствовала требованиям нормативной документации. Учитывая накопленный опыт, при очередной переработке нормативной документации было рекомендовано проводить контроль специфической вак-

цины на одной морской свинке массой (400 ± 25) г [8]. По такой же методике, изложенной в Фармакопейной статье предприятия, оценивается специфическая безопасность вакцины в настоящее время [9].

Однако введение морской свинке указанной выше дозы вакцины в некоторых случаях приводило к ее гибели в различные сроки наблюдения (от 6 до 15 сут). Серии препарата, которые не соответствовали требованиям нормативной документации по данному показателю, были забракованы. В 1999–2000 гг. в связи с недостаточным количеством морских свинок вакцина выпускалась по данным контроля специфической безопасности только ОБТК предприятия-изготовителя.

Для решения вопроса оценки специфической безопасности нами проведен анализ данных, полученных при контроле туляреминых вакцин в лаборатории препаратов против чумы и других ООИ ГИСК им. Л.А.Тарасевича за период 1997–2006 гг. (табл. 1). При этом учитывалась масса животных, а также сезонность проведения опыта. За указанный период времени 3 серии вакцины были забракованы, как не соответствующие нормативным требованиям, предъявляемым к препарату по специфической безопасности. В 1998 г. контроль 1 серии повторяли 2 раза на удвоенном количестве животных, так как при оценке показателя в опытах масса животных была меньше, чем указано в нормативной документации. При введении препарата животным массой 408 и 510 г они выжили. В 2001 и 2004 гг. по той же причине дважды повторяли контроль двух серий вакцины. В 2002 г. 7 серий вакцины были выпущены по данным ОБТК предприятия-изготовителя, так как животные, на которых проводили контроль, погибли от скрытой инфекции – была выделена культура *Proteus vulgaris*.

Для выяснения причин гибели павших животных вскрывали, проводили бактериологическое исследование лимфатических узлов, селезенки, печени, сердца с использованием питательной среды

Таблица 1

Результаты контроля специфической безопасности вакцины туляремийной живой

Год, месяц проведения контроля	Кол-во отконтролированных серий вакцины	Масса выживших животных, г	Масса павших животных, г	Результат контроля
1997, март – апрель	6	375, 380, 410, 415, 420, 500		Все серии соответствовали требованиям НД
1997, ноябрь	2	410, 440		Все серии соответствовали требованиям НД
1998, март – май	4	380, 410, 420, 500		Все серии соответствовали требованиям НД
1998, ноябрь	1	408, 510	345, 350, 360	Серия соответствовала требованиям НД, контроль повторяли 2 раза на удвоенном количестве животных
2001, май	1	400, 425	350	Серия соответствовала требованиям НД, повторяли
2001, октябрь	4	370, 390, 405, 410		Все серии соответствовали требованиям НД
2002, апрель	10		375, 380, 390	Обнаружена скрытая (сопутствующая) инфекция у морских свинок. 7 серий выпущены без контроля специфической безопасности
2002, декабрь		400, 410, 500	370, 375, 380, 400	
2003, ноябрь	4	400, 450, 500	380, 400, 410, 430	3 серии соответствовали требованиям НД. 1 серия забракована (контроль повторяли 3 раза)
2004, декабрь	6	375, 380, 390, 395, 400	320, 350,	Все серии соответствовали требованиям НД, контроль 1 серии повторяли
2005, ноябрь	3	375, 400	320, 410, 415, 430, 580, 630	2 серии забракованы по показателю «специфическая безопасность», контроль 1 серии повторяли
2006, сентябрь	3	460, 480*		Все серии соответствовали требованиям НД

* При контроле каждой серии использовали по 2 морских свинки.

для культивирования и выделения туляремийного микроба (FT-агар), а также просматривали мазки-отпечатки органов, окрашенные иммуноглобулинами диагностическими туляремийными флуоресцирующими. При вскрытии павших животных отмечали состояние тканей в месте введения, характер и распространенность изменений в них и внутренних органов. Наиболее выраженные изменения у морских свинок наблюдались при наличии сопутствующей инфекции. У животных, возможно, под воздействием массивной дозы вакцины развивалось обострение хронических заболеваний, приводящее к их гибели.

В 2005 г. было отконтролировано 3 серии вакцины на животных, полученных из питомников Саратовской области, из них 2 серии не соответствовали требованиям ФСП по «Специфической безопасности». Для выяснения причин нестабильности показателя «Специфическая безопасность» в феврале 2006 г. безопасность вакцины этих серий была изучена в лаборатории туляремии ГУ НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи. Контроль проводили на морских свинках массой 355–530 г (использовали по 2 животных на каждую серию), которым подкожно вводили по $5 \cdot 10^9$ м.к./мл вакцины. Погибло по одному животному массой 380 и 405 г от каждой серии вакцины на 8-е сутки после введения. Дополнительно использовали аналогичную методику контроля, но с уменьшенной вдвое концентрацией вакцины. От одной серии погибла 1 морская свинка на 14-е сутки. Обе серии вакцины были забракованы.

Для решения вопроса о внесении изменений в нормативную документацию на предприятии-изготовителе в период с июля по ноябрь 2006 г. был проведен контроль специфической безопасности 10 серий вакцины, на каждую серию использовали по 5 морских свинок (табл. 2). Также было изучено 10 серий вакцины в период с февраля по май 2007 г, используя для контроля каждой серии по 3 животных массой от 370 до 420 г. В результате проведенных исследований установлено, что введение морским свинкам разных серий туляремийной вакцины в дозе $5 \cdot 10^9$ м.к./мл приводило к уменьшению массы животных к 15 сут наблюдения. В большинстве случаев вводимая доза вакцины не вызывала гибели животных. Вместе с тем в первом случае от 3 серий вакцины погибло по 1 морской свинке из 5 на 6, 10 и 13-е сутки. Во втором эксперименте от 2 серий вакцины пали по 1 морской свинке из 3 на 3 и 10-е сутки. В некоторых случаях был отмечен некроз тканей на месте введения вакцины у 1–2 животных от серии.

При этом следует отметить, что критерий выживаемости при контроле туляремийной вакцины достаточно информативен. Если вакцина «Специфически безопасна», морские свинки нормального физиологического состояния и соответствующие по массе требованиям нормативной документации выживают в течение всего срока наблюдения (15 сут). При этом доза, вводимая животным, в 25 раз превышает накожную дозу для людей.

На основании полученных данных в норматив-

Результаты контроля специфической безопасности вакцины туляреминой в филиале ФГУП НПО «Микроген» «Омском предприятии по производству бакпрепаратов» в 2006 г.

№	Дата контроля	Масса животных до контроля, г	Масса животных после контроля, г	Примечание
1	14–29 июля	412±12	378±12	Все животные выжили в течение 15 сут наблюдения
2	14–29 июля	400±21	340±28	1 животное массой 370 г погибло на 6-е сутки наблюдения
3	14–29 июля	380±20	301±17	1 животное массой 370 г погибло на 10-е сутки наблюдения
4	4–19 августа	371±1	296±5	Все животные выжили в течение 15 сут наблюдения
5	6–23 сентября	414±8	338±53	1 животное массой 418 г погибло на 13-е сутки наблюдения
6	6–23 сентября	403±22	328±38	Все животные выжили в течение 15 сут наблюдения
7	10–25 октября	388±13	361±33	Все животные выжили в течение 15 сут наблюдения
8	3–18 ноября	382±21	372±8	Все животные выжили в течение 15 сут наблюдения
9	3–18 ноября	388±13	380±11	Все животные выжили в течение 15 сут наблюдения
10	3–18 ноября	374±4	368±6	Все животные выжили в течение 15 сут наблюдения

ную документацию на туляремию живую вакцину в раздел «Специфическая безопасность» было рекомендовано внести изменение – проводить контроль на 3 морских свинках массой не менее 400 г. Вакцину следует считать безопасной, если выживают все или 2 морские свинки. В случае гибели животных, для выяснения причины, их следует вскрывать и проводить бактериологическое исследование.

Таким образом, для проведения контроля специфической безопасности туляреминой вакцины необходимо использовать здоровых, стандартных морских свинок. При этом следует учитывать массу тела животных, микробиологический статус, строго соблюдать условия их содержания и кормления.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ВФС 42-105-ВС-87. Вакцина туляреминая живая сухая
2. Емельянова О.С. Журн. микробиол. 1957; 8:125–9.
3. Медунцын Н.В. Вакцинология. М.: Трида-Х; 2004. 448 с.
4. Никифоров В.В., Кареткина Г.Н. Туляремия: от открытия до наших дней. Инфекционные болезни. 2007; 5(1):67–76.
5. Олсуфьев Н.Г., Дунаева Т.Н. Природная очаговость, эпидемиология и профилактика туляремии. М.: Медицина; 1970. 272 с.
6. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ Онищенко Г.Г. № 33 от 20.12.2005 г. «Об усилении мероприятий по предупреждению распространения туляремии в Российской Федерации».
7. Сиротюк Л.В. Распределение антигена в органах морских свинок привитых туляреминой вакциной. Стандарты, штаммы и методы контроля бактериальных и вирусных препаратов: Сб. науч. тр. 1976; 2:226–8.
8. ФС 42-3178-95. Вакцина туляреминая живая сухая
9. ФСП 42-0504-3759-04. Вакцина туляреминая живая сухая.

Об авторах:

Барулина И.С., Саяпина Л.В. Государственный институт стандартизации и контроля им. Л.А.Тарасевича. 119002, Москва, ул. Сивцев Вражек, д. 41. Тел.: (845-2) 51-54-46.

Байдалова Н.П., Хорева И.И. Филиал ФГУП НПО «Микроген» «Омское предприятие по производству бакпрепаратов». Омск.

Мещерякова И.С., Кормилицина М.И. НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи РАМН. Москва.

Коровкин С.А. НПО «Микроген». Москва.

I.S.Barulina, L.V.Sayapina, N.P.Baidalova, I.I.Khoreva, I.S.Mescheryakova, M.I.Kormilitsyna, S.A.Korovkin

Assessment of "Specific Safety" Index of the Live Tularemia Vaccine

L.A.Tarasevich SISC, Moscow; Omsk Facility for Bacteriological Preparations Production, Branch of SPU "Microgen", Omsk; N.F.Gamaleya RIEM of RAMS, Moscow; SPU "Microgen", Moscow

Analyzed were the results of specific safety control of the live tularemia dry vaccine used for tularemia prophylaxis. During the period of 1997–2006 this index was shown to be unstable. Specific safety of the vaccine is one of the main parameters of its quality, and in cases it does not meet the requirements of the normative documentation (ND) the vaccine is rejected during the control. It was proposed to introduce amendments in ND and to use for vaccine control standard animals, the conditions of their keeping being strictly observed.

Key words: tularemia prophylaxis, vaccine quality evaluation, tularemia vaccine, specific safety.

Authors:

Barulina I.S., Sayapina L.V. L.A.Tarasevich SISC. 119002, Moscow, Sivtsev Vrazhek, 41.

Baidalova N.P., Khoreva I.I. Omsk Facility for Bacteriological Preparations Production, Branch of SPU "Microgen". Omsk.

Mescheryakova I.S., Kormilitsyna M.I. N.F.Gamaleya RIEM of RAMS. Moscow.

Korovkin S.A. SPU "Microgen". Moscow.

Поступила 29.10.08.

Т.А.Бондарева, А.Ю.Поярков, Е.Ю.Вахнов

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИОКСИДОНИЯ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ
ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫХ ФОРМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧУМЫ***ФГУ «48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства Обороны
Российской Федерации», Киров*

Изучена возможность использования современного иммуномодулятора «Полиоксидоний» при лечении чумы. В экспериментальной генерализованной форме инфекции у белых мышей, вызванной штаммом *Yersinia pestis* 231, являющимся типичным представителем континентальной разновидности чумного микроба, выявлено повышение эффективности антибиотикотерапии при включении полиоксидония в схему лечения. Показано увеличение продолжительности жизни и повышение количества выживших животных, зараженных возбудителем чумы как при профилактическом, так и экстренном введении полиоксидония на фоне лечения антибиотиком.

Ключевые слова: чума, полиоксидоний, иммуномодуляторы, генерализованная форма инфекции.

Чума – одно из наиболее опасных инфекционных заболеваний бактериальной природы. По мнению многих специалистов, *Yersinia pestis* входит в число наиболее вероятных поражающих агентов, которые могут быть использованы в составе биологических средств терроризма [10, 15, 16]. При этом наиболее опасным является скрытное (диверсионное) применение возбудителя, когда факт использования *Y. pestis* будет установлен лишь при возникновении манифестных форм болезни, на стадии разгара заболевания [11].

Ситуация осложняется уменьшением объемов противоэпидемических мероприятий на эндемичных территориях, отсутствием подготовленного медицинского персонала, а также недостаточным оснащением медицинских учреждений диагностическими и лечебными препаратами. Все это может быть причиной позднего выявления заболевания у людей на стадии генерализации инфекционного процесса [11, 13].

Исследователями отмечалось, что в качестве основных особенностей развития инфекционного процесса при чуме является скоротечность заболевания, быстрый переход его в генерализованную форму, завершающуюся выраженной интоксикацией и летальным исходом [4, 17]. Несмотря на достаточно широкий круг эффективных химиопрепаратов, благоприятный исход болезни возможен лишь при проведении лечения на ее ранних этапах [11, 12, 14]. В то же время большинством авторов показано, что терапия генерализованной формы чумной инфекции возможна лишь при комплексном применении препаратов, включающих, наряду с антибиотиками, и патогенетические лекарственные средства [14].

В последние годы достигнуты большие успехи в изучении возникновения и течения септического синдрома, что позволило определить ряд новых подходов в лечении этого осложнения как в эксперименте, так и в клинике [1]. Одним из них является использование иммуномодулирующих препаратов.

Развитие современной медицины и фарма-

кологии позволило получить большое число новых (синтетических) иммуномодулирующих препаратов («Тимоген», «Неоген», «Тимадепрессин», «Иммунофан», «Миелопид», глюкозаминалдипептид – ГМДП, «Липопид», «Полиоксидоний»). Однако лабораторные и клинические исследования, проведенные в ряде медицинских центров, показали, что одним из наиболее эффективных иммуномодулирующих препаратов при сепсисе и септическом шоке является «Полиоксидоний» (производство ООО «Иммафарма», Москва) [2, 9].

Полиоксидоний представляет собой физиологически активное высокомолекулярное соединение, обладающее выраженной иммуномодулирующей активностью [8, 9]. Препарат оказывает активирующее влияние на неспецифическую резистентность организма, фагоцитоз, гуморальный и клеточный иммунитет, а также подавляющее действие на образование внеклеточных форм кислорода и значительно повышает количество перекиси водорода в лейкоцитах. Кроме того, препарат регулирует продукцию провоспалительных цитокинов. Так было выявлено, что полиоксидоний усиливает образование фактора некроза опухоли у лиц с исходно пониженным или средним его уровнем, у людей с исходно повышенным синтезом этого цитокина снижает его продукцию [5]. Кроме того, как показали ранее проведенные исследования, полиоксидоний обладает детоксицирующими и антиоксидантными свойствами. Наличие данных свойств у препарата было подтверждено многочисленными клиническими испытаниями при лечении септических состояний [2, 3].

Материалы и методы

В работе использовали штамм *Y. pestis* 231, являющийся типичным представителем континентальной разновидности чумного микроба, в качестве антибактериального препарата гентамицин – антибиотик группы аминогликозидов («Дальхимфарм», Россия), полиоксидоний (ООО «Иммафарма», Москва).

Использовались препараты с не истекшим сроком годности. Лекарственные средства вводились в максимальных дозах, рекомендованных для человека, в пересчете на массу тела животного.

Опыты по оценке эффективности комплексного лечения генерализованных форм экспериментальной чумы с использованием полиоксидония проводили на беспородных белых мышах обоего пола массой тела 18–20 г. Животных заражали в соответствии с общепринятыми методиками подкожно во внутреннюю поверхность бедра двухсуточной агаровой культурой возбудителя чумы штамма 231, выращенной при температуре 26–28 °С. Заражающая доза составила 2000 ж.м.к.

Животных начинали лечить гентамицином через 48 ч после инфицирования. Антибиотик вводился внутримышечно 3 раза в сутки во внутреннюю поверхность бедра в течение 10 сут. Суточная доза препарата составляла 1,2 мг. Полиоксидоний вводили подкожно однократно в дозе 32 мкг в сутки.

Наблюдение за животными проводили в течение 30 сут. Павших животных подвергали патоморфологическому исследованию. Специфичность гибели подтверждали путем посева мазков отпечатков органов на плотную питательную среду. Оставшихся в живых белых мышей эвтаназировали и также подвергали патолого-анатомическому исследованию. Излеченными считали животных, у которых в посевах из внутренних органов отсутствовали микробы возбудителя чумы.

Статистическая обработка материалов исследования выполнена в соответствии с общепринятыми руководствами с использованием программ BIOSTAT 4.03 и статистического пакета программы Excel 7.0.

Результаты и обсуждение

Оценку эффективности полиоксидония на стадии генерализации инфекционного процесса проводили в опытах на белых мышах, зараженных культурой вирулентного штамма 231 *Y. pestis* в дозе 2000 ж.м.к.

Первой группе животных полиоксидоний вводили однократно за 24 ч до заражения подкожно, второй – в той же дозе через 1 ч после заражения однократно. Животные третьей группы получали препарат однократно через 48 ч после заражения, четвертой – через 48 ч после инфицирования на протяжении 5 сут. Иммуномодулятор использовали в максимальных дозах, рекомендованных для человека в пересчете на массу тела животного (32 мкг в сутки). Препарат вводился подкожно. Наряду с иммуностропным препаратом, животным через 48 ч после заражения начинали вводить гентамицин в дозе 1,2 мг в сутки.

В качестве контроля служили две группы белых мышей: первой вводили только гентамицин (группа 5) в дозе 1,2 мг в сутки через 48 ч после заражения, второй (группа 6) – лечение не проводили.

Основными критериями оценки эффективности использованных схем лечения являлись средний срок гибели, а также количество выживших животных (таблица).

Анализ приведенных в таблице данных показал, что при однократном введении полиоксидония до и во время заражения (1 и 2-я группы) гибель животных наблюдалась в более поздние сроки, чем при однократном введении на стадии генерализации инфекционного процесса (3-я группа). Средние сроки гибели составили $(5,6 \pm 1,1)$, $(5,6 \pm 0,9)$ и $(4,8 \pm 0,6)$ сут соответственно. Выживаемость белых мышей в этих группах составила 62, 58 и 26 %, соответственно, и была выше при использовании полиоксидония в ранние сроки.

При сравнении средних сроков гибели в 3-й и 4-й группах белых мышей, когда введение иммуномодулятора начинали через 48 ч и проводили однократно и в течение 5 сут, соответственно, достоверных различий не выявлено. Однако выживаемость животных в 4-й группе, при использовании полиоксидония в течение длительного срока, была значительно выше. Необходимо отметить, что сравниваемые показатели в 3-й и 4-й группах животных превышали таковые в группе контроля 6 без лечения.

В контрольных группах (5-й и 6-й) время гибели составило $(4,6 \pm 0,6)$ и $(3,7 \pm 0,3)$ сут, соответственно. Сравнительный анализ между группами выявил, что средние сроки гибели в группе животных, не получавших лечение, меньше, чем в других группах. Использование полиоксидония через 48 ч после заражения на протяжении 5 сут (4-я группа) позволило удлинить сроки жизни животных по сравнению как с опытными (3-я группа), так и с контрольными (5,

Изучение возможности использования полиоксидония при лечении экспериментальной чумы белых мышей на стадии генерализации инфекционного процесса

Группа	Схема лечения	Кол-во животных, взятых в опыт	Кол-во выживших животных	Среднее время гибели, сут. ($\bar{X} \pm I_{95}$)
1	Полиоксидоний 32 мкг однократно за 24 часа до заражения + гентамицин 1,2 мг в сутки (10 суток)	100	62	$5,6 \pm 1,1$
2	Полиоксидоний 32 мкг однократно через 1 ч после заражения + гентамицин 1,2 мг в сутки (10 сут)	100	58	$5,6 \pm 0,9$
3	Полиоксидоний 32 мкг в сутки через 48 ч после заражения однократно + гентамицин 1,2 мг в сутки (10 сут)	100	26	$4,8 \pm 0,8$
4	Полиоксидоний 32 мкг в сутки через 48 ч после заражения в течение 5 сут + гентамицин 1,2 мг в сутки (10 суток)	100	54	$5,4 \pm 0,6$
5	Гентамицин 1 мг в сутки через 48 ч после заражения (10 сут)	50	8	$4,6 \pm 0,6$
6	Без лечения	50	0	$3,7 \pm 0,3$

6-я группы).

В опытных группах животных, получавших наряду с гентамицином иммуномодулятор полиоксидоний, выживаемость была выше, чем в контрольной группе, получавшей гентамицин. При сравнении выживаемости в опытных группах 1, 2 и 4 отмечалась тенденция к повышению выживаемости в группах животных, которым полиоксидоний вводили до развития заболевания. Аналогичные результаты были получены другими авторами при применении иммуностимуляторов – мурамилдипептид, сальмон, продигозан, имунал и др. [6, 7].

Таким образом, в ходе настоящих исследований в опытах на белых мышах была оценена возможность использования полиоксидония при лечении экспериментальной чумы в условиях позднего начала антибиотикотерапии. Полученные результаты показали, что введение в терапевтические схемы полиоксидония достоверно повышало выживаемость животных опытной группы, получавших, наряду с антибиотиком, данный препарат, по сравнению с животными контрольной группы, которым вводили только антибактериальный препарат. Эффективность лечения при использовании полиоксидония была связана, по нашему мнению, с наличием у него, наряду с иммуномодулирующими, детоксицирующими и антиоксидантными свойствами.

С учетом полученных экспериментальных данных и большого клинического опыта по использованию данных препаратов в лечении ургентных состояний (ожоговой болезни, краш-синдрома, сепсиса, вызванного грамотрицательными микроорганизмами) можно рекомендовать использование полиоксидония для терапии генерализованных форм чумы у людей.

Добавление полиоксидония в схему лечения антибиотиками генерализованной стадии инфекционного процесса при чуме повышает выживаемость белых мышей, профилактическое или экстренное (сразу после заражения) введение полиоксидония на фоне лечения гентамицином увеличивает продолжительность жизни зараженных возбудителем чумы белых мышей и количество выживших животных, длительная терапия полиоксидонием усиливает лечебный эффект его применения в условиях позднего начала лечения антибиотиками.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белобородов В.Б. Сепсис – современная проблема клинической медицины. Русский медицинский журнал. 1997; 5(24):1589–96.
2. Гординская Н.А., Пылаева С.И., Сидоркин В.Г. и др. Влияние полиоксидония на уровень интоксикации у ожоговых больных. Иммунология. 2002; 6:363–5.
3. Гординская Н.А., Пылаева С.И. Влияние полиокси-

дония на течение генерализованной инфекции при ожогах. Иммунология. 1999; 1:60–4.

4. Домарадский И.В. Чума. М.: Медицина; 1998.
5. Дьяконова В.А., Климова С.В., Ким К.Ф. и др. Продукция цитокинов под действием полиоксидония *in vitro*. Иммунология. 2002; 23(6):237–40.
6. Ерофеев М.К., Максакова М.А., Шадрин А.С. и др. Оценка эффективности применения препарата «иммунал» с целью профилактики гриппа и других острых респираторных заболеваний. Terra medica. 2000; 4:37–9.
7. Манько В.М., Петров Р.В., Хаитов Р.М. Иммуномодуляция: история, тенденции развития, современное состояние и перспективы. Иммунология. 2002; 23(3):132–8.
8. Некрасов А.В., Пучкова Н.Г. Полиоксидоний: основы синтеза и свойства. Иммунология. 2002. 23(6):329–33.
9. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Некрасов А.В. и др. Полиоксидоний – препарат нового поколения иммуномодуляторов с известной структурой и механизмом действия. Иммунология. 2000; 5:24–8.
10. Распоряжение Президента Российской Федерации «О контроле за экспортом из Российской Федерации возбудителей заболеваний (патогенов) человека, животных и растений, их генетически измененных форм, фрагментов генетического материала и оборудования, которые могут быть применены при создании бактериологического (биологического) и токсинного оружия» № 288 от 14.06.94.
11. Черкасский Б.А., Иванова А.А. Эпидемиологическая ситуация по зоонозам в России. Эпидемиол. и инф. бол. 1996; 2:12–5.
12. Byrne W.R., Welkos S.L., Pitt M.L. et al. Antibiotic Treatment of Experimental Pneumonia Plague in Mice. Antimicrob. Agents Chemother. 1998; 42(3):675–81.
13. Galimand M., Guilleul A., Gerbaud G. et al. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. N. Engl. J. Med. 1997; 337(10):677–80.
14. Gradon J.D. Plague Pneumonia. Curr. Infect. Dis. Rep. 2000; 4:244–48.
15. Inglesby T.V., Dennis D.T., Henderson D.A. et al. Plague as a Biological Weapon. JAMA. 2000; 283(17):2281–90.
16. Inglesby T.V., Crossman R., O'Toole T. A plague on your city: Observations from TOPOFF. Clin. Infect. Dis. 2001; 32:436–45.
17. Pollitzer R. Plague. Geneva: WHO; 1954.

Об авторах:

Бондарева Т.А., Поляков А.Ю., Вахнов Е.Ю. 48 НИИ Минобороны России. Киров.

T.A.Bondareva, A.Yu.Poyarkov, E.Yu.Vakhnov

Application of Polyoxidonium in the Mixed Treatment of Experimental Plague Generalized Forms

Russian Ministry of Defense 48 Central Research Institute, Kirov

Applicability of modern immunomodulator “Polyoxidonium” for plague treatment was investigated. Inclusion of Polyoxidonium in the therapeutic scheme increased efficiency of treatment with antibiotics of experimental generalized plague in mice challenged with *Yersinia pestis* strain 231, the latter being typical representative of continental variant of plague microbe. Life duration enhancement and increase of the number of survived animals challenged with plague agent were registered after prophylactic or emergency injection of Polyoxidonium against the background of treatment with antibiotic.

Key words: plague, Polyoxidonium, immunomodulators, generalized form of infection.

Authors:

Bondareva T.A., Poyarkov A.Yu., Vakhnov E.Yu. Russian Ministry of Defense 48 Central Research Institute. Kirov.

Поступила 29.10.08.

М.Н.Киреев, Т.М.Тараненко, Т.А.Храмченкова, Н.П.Гусева, Т.А.Полунина, В.И.Павлова,
Н.А.Подборонова, З.Л.Девдариани, А.Б.Голова, С.М.Дальвадяниц

ИЗУЧЕНИЕ СТАБИЛЬНОСТИ АНТИГЕННЫХ КОМПОНЕНТОВ ЧУМНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ (Ф1+ОСА) В ТЕСТАХ НА «УСКОРЕННОЕ СТАРЕНИЕ» И СТРЕСС-УСЛОВИЯ

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

При комплексном иммунохимическом и иммунобиологическом анализе видоспецифического капсульного белка Ф1 чумного микроба и гликопротеидного по химической природе основного соматического антигена (ОСА), общего по специфичности у близкородственных бактерий чумы и псевдотуберкулеза, было установлено, что оба препарата, выделенные из клеток *Yersinia pestis* по стандартным методикам, в тестах на «ускоренное старение» при 37 °С в течение 4 недель и на стресс-условия при 60 °С в течение 24 ч, подобно препаратам, находившимся в условиях холодильника при 4–8 °С, стабильно сохраняли свои основные параметры, характеризующие их полноту и специфическую активность: внешний вид, растворимость, химический состав, иммунохимическую гомогенность и иммунобиологическую активность.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, антигены Ф1 и ОСА, иммунохимические и иммунобиологические характеристики, ускоренный тест термостабильности.

Выделение в очищенном виде и сохранение биологически активных веществ микробного происхождения представляет несомненный научный и практический интерес как для выяснения их роли в патологии инфекционного процесса, так и для целей диагностики и профилактики соответствующих заболеваний. На сегодняшний день лиофилизация бактериальных антигенов, используемых как компоненты диагностических тест-систем или бесклеточных вакцин, считается пока лучшим способом достижения стабильности всех качественных показателей таких препаратов, обеспечивающим их безопасность и эффективность. Как известно, для лиофилизированного препарата отсутствуют такие поверхности как воздух-жидкость или стекло-жидкость. Кроме того, высокий негативный заряд поверхности стекла и гидрофобные силы пластикового контейнера могут вызывать усиленную агрегацию белка в растворе [7], которую можно предупредить путем лиофилизации препарата.

Очень часто для сохранения специфических антигенных свойств бактериальных препаратов в качестве стабилизаторов используют различные вещества. Так, например, добавление комплекса пентацина в концентрации 0,5 % в 2 раза увеличивало продолжительность срока хранения при 4 °С энтеротоксина *E. coli* [7], а одновременное внесение сахарозы (3 %) и тиосульфата натрия (1 %) заметно повышало стабильность холерных агглютинирующих сывороток [15]. Согласно международной практике в качестве стабилизаторов для внутривенных иммуноглобулинов используют в специально подобранной комбинации и оптимальной концентрации мальтозу, глюкозу, глицин, а также сахарозу и полиэтиленгликоль [7].

В то же время в медицинской практике широко используются бесклеточные вакцины против гриппа,

брюшного тифа, пневмококковых и стафилококковых инфекций, содержащие только растворимые антигены без добавления стабилизаторов [12, 14]. В отечественной практике также разрабатываются экспериментальные химические чумные вакцины (ХЧВ), представленные бикомпонентным препаратом, состоящим из смеси капсульного белка Ф1 и основного соматического антигена (ОСА) гликопротеиновой природы или одним антигеном Ф1, депонированным на геле гидроокиси алюминия [5]. К тому же Ф1, будучи основным иммуногеном и видоспецифическим антигеном чумного микроба, является важнейшим компонентом современных диагностических тест-систем [11].

Учитывая практическое использование Ф1 и ОСА чумного микроба как компонентов профилактических и диагностических препаратов, несомненно важность приобретают вопросы стабильности их основных специфических свойств при хранении антигенов в нестандартных экстремальных условиях.

В настоящей работе приведены результаты изучения стабильности сухих лиофилизированных антигенных препаратов Ф1 и ОСА чумного микроба в тестах на «ускоренное старение» и стресс-условия.

Материалы и методы

Для экспериментов были взяты антигенные препараты чумного микроба Ф1 и ОСА (по 3 серии каждого), изолированные из вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV НИИЭГ.

Препараты извлекали по стандартным методикам: Ф1 – из центрифугата бульонной культуры путем одноэтапной колоночной гель-хроматографии [13] и ОСА – из агаровой культуры экстракцией трихлоруксусной кислотой по Буавену [1].

Все исследованные образцы антигенов были лио-

фильно высушены в течение 18–24 ч на коллекторном аппарате в камере ЛЗ-9 (фирма «Фригера», ЧССР) при экспериментально отработанном оптимально эффективном режиме: медленное (4–10 ч) предварительное замораживание до -40°C для обоих препаратов и досушивание при температуре не выше 16°C для Ф1 и более высокой ($20\text{--}22^{\circ}\text{C}$) – для ОСА [2].

Показатели стабильности получены при испытании антигенов Ф1 и ОСА в тестах на «ускоренное старение» (выдерживание антигенов при 37°C в течение четырех недель) и на стресс-условия (при 60°C 24 ч). Выбор таких достаточно жестких температурных режимов был сделан на основе рекомендаций международной практики для контроля стабильности вводимых внутривенно иммуноглобулинов [7] и определения сроков годности лекарственных средств [10] и холерных агглютинирующих сывороток [15]. Контрольные образцы сохранялись в холодильнике при $4\text{--}8^{\circ}\text{C}$.

Для оценки качественных показателей антигенных препаратов определяли основные параметры, характеризующие их подлинность и специфическую активность: внешний вид, растворимость, физико-химические, серологические и биологические свойства. Содержание белка в препаратах определяли по Лоури, полисахарида – с тимоловым реактивом, О-ацетильных групп – по Алицыно [8]. Серологическую активность исследовали в реакции иммунодиффузии (РИД), иммуноферментном анализе (ИФА), в реакции непрямой геммагглютинации (РНГА), которую ставили с диагностикомом эритроцитарным чумным иммуноглобулиновым (сер. № 4, Киров), любезно предоставленным канд. мед. наук Е.П.Савостиной, а также в ракетном иммуноэлектрофорезе [3]. Антигенные свойства Ф1 изучали на беспородных белых мышах, определяя титр специфических антител в сыворотке животных через 14 дней после однократной внутрибрюшинной иммунизации в дозе 100 мкг с ПАФ. Статистическую обработку ряда показателей проводили традиционными методами с расчетом средних величин, их ошибок и достоверности различий по таблице Стьюдента.

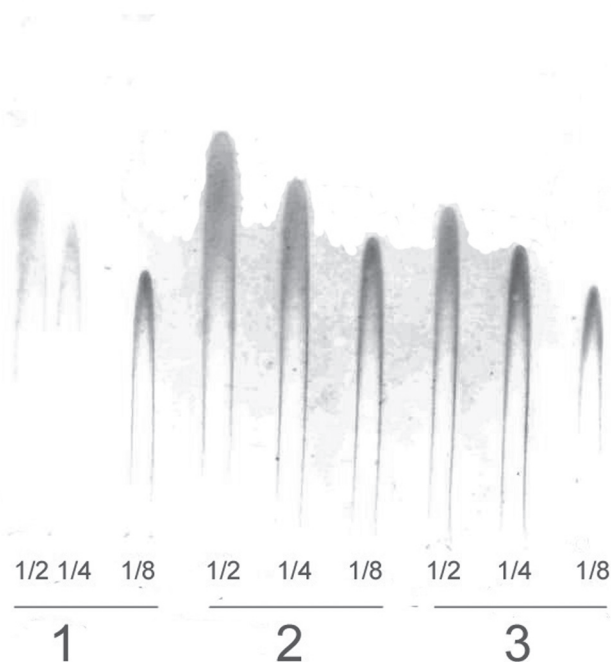
Результаты и обсуждение

Результаты воздействия указанных условий на сухие препараты капсульного антигена Ф1 представлены в табл. 1. Как оказалось, капсульный антиген в тестах на «ускоренное старение» и стресс-условия проявил достаточную стабильность своих основных параметров. По сравнению с контролем ($4\text{--}8^{\circ}\text{C}$) при выбранных двух экспериментальных режимах хранения (37 и 60°C) капсульный антиген полностью сохранял внешний вид, характеристики растворимости по времени, прозрачности и цветности растворов, а также гомогенность, давая единственную линию преципитации в РИД с чумной лошадиной поливалентной агглютинирующей сывороткой. При этом очень важно, что капсульный антиген практи-

чески полностью сохранил и первоначальную серологическую активность, выявляемую в РИД, РНГА и ИФА. Такое сохранение высокой серологической активности у Ф1 в условиях высоких температур при наблюдаемом статистически недостоверном снижении ($P > 0,05$) содержания белка в опытных препаратах Ф1 по сравнению с контролем (средние величины белка: контроль $4\text{--}8^{\circ}\text{C}$ – $(85,5 \pm 9,37)\%$, опыт 37°C – $(78,5 \pm 7,1)\%$; опыт 60°C – $(70,0 \pm 5,0)\%$ может свидетельствовать о заметной термостабильности специфических белковых эпитопов, ответственных за иммунохимическую активность [9]. При этом опытные образцы Ф1 после воздействия высоких температур наравне с контрольными проявляли также выраженную дозозависимую активность в ракетном иммуноэлектрофорезе с кроличьей антисывороткой (рисунок).

При сравнительном изучении иммунореактивности на беспородных мышах контрольного препарата Ф1 ($4\text{--}8^{\circ}\text{C}$) и его подвергшихся температурному воздействию образцов Ф1 (60°C 24 ч) и Ф1 (37°C 4 нед.) уровень антительного ответа ($M \log_2 \pm m$) в ИФА был соответственно $14,2 \pm 0,4$; $13,7 \pm 0,3$; $13,6 \pm 0,3$ и колебался в пределах недостоверной статистической разницы ($P > 0,05$).

Представленные в табл. 2 результаты иммунохимического анализа препаратов ОСА также в основном подтвердили их стабильность в тестах на «ускоренное старение» и стресс-условия. Прежде всего было установлено, что все экспериментальные образцы ОСА после воздействия высоких (37 и 60°C) температур как и контрольные ($4\text{--}8^{\circ}\text{C}$) сохраняли свою подлинность и в тесте иммунодиффузии



Ракетный иммуноэлектрофорез Ф1 (сер. 44) с кроличьей антисывороткой:

1/2, 1/4, 1/8 – концентрация белка 0,5; 0,25 и 0,125 мг в 1 мл соответственно (в лунку вносили по 10 мкл образца);
1 – 4 недели при 37°C ; 2 – 24 часа при 60°C ; 3 – контроль

Показатели стабильности лиофилизированных препаратов капсульного антигена Ф1 чумного микроба в процессе хранения при разных условиях

Параметры	Препараты Ф1, серия	Условия хранения*		
		Контроль (4–8 °С)	Ускоренное старение (37 °С, 4 нед.)	Стресс-условия (60 °С, 24 ч)
Внешний вид	40	Белая масса	Белая масса	Белая масса
	42	Слабо-желтая порошкообразная масса	Слабо-желтая порошкообразная масса	Слабо-желтая масса
	44	Белая сыпучая масса	Белая сыпучая масса	Белая сыпучая масса
Растворимость** (1 мг/мл)	40	В течение 1 ч при 20–25 °С	В течение 1 ч при 20–25 °С	В течение 1 ч при 20–25 °С
	42	В течение 30 мин	В течение 30 мин	В течение 30 мин
	44	«	«	«
Прозрачность раствора (1 мг/мл)	40	Слабоопалесцирующий	Слабоопалесцирующий	Слабоопалесцирующий
	42	Прозрачный	Прозрачный	Прозрачный
	44	Слабоопалесцирующий	Слабоопалесцирующий	Слабоопалесцирующий
Цветность раствора (1 мг/мл)	40	Бесцветный	Бесцветный	Бесцветный
	42	«	«	«
	44	«	«	«
Подлинность*** (идентификация)	40	Содержит только Ф1 в тесте РИД	Содержит только Ф1 в тесте РИД	Содержит только Ф1 в тесте РИД
	42	«	«	«
	44	«	«	«
Общий белок, %	40	81,0	79,0	65,0
	42	72,0	68,6	65,0
	44	103,5	88,0	80,0
(M ± m)		85,5±9,4	78,5±7,1	70,0±5,0
Серологическая активность (титры)****	РИД	40	64000	16000
		42	32000	16000
		44	32000	16000
	РНГА	40	256·10 ⁶	128·10 ⁶
		42	128·10 ⁶	256·10 ⁶
		44	512·10 ⁶	512·10 ⁶
	ИФА	40	8·10 ⁶	8·10 ⁶
		42	16·10 ⁶	16·10 ⁶
		44	16·10 ⁶	16·10 ⁶

*Все препараты хранились в лиофилизированном состоянии в стеклянных плотно закрытых флаконах без вакуума, защищенных от света.

**В воде и в 0,85 % растворе натрия хлорида (рН 7,2).

***Препараты специфически стерильны, не содержат антимикробных консервантов; иммунохимически гомогенны, образуя одну четкую характерную зону преципитации в РИД с чумными агглютинирующими лошадиными сыворотками.

****Указаны обратные значения титров.

в агаре давали одну четкую линию преципитации с чумной лошадиной агглютинирующей поливалентной сывороткой. Однако под воздействием высоких температур у двух из трех исследованных образцов наблюдалось некоторое изменение в окраске биомассы, которая из желтой стала коричневатой, очевидно за счет процессов карамелизации полисахаридной части ОСА. Это изменение внешнего вида совершенно не влияло на свойства растворимости препарата и содержание в нем белка. Наблюдавшиеся некоторые изменения углеводного компонента ОСА как средние показатели трех серий в виде увеличения процента

полисахарида [контроль 4–8 °С – (23±1,53) %; опыт 37 °С – (28,93±5,73) %; опыт 60 °С – (34,73±7,38) %] и О-ацетильных групп [контроль 4–8 °С – (4,73±0,43) %; опыт 37 °С – (7,91±1,03) %] были статистически недостоверны при P > 0,05.

Учитывая это, а также тот факт, что серологическая активность в РИД наиболее заметно (в 4 раза) снизилась при 60 °С только у одного (сер. 32) из трех препаратов ОСА, можно заключить, что подобно Ф1, ОСА в тестах на «ускоренное старение» и стресс-условия проявил достаточно высокую стабильность.

Поскольку ранее была выявлена иммунохими-

Таблица 2

Показатели стабильности лиофилизированных препаратов ОСА чумного микроба в процессе хранения при разных условиях

Параметры	Препараты, серия	Условия хранения *		
		Контроль (4–8 °С)	Ускоренное старение	Стресс-условия (60 °С, 24 ч)
Внешний вид	27	Слабо-желтая масса	Слабо-желтая масса	Слабо-желтая масса
	31	Желтая масса	Коричневая масса	Коричневая масса
	32	Слабо-желтая масса	Слабо-желтая масса	Коричневая спекшаяся масса
Растворимость**	27	Мгновенно при 20–25 °С	Мгновенно при 20–25 °С	Мгновенно при 20–25 °С
	31	«	«	«
	32	«	«	«
Прозрачность раствора	27	Прозрачный	Прозрачный	Прозрачный
	31	«	«	«
	32	«	«	«
Цветность раствора	27	Бесцветный	Бесцветный	Бесцветный
	31	Желтый	Желтый	Желтый
	32	Слабо-желтый	Слабо-желтый	Слабо-желтый
Подлинность*** (идентификация)	27	Содержит только ОСА в тесте РИД	Содержит только ОСА в тесте РИД	Содержит только ОСА в тесте РИД
	31	«	«	«
	32	«	«	«
Белок, %	27	6,2	5,8	5,0
	31	10,0	12,8	15,0
	32	12,5	10,8	12,0
Полисахарид, %	27	21,0	31,4	35,7
	31	26,0	37,4	47,0
	32	22,0	18,0	21,5
(M ± m)		23,0±1,5	28,93±5,73	34,73±7,38
Ацетильные группы, %	27	4,3	8,60	4,30
	31	5,6	7,74	5,16
	32	4,3	5,16	2,58
(M ± m)		4,73±0,43	7,91±1,03	4,1±0,96
Серологическая активность в РИД****	27	128000	128000	64000
	31	128000	128000	64000
	32	64000	128000	16000

*Все препараты хранились в лиофилизированном состоянии в стеклянных плотно закрытых флаконах без вакуума, защищенных от света.

**В воде и в 0,85 % растворе натрия хлорида (рН 7,2).

***Препараты специфически стерильны, не содержат антимикробных консервантов; иммунохимически гомогенны, образуя одну четкую характерную зону преципитации в РИД с чумными агглютинирующими лошадиными сыворотками.

****Указаны обратные значения титров.

ческая общность выделенного по Буавену R-соматического антигена у возбудителей чумы и псевдотуберкулеза и показана возможность использования последнего для иммунизации против чумы [4, 6], нами также изучена в экстремальных температурных условиях стабильность препаратов ОСА, выделенных из штамма *Y. pseudotuberculosis* 53, находящегося в R-форме диссоциации.

Иммунохимический анализ двух серий ОСА псевдотуберкулезных иерсиний, полученных в виде

сухого ацетонвысушенного порошка [1], в целом также свидетельствовал о достаточной стабильности этих антигенных компонентов в тестах на «ускоренное старение» и стресс-условия. Препараты ОСА псевдотуберкулезного микроба, подобно ОСА чумного микроба, при воздействии высоких температур (37 °С 4 нед. и 60 °С 24 ч), по сравнению с контролем (4–8 °С), сохраняли свои основные параметры (см. табл. 2): внешний вид (кремовый порошок), растворимость (в течение 1 ч при встряхивании),

прозрачность и цветность (слабо-желтый) раствора, подлинность (в РИД давали одну зону преципитации, идентичную с ОСА чумного микроба с чумной агглютинирующей лошадиной сывороткой), с этой сывороткой серологическую активность (в титре 1:4000), количество белка (9,5–11,5 %) и полисахарида (60,0–77,2 %). В то же время у ОСА псевдотуберкулезных иерсиний в жестких температурных условиях наблюдалось заметное снижение процента ацетильных групп (4–8 °С – 5,5 %, 37 °С – 2,76 %, 60 °С – 2,15 %).

Следует отметить, что при температуре 60 °С (30 мин) препарат ХЧВ (Ф1+ОСА) также не изменяет своей иммунологической активности (ИД₅₀ для белых мышей при подкожном инфицировании 5·10³ к.о.е. *Y. pestis* 231 = 5,744 мкг). Его активность заметно (ИД₅₀ > 20 мкг) снижается после прогрева при 80 °С (30 мин), а последующее повышение до 100 °С полностью инактивирует антигенную активность. Представление о влиянии стресс-условий на ХЧВ (Ф1+ОСА) расширились после получения результатов исследований, проведенных с целью разработки оптимальных условий ее стерилизации, в которых были применены радиационный и комбинированные (термо- и магнито-радиационный) методы обработки [5]. Стерилизующий эффект достигался при всех испытанных способах воздействия, но препарат ХЧВ не изменил своей специфической активности и, как показали последующие исследования, сохранил ее до 20 лет.

Таким образом, проведенный комплексный иммунохимический и иммунобиологический анализ видоспецифического капсульного белка Ф1 чумного микроба и гликопротеидного по химической природе основного соматического антигена (ОСА), общего по специфичности у близкородственных возбудителей чумы и псевдотуберкулеза показал, что оба препарата в тестах на «ускоренное старение» при 37 °С (4 нед.) и стресс-условия при 60 °С (24 ч), подобно препаратам, находившимся при 4–8 °С, стабильно сохраняли основные качественные показатели: внешний вид, растворимость, химический состав, иммунохимическую гомогенность и иммунобиологическую активность. Полученные результаты свидетельствуют об определенной термостабильности специфических биополимерных структур, ответственных за иммунобиологическую активность антигенов Ф1 и ОСА, используемых на практике в качестве компонентов экспериментальной ХЧВ (Ф1+ОСА).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бахрах Е.Э., Вейнблат В.И., Тараненко Т.М., Дальвадянец С.М., Гольдфарб Л.М. Методы выделения и очистки соматических антигенов чумных бактерий. Профилактика особо опасных инф. 1976; 1(47):131–9.
2. Буренин В.Г., Брандзишевский Ю.В., Пономарев И.Г., Филиппов А.Ф. Серологическая активность антигенов чумного микроба, лиофилизированных в различных режимах. В кн.: Диагн. и профилактика особо опасных инф. Саратов; 1983. С. 44–8.
3. Гааль Э., Медьешки Г., Верекеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир; 1982. 448 с.
4. Дальвадянец С.М., Филиппов А.Ф., Михайлова Р.С. Напряженность противочумного иммунитета, вызываемого у

морских свинок бактериями псевдотуберкулеза. Пробл. особо опасных инф. 1977; 4(56):40–3.

5. Дальвадянец С.М., Сероглазов В.В., Шарова И.Н., Сергеева Г.М., Дробышева Т.М., Миронова Н.П., Клайков С.А. Иммунологическая активность химической чумной вакцины, стерилизованной различными способами. Пробл. особо опасных инф. 1998; 1:69–73.

6. Домарадский И.В. Проблемы перекрестного иммунитета. М.: Медицина; 1976. 136 с.

7. Исрафилов А.Г., Кудашева Г.Б., Корнилова И.А., Алсынбаев М.М., Лютов А.Г., Кудашева Э.Ю. Иммуноген – первая отечественная стабильная лиофилизированная форма внутривенного иммуноглобулина в Российской Федерации. В кн.: Медицинские иммунобиол. препараты в XXI веке: разработка, производство и примен. Матер. Всерос. конф. Уфа; 2005. Ч. II. С. 5–12.

8. Кэбот Е., Мейер М. Экспериментальная иммунология. М.: Медицина; 1968. С. 657–8.

9. Коссе Л.В. Характеристика препаратов капсульного антигена чумного микроба, выделенных из генетически различающихся штаммов продуцентов [автореф. дис. ... канд. биол. наук]. Саратов; 1992. 18 с.

10. Кузнецов В.Д., Филиппов С.Н., Муравьева С.А., Фишман В.М. Прогнозирование выживаемости лиофилизированных спор *Actinomyces parvullus*, основанное на методе ускоренного хранения. Микробиология. 1977; 46(2):318–23.

11. Наумов А.В., Ледванов М.Ю., Дроздов И.Г. Иммунология чумы. Саратов; 1992. 172 с.

12. Осипова Г.Л. Поликомпонентная вакцина ВП-4 в терапии аллергических заболеваний. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2003; 1:36–42.

13. Сердобинцев Л.Н., Тараненко Т.М., Веренков М.С., Наумов А.В. Получение капсульного антигена методом одноступенчатой гелевой фильтрации. В кн.: Вопр. профилактик. природноочагов. инф. Саратов; 1983. С. 37–41.

14. Степанова Л.К., Белая Ю.А., Сергеева Н.С., Агеева В.А., Петрухин В.Г. Химическая бромнотифозная вакцина, содержащая комплекс поверхностных антигенов, включающий К-антиген. Журн. микробиол. 1993; 1:51–6.

15. Тюменцев С.Н., Каретников Э.С., Андреевская Н.М., Журавлева Н.П., Завезенов Н.П. Повышение стабильности холерных О, Инаба, Огава агглютинирующих сывороток. В кн.: Информация проблемно-тематич. комиссии по проблеме «Холера». Ростов н/Д; 1993. С. 31–2.

Об авторах:

Киреев М.Н., Тараненко Т.М., Храмченкова Т.А., Гусева Н.П., Полунина Т.А., Павлова В.И., Подборонова Н.А., Девдариани З.Л., Голова А.Б., Дальвадянец С.М. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, д. 46. Тел. (845-2) 26-21-31. E-mail: microbe@san.ru

M.N.Kireev, T.M.Taranenko, T.A.Khranchenkova, N.P.Gooseva, T.A.Polunina, V.I.Pavlova, N.A.Podboronova, Z.L.Devdariani, A.B.Golova, S.M.Dalvadyants

Analysis of Stability of Plague Chemical Vaccine (F1+MSA) Antigenic Components in the Tests of "Accelerated Ageing" and Stress Conditions

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Carried out was comprehensive immunochemical and immunobiological analysis of plague microbe species-specific capsule F1 protein, and glycoprotein main somatic antigen (MSA) the latter being common in specificity in closely related plague and pseudotuberculosis agents. Both preparations isolated from *Yersinia pestis* cells using standard techniques were examined in the test of "accelerated ageing" (exposure at 37 °C for 4 weeks) and in stress conditions (exposure at 60 °C for 24 hours). They were shown to preserve their main features that characterized their authenticity and specific activity (visual appearance, solubility, chemical content, immunochemical homogeneity and immunobiological activity) as compared with preparations stored in refrigerator at 4–8 °C.

Key words: *Yersinia pestis*, F1 antigen, MSA, immunochemical and immunobiological properties, accelerated test of thermostability.

Authors:

Kireev M.N., Taranenko T.M., Khranchenkova T.A., Gooseva N.P., Polunina T.A., Pavlova V.I., Podboronova N.A., Devdariani Z.L., Golova A.B., Dalvadyants S.M. Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 27.10.08.

К 80-ЛЕТИЮ ВАЛЕНТИНА ИВАНОВИЧА ПОКРОВСКОГО

1 апреля 2009 г. исполняется 80 лет Валентину Ивановичу Покровскому, директору Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии Роспотребнадзора, академику РАМН, доктору медицинских наук, профессору, лауреату Государственной премии и премий Правительства Российской Федерации в области науки и техники.

В.И.Покровский – крупнейший клиницист-инфекционист и эпидемиолог, одаренный педагог и талантливый организатор здравоохранения и медико-биологической науки, создатель отечественной школы инфекционистов, ученый с мировым именем. В течение многих лет он возглавлял Российскую академию медицинских наук, скоординировал деятельность РАМН и смежных подразделений РАН, РАСХН, РАО, ведущих министерств и медицинских вузов страны. Это позволило активно развивать новые направления медицинской науки: геномику, протеомику, метаболомику, эргономику, биоинформатику. Под руководством В.И.Покровского научно-исследовательскими учреждениями страны достигнуты значительные успехи по приоритетным направлениям медицинской науки.

Фундаментальные труды академика Покровского посвящены вопросам инфекционной патологии и эпидемиологии. Им разработаны важнейшие принципы лечения инфекционных больных, основы рационального применения антибиотиков, средств интенсивной терапии, методы диагностики и лечения острых кишечных инфекций, создана новая клиническая классификация холеры, разработана и внедрена в практику здравоохранения научно обоснованная система мер борьбы и профилактики СПИД.

Огромен вклад В.И.Покровского в борьбу с эпидемиями инфекционных болезней в различных регионах нашей страны и в зарубежных странах (чума – 1965 г., холера – 1970, 1973 гг., менингококковая инфекция).



Научные интересы академика Покровского разносторонни. Он изучает проблемы биобезопасности, им впервые сформулирована классификация источников биологической опасности, разработана система их обнаружения, идентификации и количественного определения. В.И.Покровский уделяет большое внимание развитию новейших технологий в молекулярной и клеточной биологии, изучению механизмов и путей дифференцировки стволовых клеток и клеток-предшественников. Разработанные им принципиально новые подходы к изучению этой мультидисциплинарной проблемы нашли отражение в программе «Новые клеточные технологии – медицине», утвержденной на заседании Президиума РАМН.

Научно-общественная деятельность В.И.Покровского обширна. Он является экспертом ВОЗ, членом Президиума ВАК Министерства образования и науки, коллегии Министерства здравоохранения и социального развития, Совета при Президенте России по науке и высоким технологиям, Правительственной комиссии по научно-инновационной политике, Правительственной комиссии по охране здоровья граждан, создателем и главным редактором журналов «Эпидемиология и инфекционные болезни», «Эпидемиология и вакцинопрофилактика», «Инфекционные болезни», членом редакционных коллегий «Терапевтического архива» и ЖМЭИ.

За заслуги перед отечественной наукой и здравоохранением Валентин Иванович награжден орденом Ленина, Трудового Красного Знамени, орденами «За заслуги перед Отечеством» III и II степени, медалями, именными премиями АМН СССР и РАМН.

Редакционная коллегия журнала «Проблемы особо опасных инфекций» сердечно поздравляет Валентина Ивановича Покровского с юбилеем, желает ему крепкого здоровья и дальнейших творческих успехов на благо российской медицинской науки.

К 90-ЛЕТИЮ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИНСТИТУТА ВАКЦИН И СЫВОРОТОК ИМ. И.И.МЕЧНИКОВА

Сотрудники Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» и редакционная коллегия журнала «Проблемы особо опасных инфекций» от всей души поздравляют коллектив Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова с замечательным юбилеем – 90-летием со дня образования института.

Дорогие друзья и коллеги! Успехов и удачи Вам в творческой деятельности на благо науки и отечественного здравоохранения!

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

При направлении статьи в редакцию следует соблюдать следующие правила:

1. Присылать один распечатанный экземпляр статьи и электронную копию на компакт-диске, дискете или по электронной почте. **Каждая статья должна иметь направление от учреждения, в котором она выполнена, экспертное заключение и лицензионный договор о предоставлении права использования произведения** (договор размещен на сайте РосНИПЧИ «Микроб» <http://www.microbe.ru>).

2. Размер статей (включая таблицы, резюме и список литературы) не должен превышать у оригинальных – 8 стр., обзоров – 12–14 стр., кратких сообщений – 4–5 стр.

3. К оригинальным, проблемным статьям, обзорам и кратким сообщениям должны прилагаться резюме (не более 10 строк) и ключевые слова. Резюме и ключевые слова должны быть **на русском и английском языках**.

4. В начале статьи указываются: инициалы и фамилия авторов, название работы, *названия учреждений – мест работы всех авторов, их должности и контактная информация (почтовый адрес с указанием индекса, телефон, адрес электронной почты)*. Статья должна быть подписана всеми авторами.

5. Количество иллюстраций не должно превышать 3 (либо 3 рис., либо 3 табл., либо 3 в совокупности).

6. Месторасположение таблиц и рисунков в тексте отмечать ссылками на полях (только в распечатанных экземплярах).

7. Таблицы не должны дублировать графики, должны иметь краткое название, быть компактными, с «шапками», точно отражающими содержание граф. Числа в таблицах должны быть статистически обработаны и соответствовать таковым в тексте.

8. Рисунки должны быть четкими. *В случае необходимости каких-либо обозначений они должны быть сделаны на втором экземпляре рисунка или фотографии*. Количество обозначений должно быть сведено к минимуму. Все объяснения следует давать в подрисуночной подписи.

9. Родовые и видовые названия микроорганизмов, инфраподвидовые категории, наименования семейств должны соответствовать принятым Международным таксономическим комитетом (9 изд. «Руководство по систематике бактерий Берги»). Первый раз название бактерий пишется полностью (*Shigella flexneri*), далее род – только одной прописной буквой, вид – полностью со строчной (*S. flexneri*). Наименования семейств пишутся полностью.

10. Сокращение слов, имен, названий (кроме общепринятых сокращений, мер физических и математических величин и терминов) допускается только с первоначальным указанием полного названия.

11. Математические формулы должны быть тщательно выверены. Во всех формулах необходимо размечать (только в распечатанных экземплярах):

строчные и прописные буквы: прописные обозначаются двумя черточками снизу, строчные – двумя черточками сверху;

латинские и греческие буквы: латинские подчеркиваются синим цветом, греческие – красным.

12. Литература (в оригинальных статьях – не более 15 источников, проблемных и обзорах – не более 50, кратких

сообщениях – не более 5–8) печатается в алфавитном порядке (сначала русские авторы, потом – иностранные). В тексте дается ссылка на порядковый номер списка (в квадратных скобках), а не на фамилию и годы. Фамилии иностранных авторов в тексте даются в иностранной транскрипции.

В списке литературы приводятся авторы работы, название статьи, название журнала или сборника, год, номер, страницы. Названия журналов должны быть сокращены в соответствии со стилем, принятом в Index Medicus (<http://www.nlm.nih.gov>). Для книг, диссертаций и патентов давать точное название. В ссылках на статьи, принятые в печать, но еще не опубликованные, нужно указать «(в печати)». При этом авторы должны получить письменное разрешение на упоминание таких статей и подтверждение, что они действительно приняты к публикации. Информация из рукописей, представленных, но еще не принятых в печать, должна обозначаться в тексте как «(неопубликованные наблюдения)» (обязательно наличие согласия автора). Ссылки должны быть сверены авторами с оригинальными документами.

Например, *статьи в журналах*:

Halpern S.D. Ubel P.A., Caplan A.L. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. N. Engl. J. Med. 2002; 347:284-7.

Если в статье более 6 авторов, перечислите первых 6 авторов и добавьте «и др. (*et al.*)»

Книги и другие монографии

Физические лица в качестве авторов:

Martin E.W. Hazards of medication. 2nd ed. Ruskin A., Napke E., Alexander S., Kelsey F.O., Farage D.J., Mills D.H., Elkas R.W., editors. Philadelphia: Lippincott; 1978. 686 p.

Редакторы, составители в качестве авторов:

Celli L., editor. The elbow: traumatic lesions. Warr A., translator. Vienna (Austria): Springer-Verlag; 1991. 203 p.

13. **Требования к электронным вариантам статей**: файлы с текстом и подрисуночными подписями должны быть в формате DOC (редактор Microsoft Word) или RTF; **рисунки и фотографии – в отдельных файлах в формате TIFF (разрешение – 300 dpi); диаграммы и графики должны быть выполнены в программе Excel (в отдельных файлах в формате XLS)**. Рисунки, фотографии, диаграммы и графики не вставлять в текст в программе Microsoft Word.

14. При невыполнении настоящих правил статьи не принимаются и отсылаются авторам на дооформление.

15. Редакция оставляет за собой право редактировать статьи, сокращать или исправлять, а также публиковать их в виде кратких сообщений (4–5 стр. текста с резюме и литературой без рисунков и таблиц). Вся работа проводится по авторскому оригиналу.

16. В случае отклонения статьи по рецензии редакция направляет автору мотивированный отказ.

17. Публикация – бесплатная.

Статьи направлять по адресу:

410005, Саратов, Университетская, 46, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Тел. (845-2) 51-82-22. Факс (845-2) 51-52-12. E-mail: microbe@san.ru