

# 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 научных рецензируемых журналов и изданий ВАК,  
в которых должны быть опубликованы  
основные научные результаты диссертаций*

**Выпуск 97**

**3 · 2008**

**САРАТОВ**

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

*Е.В.Самойловой,*

*Н.А.Савиновой*

Подписано в печать 03.11.08.

Формат 60×88 1/8.

Бумага офсетная.

Печать офсетная.

Гарнитура Таймс.

Усл. печ. л. 11,2.

Заказ 876.

Подписной индекс – 24687

ISSN 0370-1069. Пробл. особо  
опасных инф. 2008. Вып. 97. 1–70.

ISSN 0370-1069



9 770370 106008 >

#### РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ :

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

#### РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ :

В.В.Алексеев (Волгоград),  
В.Е.Безсмертный (Москва),  
И.В.Борисевич (Киров),  
А.Л.Гинцбург (Москва),  
И.Г.Дроздов (Кольцово),  
И.А.Дятлов (Оболensk),  
А.Н.Куличенко (Ставрополь),  
В.В.Кутырев (Саратов),  
Ю.М.Ломов (Ростов-на-Дону),  
Д.К.Львов (Москва),  
В.П.Бондарев (Сергиев Посад),  
В.В.Малеев (Москва),  
В.П.Сергиев (Москва),  
Ю.М.Федоров (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»*

© Федеральное государственное учреждение здравоохранения  
Российский научно-исследовательский противочумный  
институт «Микроб», 2008

**Problemy  
osobo opasnyh infekcij**

**ISSN 0370-1069**

**Problems  
of Particularly Dangerous Infections**

## Обзоры

- Смирнова Н.И., Челдышова Н.Б., Горяев А.А., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Эволюция генома *Vibrio cholerae*: пути формирования атипичных штаммов ..... 5
- Сырова Н.А., Терешкина Н.Е., Девдариани З.Л. Современное состояние иммунодиагностики туляремии ..... 12

## Эпидемиология

- Кузнецов А.А., Князева Т.В., Матросов А.Н. Паразитарные контактные сети в поселениях гребенщиковых и полуденных песчанок и их блох в песках Волго-Уральского междуречья ..... 16
- Кутырев И.В., Билько Е.А., Шарова И.Н., Красовская Т.Ю., Чекашов В.Н., Матросов А.Н. Оценка роли фоновых видов мышевидных грызунов в сохранении возбудителей арбовирусных инфекций в полупустынной зоне Саратовского Заволжья ..... 19
- Топорков В.П., Величко Л.Н., Шиянова А.Е., Кедрова О.В. Динамика заболеваемости чумой в мире ..... 22
- Шиянова А.Е., Топорков В.П., Луценко С.Н., Меркулова Т.К., Шилова Л.Д. Вопросы гармонизации нормативной базы в области санитарной охраны территории Российской Федерации с требованиями Соглашений Всемирной торговой организации ..... 26
- Яковлев С.А., Сангаджиева Г.В., Удовиков А.И., Санджиев В.Б.-Х., Осипов В.П., Диканская В.В., Попов Н.В. Оценка влияния ирригации и орошения на изменение западной границы ареала тamarисковой песчанки *Meriones tamariscinus* Pallas, 1773 (*Rodentia, Cricetidae*) на территории Республики Калмыкия ..... 31

## Микробиология

- Крепостнова И.М., Ливанова Л.Ф., Бугоркова С.А., Смирнова Н.И. Изучение протективных свойств сконструированного рекомбинантного диплазмидного штамма *Vibrio cholerae* серогруппы O139, продуцирующего В-субъединицу холерного токсина и фактор колонизации кишечной палочки CFA/I ..... 35
- Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Куклев В.Е., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Одинок Г.Н., Кутырев В.В. Сравнение полной нуклеотидной последовательности гена rhaS у штаммов возбудителя чумы основно-го и неосновных подвидов ..... 38

## Review

- Smirnova N.I., Cheldyshova N.B., Goryaev A.A., Lozovsky Yu.V., Kuttyrev V.V. *Vibrio cholerae* Genome Evolution: Ways of Atypical Strains Formation
- Syrova N.A., Tereshkina N.E., Devdariani Z.L. Current State of Tularemia Immunodiagnosics

## Epidemiology

- Kuznetsov A.A., Knyazeva T.V., Matrosov A.N. Parasitic Contact Nets in the Settlements of Tamarisk and Midday Gerbils and their Fleas in the Sands of Volga-Ural Country between Two Rivers
- Kutyrev I.V., Bil'ko E.A., Sharova I.N., Krasovskaya T.Yu., Chekashov V.N., Matrosov A.N. Assessment of the Role of Mouse-Like Rodents Background Species in the Preservation of Arboviral Infections Agents in the Semi-Desert Zone of Saratov Zavolzhie
- Toporkov V.P., Velichko L.N., Shiyanova A.E., Kedrova O.V. The Tendency of Plague Morbidity Dynamics in the World
- Shiyanova A.E., Toporkov V.P., Lutsenko S.N., Merkulova T.K., Shilova L.D. Problems of Harmonization of the Normative Basis in the Sphere of the Sanitary Protection of the Territory of the Russian Federation with the Requirements of the World Trade Organization Agreements
- Yakovlev S.A., Sangadzhieva G.V., Udovikov A.I., Sandzhiev V.B.-H., Ossipov V.P., Dikanskaya V.V., Popov N.V. Assessment of the Influence of Irrigation and Watering on the Changing of the Western Boundary of Tamarisk Gerbil *Meriones Tamariscinus* Pallas, 1773 (*Rodentia, Cricetidae*) Natural Habitat

## Microbiology

- Krepostnova I.M., Livanova L.F., Bugorkova S.A., Smirnova N.I. Investigation of Protective Properties of the Constructed Recombinant Biplasmid Strain of *Vibrio cholerae* O139 Serogroup Producing Cholera Toxin B Subunit and Escherichia coli Colonization Factor CFA/I
- Koukleva L.M., Yeroshenko G.A., Kouklev V.E., Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Odinokov G.N., Kuttyrev V.V. Comparison of Complete Nucleotide Sequence of rhaS Gene in the Strains of Plague Etiological Agent of Main and Minor Subspecies

**Иммунология, биотехнология, лечение**

**Бондарева Т.А., Калининский В.Б., Борисевич И.В., Барамзина Г.В., Фоменков О.О.** Сравнительная оценка эффективности современных фторхинолонов при лечении экспериментальной туляремии ..... 43

**Бугоркова С.А., Задумина С.Ю., Кутырев В.В.** Реакция клеток APUD-системы экспериментальных биомоделей на подкожную иммунизацию вакцинным штаммом *Yersinia pestis* EV ..... 46

**Витязева С.А., Старовойтова Т.П., Дубровина В.И., Медведева С.А., Грищенко Л.А., Шкаруба Т.Т.** Морфологические изменения в иммунокомпетентных органах животных в динамике вакцинального процесса, вызванного живой чумной вакциной с иммуномодуляторами ..... 50

**Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Храмова Е.М., Шепелёв И.А., Савицкая Л.В., Минаева Л.Н., Галкина М.В., Михеева Т.А., Кочкалова Н.Н., Киреев М.Н.** Получение препарата F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов антирабического иммуноглобулина с использованием иммобилизованного пепсина ..... 53

**Дубровина В.И., Голубинский Е.П., Витязева С.А., Марков Е.Ю., Николаев В.Б., Иванова Т.А., Коновалова Ж.А., Шкаруба Т.Т.** Влияние комплексного антигенного препарата *Yersinia pestis* EV на функциональную активность клеток фагоцитарной системы в эксперименте ..... 56

**Диагностика**

**Коннов Н.П., Волков Ю.П., Киреев М.Н., Кузнецов О.С.** Использование вейвлет-анализа для фильтрации изображений в электронной и зондовой микроскопии ..... 60

**Чухланцев Д.А., Маракулин И.В., Дармов И.В.** Использование ПЦР для идентификации и межвидового дифференцирования возбудителей сапа и мелиоидоза ..... 63

**Краткие сообщения**

**Самойлова Л.В.** Сравнительное изучение развития клинических форм экспериментальной чумы при аэрогенном и подкожном заражении вирулентными штаммами *Y. pestis* и их изогенными вариантами с различным плазмидным профилем ..... 66

**Чурбанова Т.А.** Природные очаги геморрагической лихорадки с почечным синдромом в Республике Мордовия ..... 68

**Юбилей**

К 70-летию Виктора Николаевича Метлина ..... 69

*Правила для авторов* ..... 70

**Immunology, Biotechnology, Treatment**

**Bondareva T.A., Kalininsky I.V., Borisevich I.V., Baramzina G.V., Fomenko O.O.** Comparative Assessment of Modern Fluoroquinolones Efficacy in Experimental Tularemia Treatment

**Bugorkova S.A., Zadumina S.Yu., Kutyrev V.V.** Reaction of APUD-System Cells of Experimental Biomodels to Subcutaneous Immunization by *Yersinia pestis* EV Vaccine Strain

**Vityazeva S.A., Starovoitova T.P., Dubrovina V.I., Medvedeva S.A., Grischenko L.A., Shkaruba T.T.** Morphological Alterations in Immunocompetent Organs of Animals in Dynamics of Vaccinal Process Caused by Live Plague Vaccine with Immunomodulators

**Generalov S.V., Abramova E.G., Nikiforov A.K., Hramkova E.M., Shepelev I.A., Savitskaya L.V., Minaeva L.N., Galkina M.V., Miheeva T.A., Kochkalova N.N., Kireev M.N.** F(ab')<sub>2</sub>-Fragments of Antirabic Immunoglobulin Production Using Immobilized Pepsin

**Dubrovina V.I., Golubinsky E.P., Vityazeva S.A., Markov E.Yu., Nikolayev V.B., Ivanova T.A., Konovalova Zh.A., Shkaruba T.T.** Influence of the Complex *Yersinia pestis* EV Antigenic Preparation Upon the Functional Activity of the Phagocytic System Cells Under Experimental Conditions

**Diagnostics**

**Konnov N.P., Volkov Yu.P., Kireev M.N., Kuznetsov O.S.** Application of wavelet-analysis for image filtration in electronic and probe microscopy

**Chuhlantsev D.A., Marakulin I.V., Darmov I.V.** Application of PCR for Identification and Interspecific Differentiation of Glanders and Melioidosis Etiological Agents

**Brief Communication**

**Samoilova L.V.** A Comparative Study of the Development of Clinical Forms of Experimental Plague after Aerogenic or Subcutaneous Challenge with Virulent *Y. pestis* Strains and their Isogenic Variants Containing Different Plasmid Combinations

**Churbanova T.A.** HFRS Natural Foci in the Republic of Mordovia

**Anniversaries**

To the 70-th anniversary of Victor Nikolaevich Metlin

*Instruction to Authors*

Н.И.Смирнова, Н.Б.Челдышова, А.А.Горяев, Ю.В.Лозовский, В.В.Кутырев

**ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМА *VIBRIO CHOLERAE*:  
ПУТИ ФОРМИРОВАНИЯ АТИПИЧНЫХ ШТАММОВ**

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

Представлен обзор литературных и собственных данных о путях возникновения атипичных по вирулентным свойствам штаммов *Vibrio cholerae* *eltor*. Показано, что повышение вирулентности возбудителя холеры эльтор в современный период связано с приобретением им профага СТХφ *Vibrio cholerae cholerae* в результате горизонтального переноса генов. Описан также другой возможный путь образования штаммов с более высоким уровнем вирулентности за счет изменения регуляции резидентных генов холерного токсина, обусловленной реорганизацией генома профага СТХφ внедрившимся транспозоном. Рассмотрены также данные о путях происхождения штаммов *ctxA*<sup>-</sup> *tcpA*<sup>+</sup> и их повышенной жизнеспособности в водной среде по сравнению с изогенными токсигенными клонами. Представлены перспективы разработки нового ПЦР-теста для выявления возбудителя холеры эльтор с измененной вирулентностью при мониторинговых исследованиях.

*Ключевые слова:* *Vibrio cholerae*, эволюция, геном, профаг СТХφ, вирулентность, холерный токсин, пандемии.

Изучение эволюции генома возбудителя холеры остается одним из приоритетных направлений в проблеме «Холера». Исследование эволюционных преобразований генома *Vibrio cholerae* позволяет получить ответы на многие вопросы, важные для диагностики, профилактики и мониторинга этого патогена: каковы причины и параметры естественного генетического разнообразия возбудителя холеры; как происходит процесс образования патогенных штаммов с новыми ранее неизвестными свойствами, что необходимо для прогнозирования эпидемической ситуации; почему и как формируются лекарственно-устойчивые штаммы; какие механизмы лежат в основе адаптации патогена к меняющимся условиям внешней среды?

К настоящему времени геном возбудителя холеры полностью секвенирован. Установлено, что в отличие от многих других возбудителей, этот патоген имеет две хромосомы, отличающиеся по размеру и функциям [10, 24, 31]. Значительная часть генов вирулентности локализована на первой или большой хромосоме и входит в состав различных мобильных генетических элементов (МГЭ) – профагов (СТХφ и RS1φ), «островов патогенности» (VPI-1, VPI-2) и «пандемичности» (VSP-1, VSP-2). Такая гетерогенная группа мобильных элементов была приобретена авирулентной предковой формой *V. cholerae* от неизвестных доноров в процессе горизонтального переноса генов [10, 24, 26, 33, 37, 42]. Присутствие в геноме возбудителя холеры чужеродных мобильных участков ДНК определяет его большую пластичность, которая выражается в изменении его размеров и функций за счет потери или приобретения МГЭ. Это обстоятельство может обусловить появление клонов с разным набором генов патогенности, резистентности к антибиотикам, а также диагностически значимых генов. Биологический смысл высокого

уровня изменчивости генома возбудителя – обеспечение его выживаемости в меняющихся условиях окружающей среды.

Как происходит эволюция бактериального генома *V. cholerae*? К настоящему времени накоплены многочисленные факты, свидетельствующие о том, что в основе этого процесса лежат различные генетические события – инактивация функционально активных генов, редукция генома, мутации (замены, делеции, инверсии). Однако наиболее значимый вклад в эволюционные преобразования генома холерного вибриона внес горизонтальный перенос генов [3, 10, 16, 18, 20, 26, 41]. Основное последствие этого процесса – появление в хромосоме ранее авирулентной предковой формы чужеродных геномных островов с генами патогенности.

К настоящему времени стало известно, что в результате эволюции в пределах вида образовалось три эпидемически опасных штамма, отличающихся друг от друга по фенотипическим и генетическим свойствам – *V. cholerae* O1 серогруппы классического биовара, *V. cholerae* O1 серогруппы биовара эльтор и *V. cholerae* O139 серогруппы [1, 8, 10, 14, 15, 26, 32, 36].

*V. cholerae* классического биовара был, видимо, возбудителем первых шести пандемий азиатской холеры (с 1817 по 1926 год), при которой в ряде стран «смертность превышала возможности хоронить мертвых» [1, 26, 32]. Однако к началу прошлого столетия эти вибрионы были вытеснены на эндемичной для них территории холерными вибрионами биовара эльтор. Именно *V. cholerae* *eltor* вызвали текущую, 7-ю, пандемию холеры, начавшуюся в 1961 г. и продолжающуюся до сих пор [1, 7, 10, 20, 24]. Что касается внезапно появившегося в 1992 г. в Индии и Бангладеш нового эпидемического штамма *V. chol-*

*erae* O139, то прогноз ряда исследователей о начале новой, 8-й, пандемии холеры, связанной с этим возбудителем, пока не оправдался [8, 14, 26, 36].

К настоящему времени установлено, что классические вибрионы более вирулентны по сравнению с вибрионами эльтор. Они эффективнее колонизируют тонкий кишечник человека и продуцируют больше холерного токсина (ХТ), который кодируется генами *ctxAB*, входящими в состав двух профагов СТХφ, локализованных на разных хромосомах [1, 10, 15, 17, 49]. Видимо, за счет этих свойств классические вибрионы часто вызывают тяжелые формы диареи. Что касается вибрионов эльтор, то более 80,0 % людей, зараженных этим возбудителем, переносят мягкую, часто бессимптомную форму диареи. Одна из основных причин такого явления – более низкий уровень токсигенности этого возбудителя, несмотря на присутствие у более 30,0 % штаммов двух или более копий профага СТХφ на первой хромосоме [1, 10, 23, 24, 27, 34].

Вместе с тем вопрос о том, почему более вирулентный возбудитель холеры был замещен менее вирулентным, пока открыт. Предполагается, что основная причина этого события – высокая устойчивость вибрионов эльтор к неблагоприятным условиям внешней среды. Следует отметить, что несмотря на смену биовара возбудителя, холерные классические вибрионы, видимо, никогда не были полностью замещены вибрионами эльтор. Так, в 2008 г. появилось сообщение о выделении из водной среды в Ираке наряду с эльтор вибрионами нескольких штаммов *V. cholerae* классического биовара [38, 39, 49]. К настоящему времени принято считать, что классические вибрионы образуют естественный резервуар генов вирулентности [10, 38, 39]. Основной же угрозой для мирового сообщества продолжает оставаться холера эльтор [5, 7].

Почему и как изменяется в современный период возбудитель холеры эльтор? Ухудшение среды обитания, изменение климата, неправильное применение антибиотиков при лечении человека, проникновение этого патогена на новые территории – все это является природными и социальными факторами, которые способствуют дальнейшей эволюции возбудителя для обеспечения его выживания в изменившихся условиях окружающей среды. В результате этих событий в природных популяциях сформировались атипичные по различным свойствам штаммы. Среди них наибольший интерес представляют следующие: штаммы с измененными диагностически значимыми признаками; варианты, устойчивые к лекарственным препаратам; атипичные нетоксигенные клоны, вызывающие клинические проявления холеры; штаммы, отличающиеся от типичных повышенной вирулентностью [10, 17, 18, 22, 39, 44, 45, 50].

Не вызывает никакого сомнения, что одним из актуальных направлений в исследованиях возбудителя холеры в настоящий момент является изучение механизмов формирования устойчивых к антибио-

тикам клонов, поскольку появление таких штаммов значительно осложняет проведение лечебных мероприятий [3, 19, 21, 50]. Но особую тревогу вызывает факт появления атипичных клонов *V. cholerae* эльтор с повышенной вирулентностью [25, 28, 38, 39, 48], что может привести к изменению «стандартного» механизма развития эпидемического процесса [4, 12].

Возникновение клонов с повышенной вирулентностью связано с изменением у типичного возбудителя холеры эльтор структуры профага СТХφ. Этот мобильный элемент несет гены *ctxAB*, кодирующие ХТ, который является одним из ключевых факторов вирулентности и отвечает за развитие диареи [10, 26, 34]. Между классическими и эльтор вибрионами существуют выраженные различия в структуре профагов СТХφ и их локализации на хромосомах. У токсигенных эльтор вибрионов присутствует от 1 до 8 копий профага СТХφ, расположенных в тандемном порядке на большой хромосоме. Типичные гены этого профага имеют две области – коровую и RS-2 (от repeat sequence) [17, 23, 34]. Коровая область, помимо генов *ctxAB*, отвечающих за биосинтез ХТ второго типа, несет гены *zot*, *ace*, *orfU*, *cep* и *psh*, кодирующие биосинтез дополнительных токсинов Zot и Ace, а также белков, необходимых для морфогенеза фаговых частиц [23, 24, 29, 51]. Область RS-2 содержит 3 гена, из которых *rstA* требуется для репликации фага СТХφ, *rstB* – для специфической интеграции фага в хромосому, а *rtsR* кодирует репрессор, запрещающий транскрипцию гена *rstA* и, следовательно, отвечающий за лизогенное состояние холерных вибрионов (рис. 1, а). В то же время в геноме большинства штаммов классических вибрионов присутствует лишь две копии профага СТХφ, локализованные на разных хромосомах. Более того, нуклеотидная последовательность гена *rtsR*, входящая в состав RS-2 области, имеет значительные отличия от таковой *V. cholerae* эльтор. Следовательно, ген *rtsR* является биоварспецифическим (рис. 1, б) [10, 17, 26]. И, наконец, классические вибрионы, в отличие от вибрионов эльтор, продуцируют ХТ первого типа. Различия между ХТ

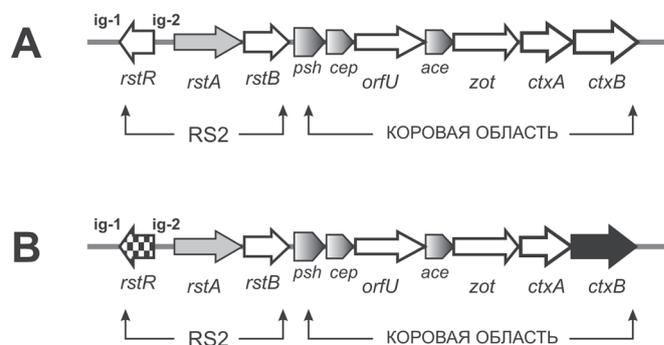


Рис. 1. Схематическое изображение структуры генома профагов СТХφ *Vibrio cholerae* эльтор (A) и *Vibrio cholerae* cholerae (B). Различные цвета генов *rstR* (RS2-область) и *ctxB* (коровая область), входящих в состав профагов СТХφ сравнимых биоваров *V. cholerae*, отображают их разную нуклеотидную последовательность

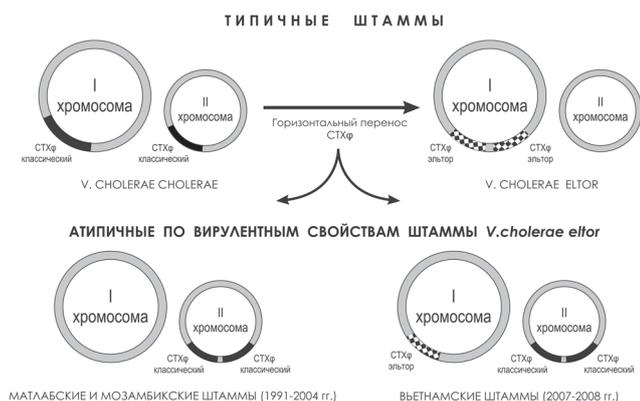


Рис. 2. Отличия в профагах СТХφ и их локализации на хромосомах между типичным возбудителем холеры эльтор и его вариантами, атипичными по вирулентным свойствам (Матлабский и Мозамбикский штаммы, а также Вьетнамский штамм)

классических и эльтор вибрионов обусловлены неодинаковой аминокислотной последовательностью их В-субъединиц, что, в свою очередь, связано с принадлежностью их генов *ctxB* к разным генотипам – 1-му и 3-му соответственно [30, 43].

К настоящему времени к штаммам *V. cholerae eltor* с повышенной вирулентностью прежде всего следует отнести Матлабский и Мозамбикский варианты (рис. 2). Матлабские штаммы впервые были выделены в 1991–1994 гг. от больных тяжелой формой холеры в Матлабе, расположенном на юге Бангладеш. Эти штаммы, имеющие разную комбинацию свойств классических и эльтор вибрионов, были распределены на 3 типа. Матлабские штаммы I типа содержали в геноме остров патогенности VPI-1 и профаг СТХφ, у которых последовательность ряда генов (*tcpA* и *rstR* соответственно) не отличалась от таковой классических вибрионов [39]. Последующие исследования показали, что для таких гибридных вариантов, которые стали доминировать на ряде территорий Юго-Восточной Азии, характерен ряд фенотипических и генетических особенностей. Во-первых, по основным диагностически значимым бактериологическим свойствам эти штаммы не отличались от типичных *V. cholerae eltor*. Они продуцируют термолабильный гемолизин, устойчивы к полимиксину, агглютинируют куриные эритроциты, чувствительны к диагностическому фагу Эльтор и резистентны к классическому фагу С. Во-вторых, продуцируют, как и *V. cholerae* классического биовара, ХТ первого типа, что установлено с помощью моноклонального анализа [40]. И, наконец, ключевой генетической особенностью этих штаммов является присутствие в их геноме классического профага СТХφ [38, 47, 48]. Считают, что Матлабские штаммы появились в результате горизонтального переноса генов вирулентности от классических вибрионов к вибрионам эльтор. Последствие такого события – повышение вирулентных свойств возбудителя 7-ой пандемии холеры, что выразилось в увеличении числа спорадических случаев холеры в Бангладеш (Дакка) с

15,9 % в 2001 г. до 30,8 % в 2005 г. [38, 40]. При этом было отмечено утяжеление клиники заболевания по сравнению с тем, что имело место при инфекции типичным возбудителем [38]. Более того, существенные биологические изменения, которые претерпел возбудитель холеры эльтор, определяют, видимо, повышение его эпидемического потенциала, которое выражается в вытеснении с 2001 г. Матлабскими штаммами типичных вирулентных штаммов на территории Бангладеш [40].

На пандемический потенциал холерных вибрионов эльтор с усиленной вирулентностью указывает их появление на другом континенте – в Юго-Восточной Африке. В 2004 г. в Мозамбике была зарегистрирована эпидемическая вспышка холеры эльтор, вызванная штаммами, имеющими значительное генетическое сходство с Матлабским вариантом (рис. 2). При этом среди более 20000 больных холерой значительное число переносило тяжелую форму заболевания [28, 35, 47, 48]. Геномный анализ Мозамбикского штамма, проведенный S.M.Faguque *et al.* [28], показал присутствие на его малой хромосоме двух копий классического профага, расположенных в тандемном порядке. Однако фаговый геном был дефектен по репликации и не продуцировал фаговые частицы. Вместе с тем было обнаружено, что в хромосомах Мозамбикского штамма присутствует более 99,0 % генов, имеющих в типичных вирулентных штаммах *V. cholerae eltor*. И прежде всего это «острова пандемичности» VSP-1 и VSP-2, отсутствующие у классических штаммов. Из этого следует, что Мозамбикский штамм возник в результате эволюционных преобразований генома возбудителя 7-ой пандемии холеры [28].

Какие же молекулярно-генетические механизмы могли обеспечить появление штамма с измененной вирулентностью? Точный механизм его образования пока до конца не выяснен. Тем не менее на основании сравнительного анализа геномов типичного возбудителя холеры эльтор и Мозамбикского штамма высказано предположение, что последний произошел от вирулентного штамма *V. cholerae eltor* в результате многоступенчатых событий. Вначале на большой хромосоме какого-то вирулентного штамма был делетирован участок ДНК, содержащий эльтор СТХφ профаг и прилегающую к нему нуклеотидную последовательность с *att*-сайтами (от англ. attachment site), которая требуется для внедрения этого фага в бактериальный геном. Затем этот нетоксигенный штамм в результате горизонтального переноса генов приобрел от *V. cholerae cholerae* классический профаг СТХφ, который мог встроиться только в оставшийся на малой хромосоме *att*-сайт. Ввиду того, что до сих пор не выявлено образования свободных фаговых частиц классическими вибрионами, маловероятно, что классический профаг СТХφ был приобретен в результате фаговой конверсии. В данный момент обсуждается приобретение свободного фагового генома или хромосомного участка *V. cholerae* классического биовара, несущего СТХφ, в процессе трансформации.

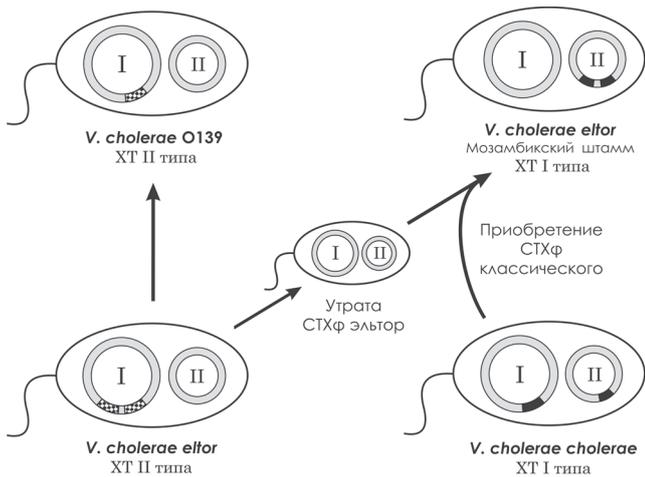


Рис. 3. Схема возможного происхождения Мозамбикского штамма, отличающегося от типичного возбудителя холеры повышенной вирулентностью (по Sh.M.Faruque *et al.*, 2007)

Высказано предположение, что вероятнее всего это событие могло произойти в окружающей среде при нахождении вибрионов на хитиновом субстрате в составе биопленки [18, 28, 46]. И, наконец, при попадании этого штамма в организм человека приобретенный классический профаг СТХф, включенный в малую хромосому, мог дублироваться, что привело к появлению его двух копий (рис. 3) [28]. Таким образом, реконструкция событий, которые привели к возникновению Мозамбикского штамма, указывает на существование ранее неизвестного пути эволюции патогенных штаммов *V. cholerae* с пандемическим потенциалом [28]. Появление у возбудителя холеры эльтор двух копий классического профага СТХф отразилось, видимо, на регуляции экспрессии генов ХТ. Последствие всех этих явлений – возникновение атипичного по вирулентным свойствам штамма *V. cholerae eltor*.

Другим не менее ярким примером изменения вирулентных свойств возбудителя холеры в современный период является штамм *V. cholerae eltor*, выделенный на территории Северного Вьетнама в 2008 г. [16, 25, 52]. Этот штамм в марте–апреле 2008 г. вызвал эпидемическую вспышку холеры в Ханое и 20 провинциях. Несмотря на отсутствие смертельных исходов, для этой вспышки были характерны тяжелые клинические формы заболевания, что свидетельствует о повышенной вирулентности возбудителя по сравнению с типичными штаммами [52]. При анализе генома выделенных штаммов были получены весьма интересные данные. Оказалось, что все изученные штаммы несли три копии профага СТХф. Из них две копии, локализованные на малой хромосоме, относились к классическому профагу. Третья копия СТХф была расположена на большой хромосоме и относилась к эльтор профагу [25]. Приведенные данные не оставляют сомнений в том, что Вьетнамский вариант возбудителя холеры эльтор возник в результате горизонтального переноса генов вирулентности от классических вибрионов к холерным вибрионам

эльтор. Пока нет никаких сведений о том, сможет ли этот вариант возбудителя холеры эльтор вытеснить типичного возбудителя на эндемичной по холере территории. Вместе с тем совершенно очевидно, что в природных условиях происходит формирование гибридных штаммов, обладающих более вирулентными свойствами.

Возникновение в ходе эволюционных событий в пределах биовара эльтор новых патогенных вариантов ставит вопрос о коррекции существующих методов молекулярно-эпидемиологического мониторинга внешней среды. Используемые бактериологические методы и лицензированные ПЦР-тест системы не могут обеспечить дифференцирование типичных и описанных атипичных вариантов возбудителя холеры эльтор. Однако четкие различия между классическими и эльтор вибрионами в нуклеотидной последовательности гена-репрессора *rstR* указывают на реальную возможность использования этого гена в качестве генетической метки атипичных по вирулентным свойствам штаммов *V. cholerae eltor*. Несомненно, что, несмотря на весьма интенсивные исследования механизма возникновения *V. cholerae eltor* с измененной вирулентностью, для решения этой проблемы требуется дальнейшая работа.

Как уже отмечалось, описанные выше атипичные штаммы возникли в результате горизонтального переноса генов от *V. cholerae cholerae* к *V. cholerae eltor*. Возникает вполне закономерный вопрос о том, существуют ли другие механизмы формирования штаммов с измененной вирулентностью? В этой связи нами были проведены модельные эксперименты по получению штаммов холерных вибрионов эльтор с повышенной вирулентностью за счет изменения экспрессии резидентных генов *ctxAB* [13]. В качестве исходного был взят штамм *V. cholerae eltor* MAK757, имеющий на большой хромосоме две копии профага СТХф, расположенные в тандемном порядке, которые определяют продукцию 0,02 мкг/мл ХТ второго типа (по данным GM<sub>1</sub>ELISA). Для изменения активности генов *ctxAB* был использован транспозонный мутагенез. Выбор этого метода обусловлен полученными ранее сведениями об участии транспозонов в регуляции экспрессии генов вирулентности у различных патогенных бактерий. Для получения инсерционных мутантов транспозон Tn5-Mob (Km<sup>R</sup>) вначале был введен в клетки холерного вибриона в составе векторной плазмиды pSUP5011. Последующее исключение Tn-элемента из плазмидной ДНК и включение его в бактериальную хромосому производили путем излечения клеток от плазмиды с одновременным созданием условий для селекции клонов, сохранивших Tn5-Mob (Km<sup>R</sup>). У полученных Km<sup>R</sup>-клонов с помощью ПЦР и ДНК-ДНК-гибридизации изучали структуру профага и определяли продукцию ХТ. В результате оказалось, что внедрение Tn5-Mob в хромосому MAK757 почти в 2,0 % случаев сопровождалось утратой одной копии профага и делецией генов *zot*, *ace*, *cep*, *orfU* второй его копии [13]. Уровень

биосинтеза ХТ у таких клонов, потерявших около 70,0 % генов профага, возрос более чем в 2000 раз по сравнению с исходным штаммом, составляя 42,0–45,0 мкг/мл [2, 13]. При этом диагностически значимые бактериологические свойства этого штамма (резистентность к полимиксину, чувствительность к фагу эльтор) не изменились.

Далее, встал вопрос о том, влияет ли изменение структуры профага на вирулентность полученного штамма? В этой связи был проведен сравнительный анализ инфекционного процесса на модельных животных (кролики-сосунки), инфицированных исходным штаммом и его инсерционным мутантом со сверхэкспрессией *ctxAB*. При практически одинаковой эффективной колонизации кишечника клетками сравниваемых штаммов у всех модельных животных развивался специфический холерогенный синдром. Вместе с тем штамм с повышенной продукцией ХТ вызывал гибель всех инфицированных животных уже через 24 ч, тогда как в случае исходного штамма почти 70,0 % зараженных животных, несмотря на развитие у них типичной экспериментальной холерной инфекции, не погибали и через 48 ч. Полученные данные позволили заключить, что гипертоксиогенный штамм был более вирулентен. Его повышенная вирулентность выражалась в более быстрой гибели экспериментальных животных, у которых развивался весьма выраженный холерогенный синдром.

Пока нет сведений о селективных преимуществах этого штамма по сравнению с типичным возбудителем холеры эльтор. Тем не менее полученные данные указывают на существование еще одного возможного пути формирования штаммов с повышенной вирулентностью за счет изменения регуляции экспрессии собственных генов *ctxAB* в результате делеции ряда генов, входящих в состав профага СТХф. Такое событие вполне реально и в природных условиях, поскольку холерные вибрионы, находясь в составе бактериальной биопленки, могут приобретать различные транспозоны от других бактерий в результате конъюгационных или трансформационных процессов [18].

Другое важное направление в проблеме формирования атипичных по вирулентным свойствам вариантов возбудителя холеры эльтор – изучение путей образования нетоксигенных холерных вибрионов, сохранивших весь набор других ключевых генов патогенности. Такие штаммы способны вызывать тяжелые диарейные заболевания, а в ряде случаев быть этиологическим агентом локальных вспышек холеры [30, 50].

Одно из возможных предположений относительно возникновения таких вариантов *V. cholerae* заключалось в том, что *ctxA<sup>-</sup> tcpA<sup>+</sup>* штаммы могли появиться в результате утраты профага СТХф токсигенными штаммами при их попадании в водную среду. Основанием для такой гипотезы служили данные о присутствии в окружающей среде *tcpA<sup>+</sup>* штаммов *V. cholerae eltor* как с дефектным профагом СТХф

(*ctxAB<sup>+</sup>, zot<sup>-</sup>, ace<sup>+</sup>* или *ctxAB<sup>-</sup>, zot<sup>+</sup>, ace<sup>+</sup>* или *ctxAB<sup>-</sup>, zot<sup>-</sup>, ace<sup>+</sup>*), так и лишенных этого мобильного элемента [11, 44, 45]. В этой связи были проведены модельные эксперименты, направленные на изучение фено- и генотипических особенностей, появившихся у токсигенных штаммов после их пребывания в водной среде. Двадцать клинических штаммов *V. cholerae eltor*, выделенных во время эпидемии холеры в Астрахани (1970–1975 гг.) и содержащих в геноме весь набор основных генов вирулентности, включая и профаг СТХф, были помещены в речную воду. Через каждые 4 дня делали высевы из контаминированной воды на чашки с полноценным агаром и полученные изолированные колонии с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) тестировали на присутствие всех генов профага – *ctxA*, *ctxB*, *zot*, *ace*, *orfU*, *cep* (коровая область), а также *rstA*, *rstB*, *rstR* (RS2-область). В результате было обнаружено, что более 50,0 % штаммов действительно утратили профаг СТХф через 4–75 дней [9]. Одним из стрессовых факторов, индуцирующих такую перестройку генома возбудителя холеры эльтор, является, видимо, бедность водной среды питательными веществами. Следует особо отметить тот факт, что утрата профага сопровождалась изменением экспрессии других генов, связанных с вирулентностью. Нетоксигенные клоны были менее подвижны, но продуцировали больше гемолизина по сравнению с исходными. Эти данные указывают на то, что выявленные изменения структуры и функции генома вирулентных клонов холерных вибрионов при их попадании в водную среду, возможно, связаны с процессом их адаптации к данной экологической нише. При этом утрата профага, не являющегося жизненно важным для выживания клеток вне организма хозяина, может быть одним из условий длительного переживания *V. cholerae* в природных экосистемах. Действительно, при оценке конкурентной способности изогенных клонов СТХф<sup>+</sup> и СТХф<sup>-</sup> в условиях их совместного культивирования в речной воде уровень выживаемости нетоксигенных клонов был в 2–5 раз выше по сравнению с токсигенными [9]. Это может означать, что описанные изменения генома вирулентных штаммов в водной среде могут быть одним из механизмов сохранения бактериальной популяции в межэпидемический период.

Более того, *ctxA<sup>-</sup> tcpA<sup>+</sup>* штаммы являются потенциально эпидемически опасными, так как присутствие на бактериальной поверхности токсин-регулируемых пилей, являющихся рецептором для фага СТХф, может обусловить их превращение в токсигенные в результате фаговой конверсии. Кроме того, такие штаммы сохраняют способность к колонизации тонкого кишечника и, следовательно, могут обусловить появление вибрионосителей [10, 26, 33]. И, наконец, *ctxA<sup>-</sup> tcpA<sup>+</sup>* штаммы могут быть ценным материалом для последующих эволюционных преобразований возбудителя холеры, на основе которых могут возникнуть вирулентные штаммы с новыми свойствами.

В заключение следует подчеркнуть, что в современный период в основе изменения вирулентных свойств возбудителя холеры лежит вариабельность генома профага СТХф, кодирующего биосинтез холерного энтеротоксина. Исходя из результатов литературных данных, можно заключить, что в последние годы происходит формирование новых вариантов возбудителя холеры эльтор, отличительной особенностью которых является заметное повышение их вирулентности. Изменение вирулентных свойств этих штаммов, выражающееся в тяжелых клинических формах заболевания и в повышении числа заболевших, по всей видимости, было следствием многоступенчатой реорганизации их генома. Конечный этап этого процесса состоял в приобретении возбудителем холеры эльтор профага СТХф от возбудителя азиатской холеры в результате горизонтального переноса генов. Безусловно, говорить о свершившейся эволюции *V. cholerae*, в результате которой сформировался новый для человека возбудитель холеры, нет никаких оснований. Вместе с тем приобретение возбудителем холеры эльтор повышенной вирулентности действительно свидетельствует о происходящих эволюционных преобразованиях его генома. Основной причиной этого явления, видимо, является регулирующее воздействие социальных и природных факторов на эпидемический процесс прежде всего на эндемичных по холере территориях.

Сохранение новым вариантом возбудителя пандемического потенциала требует повышенного внимания к его циркуляции на разных территориях. Вместе с тем, несмотря на существенные фенотипические (продукция ХТ первого типа) и генетические (присутствие на малой хромосоме 2 копий классического профага СТХф) отличия между новыми и типичными штаммами, существующие на данный момент лабораторные методы исследования не позволяют идентифицировать штаммы с повышенной вирулентностью. Следовательно, для преодоления возникших трудностей при проведении адекватного мониторинга возбудителя холеры, необходимо внедрение в практику новых методов идентификации. В частности, один из таких подходов может заключаться в тестировании у природных штаммов гена *rstR* с помощью ПЦР.

Следует также отметить возросший интерес к другой проблеме, связанной с изучением адаптивных изменений генома возбудителя холеры при его попадании в водную среду. Анализ собственных данных позволяет говорить о том, что этот процесс может быть обусловлен утратой токсигенными вибрионами профага СТХф. По всей видимости, такое событие обеспечивает длительное сохранение *ctxA<sup>+</sup> tcpA<sup>+</sup>* вибрионов в окружающей среде. Не исключено, что нетоксигенные вибрионы, возникшие из ранее токсигенных клонов и сохранившие весь набор других генов патогенности, и являются причиной локальных вспышек холеры, зарегистрированных как на территории Российской Федерации, так и ряда зару-

бежных стран. Однако этот важный вопрос требует дальнейшего исследования.

Работа поддержана грантом РФФИ (06-04-48310).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бароян О.В. Холера Эль-Тор. М.: Медицина; 1971. 254 с.
2. Горяев А.А., Щелканова Н.Ю., Лозовский Ю.В., Тучков И.В., Смирнова Н.И. Конструирование штамма *Vibrio cholerae* биовара эльтор гиперпродуцента холерного токсина II типа и определение оптимальных условий для продукции этого белка. Пробл. особо опасных инф. 2008; 95:56–9.
3. Ильина Т.С. Механизмы горизонтального переноса генов: роль бактериофагов и интегронов в эволюции патогенных бактерий. Молекул. генетика, микробиол. вирусол. 2003; 4:3–11.
4. Кутырев В.В., Смирнова Н.И., Черкасский Б.Л. Влияние биологических свойств возбудителя холеры на характер эпидемического процесса. Эпидемиол. и инф. бол. 2006; 4:43–7.
5. Ломов Ю.М. Холера и проблемы биотерроризма. Эпидемиол. и инф. бол. 2008; 2:4–6.
6. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Подосинникова Л.С., Водяницкая С.Ю., Прометной В.И. и др. Холера, обусловленная *Vibrio cholerae* O1 ctxAB<sup>+</sup> tcpA<sup>+</sup>. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 1:23–9.
7. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Федоров Ю.М., Подосинникова Л.С., Горбеев А.В. Холера в начале века. Прогноз. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005; 3:44–8.
8. Смирнова Н.И. Возбудитель холеры новой O139-серогруппы: молекулярно-генетические особенности и происхождение. Молекул. генетика, микробиол. вирусол. 2002; 3:23–33.
9. Смирнова Н.И., Кулышань Т.А., Челдышова Н.Б., Осин А.В. Структурные и функциональные изменения генома возбудителя холеры в водной среде. Эпидемиол. и инф. бол. 2007; 5:22–7.
10. Смирнова Н.И., Кутырев В.В. Эволюция генома возбудителя холеры. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2004; 4:3–13.
11. Смирнова Н.И., Осин А.В., Нефедов К.С., Кулышань Т.А., Заднова С.П., Ливанова Л.Ф. и др. Вариабельность генома профага СТХф и ее роль в изменении вирулентных свойств *Vibrio cholerae* биовара эльтор. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 6:20–6.
12. Черкасский Б.Л. Системный подход в эпидемиологии. М.: Медицина; 1988. 288 с.
13. Щелканова Е.Ю., Горяев А.А., Смирнова Н.И. Изменение генома профага СТХф *Vibrio cholerae* биовара эльтор, вызываемое транспозоном Tn5-Mob. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2008; 23:23–33.
14. Alam M., Hasan N.A., Sadique A., Bhuiyan N.A., Ahmed K.U., Nusrin S. et al. Seasonal cholerae caused by *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 in the coastal aquatic environment of Bangladesh. Appl. Env. Microbiol. 2006; 72:4096–4104.
15. Ali M., Emch M., Donnay J.P., Yunus J.P., Sack R.B. The spatial epidemiology of cholera in an endemic area of Bangladesh. Social science & medicine. 2002; 55:1015–24.
16. Bani S., Mastromarino P.N., Ceccarelli D., Van A.L., Salvia A.M., Viet Q.T.N. et al. Molecular characterization of ICE Vch Vie0 and its disappearance in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in 2003 in Vietnam. FEMS Microbiol. Lett. 2007; 266:42–8.
17. Bhattacharya T., Chatterjee S., Maiti D., Bhadra R.K., Takeda Y., Nair B. et al. Molecular analysis of the *rstR* and *orfU* genes of the CTX prophages integrated in the small chromosomes of environmental *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strains. Env. Microbiol. 2006; 8:526–34.
18. Blokesch M., Schoolnik G.K. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae* in aquatic reservoirs. PLoS Pathog. 3(6):e81.1371/journal.ppat.0030081.
19. Burrus V., Marrero J., Waldor M. The current ICE age: biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements. Plasmid. 2006; 55:173–83.
20. Byun R., Elbourne L. D., Lan R., Reeves P. R. Evolutionary relationships of pathogenic clones of *Vibrio cholerae* by sequence analysis of four housekeeping genes. Infect. Immun. 1999; 67:1116–24.
21. Ceccarelli D., Salvia A.M., Sami J., Cappuccinelli P., Colombo M.M. New cluster of plasmid-located class I integrons in *Vibrio cholerae* O1 and a *dfrA15* cassette-containing integrons in *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Angola. Antimicrobial agents chemotherapy. 2006; 50:2493–9.
22. Dalgaard A., Forsslund A., Tam N.V., Vinh D.X., Cam P.D. Cholera in Vietnam: changes in genotypes and emergence of gene I integrons containing aminoglycoside resistance gene cassettes in *Vibrio cholerae* O1 strain isolated from 1979 to 1996. J. Clin. Microbiol. 1999; 37:734–41.

23. Davis B.M., Kimsey H.H., Kane A.V., Waldor M.K. A satellite phage-encoded antirepressor induces repressor aggregation and cholera toxin gene transfer. *The EMBO Journal*. 2002; 21:4240–9.
24. Dziejman M., Balon E., Boyd D., Fraser C.M., Heidelberg J.F., Mekalanos J.J. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99:1556–61.
25. Ehara M. Cholerae, variant strains – Viet Nam: (North). Cholerae, diarrhea & dysentery update 2008 (09).
26. Faruque Sh.M., Albert M.J., Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* 1998; 62:1301–14.
27. Faruque Sh.M., Kamruzzaman M., Asadulghani, Sack D.A., Mekalanos J.J., Nair G.B. CTXphi-independent production of the RS1 satellite phage by *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; 100:1280–5.
28. Faruque Sh.M., Tam V.C., Chowdhury N., Diraphat P., Dziejman M., Heidelberg J.F. et al. Genomic analysis of the Mozambique strain of *Vibrio cholerae* O1 reveals the origin of El Tor strains carrying classical CTX prophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; 104:5151–6.
29. Fasano A., Baudry B., Pumplun D.W., Wasserman S. S., Tall B. D., Ketley J. M. et al. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991; 88:5242–6.
30. Finkelstein R.A., Burks M.F., Zupan A., Dallas W.S., Jacob C.O., Ludwig D.S. Epitopes of the cholera family of enterotoxins. *Rev. Infec. Dis.* 1987; 9:544–61.
31. Heidelberg J.F., Eisen J.A., Nelson W.C., Clayton R.A., Gwinn M.L., Dodson R.J. et al. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature*. 2000; 406:477–83.
32. Karaolis D.K.R., Lan R., Reeves P.R. Molecular evolution of the seventh-pandemic clone of *Vibrio cholerae* and its relationship to other pandemic and epidemic *V. cholerae* isolates. *J. Bacteriol.* 1994; 176:3191–8.
33. Karaolis D.K.R., Somara S., Maneval D.R., Johnson J.A., Kaper J.B. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and receptor in cholera bacteria. *Nature*. 1999; 399:375–9.
34. Kimsey H.H., Waldor M.K. CTXphi immunity: application in the development of cholera vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998; 95:7035–9.
35. Lee H.J., Han K.H., Choi S.Y., Lucas M.E.S., Mondlane C., Ansaruzzaman M. Multilocus sequencing typing (MLST) analysis of *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates from Mozambique that harbour the classical CTX prophage. *J. Med. Microbiol.* 2006; 55:165–70.
36. Mool F.R., Bik E.M. The evolution of epidemic *Vibrio cholerae* strains. *Trends Microbiol.* 1997; 5:161–5.
37. Murphy R.A., Boyd E.F. Three pathogenicity islands of *Vibrio cholerae* can excise from the chromosome and form circular intermediates. *J. Bacteriol.* 2008; 190:636–47.
38. Nair G.B., Bhuiyan N.A., Nusrin S. et al. Molecular basis of the emergence of a new more severe form of cholera. In: Gevers D., Mazel D., Thompson F., editors. *Vibrio 2007 Abstract book*; 2007 28 Nov–1; Dec; Paris, France. Paris: Institut Pasteur, Centre d'Information Scientifique; 2007. 25 p.
39. Nair G.B., Faruque Sh.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40:3296–99.
40. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., Svennerholm A.M., Safa A., Bhuiyan N.A. et al. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:4211–3.
41. Nair G.B., Safa A., Bhuiyan N.A., Nusrin S., Murphy D., Nicol C. et al. Isolation of *Vibrio cholerae* strains similar to pre-seventh pandemic El Tor strains during an outbreak of gastrointestinal disease in an island resort in Fiji. *J. Med. Microbiol.* 2006; 55:1559–62.
42. O'Shea Y.A., Reen F.J., Quirke A.M., Boyd E.F. Evolutionary genetic analysis of the epidemic *V. cholerae* isolates on the basis of comparative nucleotide sequence analysis and multilocus virulence gene profiles. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42:4657–71.
43. Olsvik Ø., Wahlberg J., Petterson B., Uhlen M., Popovic T., Waschmuth I.K. et al. Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholerae* O1 strains. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31:22–5.
44. Pang B., Yan M., Cui Z., Ye X., Diao B., Ren Y. et al. Genetic diversity of toxigenic and nontoxigenic *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 revealed by array-based comparative genomic hybridization. *J. Bacteriol.* 2007; 189:4837–49.
45. Pichel M., Rivas M., Chinen I., Martin F., Ibarra C., Binsztejn N. Genetic diversity of *Vibrio cholerae* O1 in Argentina and emergence of a new variant. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:124–34.
46. Rawlings T.K., Ruiz G.M., Colwell R.R. Association of *V. cholerae* El Tor and O139 Bengal with the copepods *Acartia tonsa* and *Eurytemora affinis*. *Appl. Env. Microbiol.* 2007; 73:7926–33.
47. Safa A., Bhuiyan N.A., Alam M.A., Sack D.A., Nair G.B. Genomic relatedness of the new Matlab variants of *Vibrio cholerae* O1 to the classical and El Tor biotypes as determined by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43:1401–4.
48. Safa A., Bhuiyan N.A., Nusrin S., Ansaruzzaman M., Alam M., Hamabata T. et al. Genetic characteristics of Matlab variants of *Vibrio cholerae* O1 that are hybrids between classical and El Tor biotypes. *J. Med. Microbiol.* 2006; 55:1563–9.
49. Salim A., Lan R., Reeves P.R. *Vibrio cholerae* pathogenic clones. 2005; 11:1758–60.
50. Shi L., Fujihara K., Sato T., Ito T., Garg P., Chakrabarty R. et al. Distribution and characterization of integrons in various serogroups of *Vibrio cholerae* strains isolated from diarrhoeal patients between 1992 and 2000 in Kolkata, India. *J. Med. Microbiol.* 2006; 55:575–83.
51. Trucksis M., Galen J.E., Mishalski J., Fasano A., Kaper J.B. Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993; 90:5267–71.
52. Weekly epidemiological record. Releve epidemiological hebdomadaire. 2008; 18:157–68.

N.I.Smirnova, N.B.Cheldyshova, A.A.Goryaev, Yu.V.Lofovsky, V.V.Kutyrev

### ***Vibrio cholerae* Genome Evolution: Ways of Atypical Strains Formation**

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe"

Presented is the review of literary and authors' data on the ways of emergence of *Vibrio cholerae* eltor strains, atypical as regards their virulence properties. The enhancement of virulence of cholera eltor agent at present was shown to be associated with acquisition of *Vibrio cholerae cholerae* CTX $\phi$  prophage as a result of horizontal gene transfer. Another possible way of formation of strains with higher virulence is described – alteration of cholera toxin resident genes regulation due to rearrangement of CTX $\phi$  prophage genome by the introduced transposon. Also considered are evidences on origination of ctxA<sup>-</sup> tcpA<sup>+</sup> strains and their enhanced viability in aquatic environment as compared with isogenic toxigenic clones. Presented are the prospects of the development of new PCR test for detection of cholera eltor agent with altered virulence in monitoring investigations.

**Key words:** *Vibrio cholerae*, evolution, genome, CTX $\phi$  prophage, virulence, cholera toxin, pandemics.

Проступила 10.07.08.

Н.А.Сырова, Н.Е.Терешкина, З.Л.Девдариани

## СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИММУНОДИАГНОСТИКИ ТУЛЯРЕМИИ

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

Настоящий обзор посвящен анализу основных достижений российских и зарубежных ученых в области разработки иммунодиагностических методов обнаружения *Francisella tularensis* и специфических сывороточных антител. Обсуждаются наиболее важные вопросы, связанные с перспективами конструирования современных эффективных тест-систем для иммунодиагностики туляремии.

**Ключевые слова:** *Francisella tularensis*, иммунодиагностика, специфические антитела, иммунодиагностические препараты.

Крупные вспышки и спорадические случаи туляремии, относящейся к особо опасным возвращающимся инфекционным болезням, периодически регистрируются во многих странах мира, в том числе в России [3, 13, 30]. Сохранение эпизоотически активных природных очагов, вероятность применения *Francisella tularensis* при биотеррористических актах [24, 29], сложность постановки клинического диагноза обуславливают необходимость совершенствования лабораторной диагностики этой инфекции. Несмотря на многообразие разрабатываемых методов на практике предпочтение, как правило, отдается иммунодиагностическим, характеризующимся экспрессностью, высокой специфичностью и чувствительностью, а также ввиду возможности их использования для исследования материала, непригодного для бактериологического анализа [8, 13, 19].

Иммунодиагностика туляремии складывается из индикации и идентификации возбудителя или его специфических антигенов и определения сывороточных антител у человека и восприимчивых животных.

Среди иммуносерологических методов, применяемых с целью обнаружения *F. tularensis*, следует в первую очередь упомянуть такие классические тесты как реакция агглютинации (РА) и реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), для постановки которых в настоящее время в РФ выпускается ряд сертифицированных препаратов.

Идентификация туляремийного микроба в пробирочной РА и обнаружение его антигенов в реакции кольцепреципитации проводится с применением «Сыворотки диагностической туляремийной сухой для РА» (ФГУЗ Иркутский НИПЧИ Сибири и Дальнего Востока, Иркутск). Несмотря на невысокую чувствительность РА, возможность перекрестного реагирования с бруцеллами в низких разведениях сыворотки, спонтанной агглютинации, а также необходимость выделения чистой культуры туляремийного микроба, требующего значительных временных затрат, данный метод не утратил своего значения в лабораторной практике и продолжает совершенствоваться. Для постановки реакции суспензионной агглютинации (РСА) на стекле сконструирован антительный диагностикум на основе специальной матрицы с иммобилизован-

ными на ней туляремийными иммуноглобулинами. Чувствительность РСА с использованием полученного препарата составила  $3,125 \cdot 10^6 - 6,25 \cdot 10^6$  м.к./мл, продолжительность – 1–5 мин [7].

Феномен агглютинации микроорганизма специфическими антителами, иммобилизованными на полимерных микрочастицах, лежит в основе реакции агломерации объемной (РАО), для постановки которой используют сертифицированный препарат «Диагностикум туляремийный иммуноглобулиновый полимерный сухой для РАО», выпускаемый Ростовским-на-Дону НИПЧИ [19]. Данный тест рекомендуется для идентификации и индикации *F. tularensis* и его антигенов в чистых культурах, полевом материале, объектах внешней среды; его чувствительность составляет  $10^6$  м.к./мл. Преимущество РАО перед РА заключается в большей чувствительности и наглядности первой, однако технически она немного сложнее, так как ставится микрометодом в планшетах для иммунологических реакций, а не на стекле.

К методам ускоренной детекции туляремийного микроба относятся РНГА и реакция нейтрализации антител (РНАт). Для выявления туляремийного антигена при исследовании органов животных, погадок птиц и помета хищных млекопитающих, субстрата гнезд, почвы и т.п. одной из наиболее эффективных и специфичных серологических реакций считают РНАт с туляремийным антигенным эритроцитарным диагностикумом [14, 19]. Последний выпускался в России в середине 90-х годов прошлого столетия, но в настоящее время снят с производства.

Альтернативным иммуносупензионным методом обнаружения возбудителя туляремии и его антигенов является РНГА с применением «Диагностикума эритроцитарного туляремийного иммуноглобулинового сухого» («48 ЦНИИ Минобороны России», Киров, ФГУЗ Ставропольский НИПЧИ, Ставрополь). В данной реакции можно выявлять *F. tularensis* в концентрации  $3,12 \cdot 10^6$  м.к./мл макрометодом и  $6,25 \cdot 10^6$  м.к./мл микрометодом. По данным М.Ф.Шмутера и др. [18], реакция пассивной (непрямой) гемагглютинации (РПГА) с туляремийным антительным эритроцитарным диагностикумом не только пригодна для обнаружения специфического антигена в микробных

взвесах и суспензиях органов и тканей погибших от туляремии животных, но и позволяет косвенно судить о степени вирулентности исследуемых культур. Так, при тестировании убитых вирулентного Shu и авирулентного 21/400 штаммов *F. tularensis* положительный результат в РПГА с первой культурой отмечался в дозе  $10^5$  м.к., тогда как со второй он был отрицательным даже в дозе  $2 \cdot 10^6$  м.к. в 0,2 мл. Однако, несмотря на достоверность реакции гемагглютинации [18, 19], эритроцитарные диагностикумы имеют ограниченное применение из-за нестабильности входящих в их состав реагентов и меньшей чувствительности в сравнении с другими, более современными иммунодиагностическими тестами [9, 20].

Эффективным методом экспресс-индикации возбудителя туляремии является иммунофлуоресцентный, успешному применению которого посвящено большое количество публикаций. Он эффективен для детекции туляремийного микроба в материале от больных [1], в желточных мешках куриных эмбрионов [11], в органах экспериментально зараженных животных на разных этапах развития инфекции [5, 14]. В настоящее время предприятием «Медгамал» (Москва) выпускается сертифицированный препарат «Имуноглобулины диагностические флуоресцирующие туляремийные сухие, лиофилизат для диагностических целей», официально рекомендованный для постановки реакции прямой иммунофлуоресценции при проведении эпизоотологического исследования на туляремию и при исследовании патологического материала от больных. Метод позволяет выявлять как живые, так и мертвые клетки *F. tularensis* в концентрации  $10^9$  м.к./мл [19]. Существенному повышению чувствительности иммунофлуоресцентного метода (до  $10^3$  м.к./мл) способствует применение магнитных сорбентов, представляющих собой модифицированную декстраном пирогенную форму диоксида кремния с включенным магнитным материалом, с иммобилизованными на их поверхности иммуноглобулинами, выделенными из гипериммунной туляремийной сыворотки [6]. Зарубежными исследователями предложен основанный на флуоресценции мультианалитический иммуносенсор для одновременного анализа нескольких образцов [31].

Одним из вариантов флуоресцентного метода является липосомальный иммуноанализ. Описан простой и чувствительный метод выявления туляремийного О-антигена и антител к нему с помощью гомогенной тест-системы на основе липосом, сенсibilизированных липополисахаридом (ЛПС) *F. tularensis* [15]. Авторами показана возможность применения МКА, направленных к эпитомам О-цепи ЛПС *F. tularensis* [17], для достижения комплементзависимого лизиса липосом. При этом чувствительность метода при определении ЛПС составила 50–100 нг/мл, а при введении в систему, содержащую МКА, антител-активаторов – 5–10 нг/мл [15].

Люминесцентно-серологический метод обнаружения возбудителей бактериальных инфекций, в

том числе туляремии, заслуженно пользуется широкой популярностью, так как обеспечивает быструю и точную детекцию специфического иммунного комплекса в исследуемом материале. Однако следует учитывать вероятность неспецифической, связанной с отложением флуоресцирующих конъюгатов на различных тканевых структурах, включением метки в другие сывороточные белки, или нежелательной специфической, обусловленной наличием в конъюгате перекрестно реагирующих антител, флуоресценции [8], и невозможность применения метода без соответствующего приборного обеспечения.

К наиболее информативным современным иммунодиагностическим тестам для обнаружения *F. tularensis*, относятся различные варианты иммуноферментного анализа (ИФА или ELISA, от англ. enzyme-linked immunosorbent assay), которые, будучи высокочувствительными, отличаются воспроизводимостью, простотой постановки и учета результатов [8]. Так, ELISA, разработанный российскими учеными в 1988 г. для обнаружения туляремийного антигена в бактериальных взвесах и органах зараженных животных, обладал чувствительностью  $1 \cdot 10^4 - 5 \cdot 10^4$  м.к./мл, что было на 1–2 порядка выше, чем у других используемых в то время методов, таких как реакция иммунофлуоресценции, РПГА и РНАт [12]. Для детекции антигена возбудителя туляремии в ELISA был предложен конъюгат иммуноглобулинов с пенициллиназой, техника приготовления которого проще чем пероксидазного конъюгата. Тест достаточно чувствителен, особенно по отношению к препарату ЛПС *F. tularensis*, и позволяет выявлять  $10^5$  м.к. туляремийного микроба и 0,7–1,0 нг/мл ЛПС [10]. Благодаря использованию магнитного сорбента с иммобилизованными иммуноглобулинами из гипериммунной туляремийной сыворотки отечественными авторами был разработан иммуноферментный метод выявления корпускулярных антигенов туляремийного микроба, позволяющий обнаружить  $10^2$  м.к./мл в течение 2 ч [6]. Классический сэндвич-ELISA лежит в основе белкового чипа, разработанного для одновременной детекции множества опасных биоагентов, включая *F. tularensis* [27].

В конце 80-х годов XX века предприятием НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи выпускалась тест-система иммуноферментная для определения туляремийного антигена, предназначенная для детекции возбудителя туляремии и выявления его ЛПС в количестве не менее 10 нг/мл в сэндвич-ELISA. Позднее выпуск ее был прекращен, и на сегодняшний день в России отсутствуют сертифицированные иммуноферментные тест-системы для обнаружения туляремийного микроба.

Весьма перспективным при конструировании иммуноферментных тест-систем представляется применение моноклональных антител (МКА). Так, получены диагностически значимые МКА к конформационным эпитомам белков внешней мембраны *F. tularensis*, которые оказались строго специфичными в ELISA по отношению к соответствующему

микроорганизму [23]. Другой высокоспецифичный ELISA, основанный на МКА к ЛПС *F. tularensis*, обладает пределом чувствительности  $10^3$ – $10^4$  м.к./мл и, по мнению авторов, может быть с успехом использован для диагностики туляремии [26].

Оригинальную разработку предложили А.Н.Резуски *et al.* [28]. Существующие ELISA-тесты для обнаружения туляремийного микроба и ряда бактериальных токсинов были конвертированы в соответствующие тесты флуориметрии с временным разрешением DELFIA. Чувствительность анализов за счет использования меченных европием антител-детекторов повышается до 4–20 пг/мл антигена, а продолжительность составляет чуть более 2 ч.

Выявление *F. tularensis* возможно также при использовании иммунохроматографических методов, хотя их чувствительность зачастую ниже, чем у ELISA [22, 26]. Туляремийный антиген в низких концентрациях может быть обнаружен при использовании хемилюминесцентного метода [34]. Для определения ЛПС возбудителя туляремии в тканях животных эффективно применяется иммуногистохимический анализ [25, 35].

Другое направление иммунодиагностики туляремии предполагает обнаружение специфических сывороточных антител и служит для установления диагноза у больного или переболевшего (ретроспективная диагностика) и оценки иммунологического статуса привитых [13, 19, 30]. Для этого наиболее часто применяется РА, которую обычно ставят объемным способом по общепринятой методике с использованием диагностикума туляремийного жидкого для объемной и кровяно-капельной реакции агглютинации производства НПО «Микроген» (г. Омск). РА бывает положительной в титре 1:100 и выше со 2–3-й недели от начала болезни и достигает на 4–6-й неделе титра 1:400 – 1:800, иногда выше, после чего титр начинает снижаться.

В отечественной практике также применялась РНГА с коммерческим туляремийным антигенным эритроцитарным диагностикумом (Одесса), выпуск которого прекращен в 1996 г. В РНГА гемагглютинины обнаруживаются уже в конце 1-й недели от начала заболевания, и через месяц гемагглютинационный титр может достигать 1:10000 – 1:40000 и выше, после чего постепенно снижается, сохраняясь на уровне 1:100 – 1:200 длительное время [3]. Продемонстрирована возможность применения туляремийного антительного эритроцитарного диагностикума для выявления специфических антител в сыворотках больных, переболевших и вакцинированных людей и животных в РНАг [18].

Описанные реакции, несмотря на достаточную специфичность, обладают всеми упомянутыми выше недостатками иммуносупензионных тестов, что обуславливает необходимость разработки альтернативных средств обнаружения антитуляремийных антител. Так, значительно большей информативностью обладают различные модификации ELISA и иммуно-

блоттинг, применяемые для определения специфических антител у животных и человека. К примеру, микроточечный иммуноферментный анализ на нитроцеллюлозной мембране с визуальной индикацией результатов был с успехом использован для определения IgG в поствакцинальный период у обезьян-гамадрилов [20]. В сравнительных экспериментах чувствительность данного метода не отличалась от чувствительности ИФА со спектрофотометрической детекцией результатов и превышала чувствительность РПГА в 10–20 раз, а реакции микроагглютинации – в 10–1000 раз. Дот-иммуноанализ на основе S-ЛПС *F. tularensis* оказался эффективным в определении гомологичных антител у больных и иммунизированных людей и животных [2].

Для выявления специфических антител в сыворотках крови людей, вакцинированных против туляремии, методом DELFIA в качестве конъюгата применяли меченный европием белок А. Данный вариант иммуноанализа оказался в 10–40 раз более чувствительным, чем ИФА с пероксидазными конъюгатами, даже при условии использования авидин-биотиновой системы [4].

Весьма перспективным для серодиагностики туляремии и оценки эффективности вакцинации представляется метод флуоресцентного липосомного иммуноанализа (ФЛИА) на основе липосом, сенсibiliзированных ЛПС или фрагментами внешних мембран клеточных стенок *F. tularensis*, с инкапсулированными маркерами флуоресцентной природы [16]. В эксперименте ФЛИА демонстрирует высокую чувствительность, в 4–160 раз превосходящую РПГА. Метод является экспрессным (продолжительность 15–60 мин) и воспроизводимым. В ходе анализа не требуется сепарации реагентов, что выгодно отличает его от гетерогенного ИФА.

Большое значение для мониторинга эпизоотий туляремии имеет определение сывороточных противотуляремийных антител у животных. Немецкими учеными показана информативность ELISA на основе ЛПС и коммерческих наборов для иммуноблоттинга, предназначенных для детекции туляремийных антител, при исследовании сывороток кабанов [21]. Оригинальный подход для детекции анти-ЛПС антител в формате microarray разработали ученые из США. Ими был использован ЛПС *F. tularensis*, иммобилизованный на покрытых нитроцеллюлозой стеклянных пластинках, что позволяло сохранить доступность эпитопов для связывания с антителами. Порог чувствительности данного метода составил 10 нг/мл антител, что в 100 раз выше чувствительности традиционных иммунофлуоресцентных анализов. При исследовании собачьих сывороток в положительных образцах регистрировался значительно более высокий уровень антител к ЛПС, чем в отрицательных [32]. Не менее эффективным при конструировании microarray-тест-систем оказалось использование для сенсibilизации покрытых нитроцеллюлозой стеклянных субстратов цельных бактериальных клеток [33].

Таким образом, к настоящему времени для диагностики туляремии отечественными и зарубежными учеными предложено множество эффективных иммунодиагностических тестов. Однако большая их часть – экспериментальные разработки. В нашей стране выпускаются лишь препараты старого поколения, тогда как новые тест-системы, отвечающие современным требованиям чувствительности и экспрессности, отсутствуют. Поэтому исследования, направленные на конструирование и совершенствование туляремийных иммунодиагностик, не утрачивают своей актуальности. Наиболее перспективными в этой связи представляются дот-иммуноанализ, изготовление иммунохроматографических дипстиков на основе высокоспецифичных поли- и моноклональных антител, а также создание иммуночипов. Усилия разработчиков должны быть направлены на повышение порога чувствительности тест-систем, полное исключение неспецифических реакций, упрощение процедуры постановки и учета реакции и доведение экспериментальных разработок до выпуска сертифицированного препарата.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ананова Е.В., Каменнова Л.С., Мецержякова И.С., Савельева Р.А. Обнаружение возбудителя туляремии у больных с помощью реакции иммунофлуоресценции. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1989; 4:46–9.
2. Аронова Н.В., Павлович Н.В. Использование препаратов липополисахарида *Francisella tularensis* в точечном твердофазном иммуноферментном анализе. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2000; 5:75–8.
3. Большая медицинская энциклопедия. Т. 25. Москва: Советская энциклопедия; 1985. С. 449–56.
4. Гузаева Т.В., Комаров А.М., Юров С.В., Пчелинцев С.Ю., Чудинов А.В., Афанасьев С.С., Завьялов В.П. Белок А *Staphylococcus aureus*, меченный европием, как реагент для определения специфических антител. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1994; 4:59–63.
5. Егорова Л.С., Дунаев Н.Б. Применение метода флюоресцирующих антител для обнаружения возбудителя туляремии в органах экспериментально зараженных животных. Журн. микробиол. 1973; 10:135–6.
6. Ефременко В.И. Магносорбенты в микробиологических исследованиях. Ставрополь: Ставрополье; 1996.
7. Жарникова И.В. Разработка суспензионного диагностикума для выявления возбудителя туляремии. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2004; 1:67–9.
8. Иммунологические методы. Москва: Медицина; 1987.
9. Каральник Б.В. Эритроцитарные диагностикумы. М.: Медицина; 1976.
10. Куанбаев Д.Н., Чимиров О.Б., Темиралиева Г.А., Лухнова Л.Ю., Турсунов А.Н. Иммуноглобулиновый пенициллиназный конъюгат для выявления антигена возбудителя туляремии. Лаб. дело. 1990; 1:44–6.
11. Куделина Р.И., Ананова Е.В. Применение иммунофлуоресцентного метода с целью обнаружения возбудителя туляремии в развивающихся куриных эмбрионах. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1975; 10:18–22.
12. Мецержякова И.С., Умнова Н.С., Шаханина К.Л., Павлова И.П. Использование иммуноферментного метода ELISA для выявления возбудителя туляремии. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1988; 2:109–12.
13. Никифоров В.В., Кареткина Г.Н. Туляремия: от открытия до наших дней. Инф. болезни. 2007; 5; 1:67–76.
14. Олсуфьев Н.Г., Ананова Е.В., Мецержякова И.С., Савельева Р.А. Обнаружение возбудителя туляремии в органах животных на ранних этапах развития инфекции. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1975; 10:13–7.
15. Скопинская С.Н., Тамулевич Я.А., Ярков С.П., Злобин В.Н., Калинин Ю.Т. Высокочувствительный, гомогенный метод определения антител и антигенов с помощью липосом, моноклональных антител и комплемента. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1993; 1:77–82.
16. Скопинская С.Н., Ярков С.П., Храмов Е.Н. Применение флуоресцентного липосомного иммуноанализа для выявления

антител к возбудителям туляремии, холеры, брюшного тифа, сапа и мелиоидоза. Пробл. особо опасных инф. 2007; 2(94):67–71.

17. Хлебников В.С., Головлев И.Р., Тохтамышева Н.В., Аверин С.Ф., Кулевацкий Д.П., Гречко Г.К. и др. Определение антигенной детерминанты превентивных моноклональных антител, специфичных к липополисахариду *Francisella tularensis*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1993; 1:83–8.

18. Шмунтер М.Ф., Айкымбаев М.А., Елюбаева А.М., Брикман Д.И., Чарная Е.Ф. Эффективность использования туляремийного антительного эритроцитарного диагностикума для выявления специфического антигена и антител к нему. Журн. микробиол. 1978; 2:61–4.

19. Эпидемиологический надзор за туляремией. Методические указания МУ 3.1.2007-05.

20. Юров С.В., Пчелинцев С.Ю., Афанасьев С.С., Воробьев А.А., Ураков Н.Н., Черенкова Г.В. и др. Использование микроточечного иммуноферментного анализа с визуальной индикацией для определения туляремийных антител. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1991; 3:61–4.

21. Al Dahouk S., Nockler K., Tomaso H.J., Spletstoesser W.D., Jungersen G., Riber U. et al. Seroprevalence of brucellosis, tularemia and yersiniosis in wild boars (*Sus scrofa*) from north-eastern Germany. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. 2005; 52(10):444–55.

22. Berdal B.P., Mehl R., Haaheim H., Loksa M., Grunow R., Meyer C., Meyer H. Field detection of *Francisella tularensis*. Scand. J. Infect. Dis. 2000; 32(3):287–91.

23. Bhatti A.R., Wong J.P., Woods D.E. Production and partial characterization of hybridoma clones secreting monoclonal antibodies against *Francisella tularensis*. Hybridoma. 1993; 12(2):197–202.

24. Broussard L.A. Biological agents: weapons of warfare and bioterrorism. Mol. Diagn. 2001; 6(4):323–33.

25. DeBey B.M., Andrews G.A., Chard-Bergstrom C., Cox L. Immunohistochemical demonstration of *Francisella tularensis* in lesions of cats with tularemia. J. Vet. Diagn. Invest. 2002; 14(2):162–4.

26. Grunow R., Spletstoesser W., McDonald S., Otterbein C., O'Brien T., Morgan C. et al. Detection of *Francisella tularensis* in biological specimens using a capture enzyme-linked immunosorbent assay, an immunochromatographic handheld assay, and a PSR. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2000; 7(1):86–90.

27. Huelseweh B., Ehrlich R., Marschall H.J. A simple and rapid protein array based method for the simultaneous detection of biowarfare agents. Proteomics. 2006; 6(10):2972–81.

28. Peruski A.H., Johnson L.H. 3<sup>rd</sup>, Peruski L.F. Jr. Rapid and sensitive detection of biological warfare agents using time-resolved fluorescence assays. J. Immunol. Methods. 2002; 263(1–2):35–41.

29. Robinson-Dunn B. The microbiology laboratories role in response to bioterrorism Arch. Pathol. Lab. Med. 2002; 126(3):291–94.

30. Spletstoesser W.D., Tomaso H., Al Dahouk S., Heubauer H., Schuff-Werner P. Diagnostic procedures in tularemia with special focus on molecular and immunological techniques. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. 2005; 52(6):249–61.

31. Taitt C.R., Anderson G.P., Lingerfelt B.M., Feldstein M.J., Ligler F.S. Nine-analyte detection using an array-based biosensor. Anal. Chem. 2002; 74(23):6114–20.

32. Thirumalapura N.R., Morton R.J., Ramachandran A., Malayer J.R. Lipopolysaccharide microarrays for the detection of antibodies. J. Immunol. Methods. 2005; 298(1–2):73–81.

33. Thirumalapura N.R., Ramachandran A., Morton R.J., Malayer J.R. Bacterial cell microarrays for the detection and characterization of antibodies against surface antigens. J. Immunol. Methods. 2006; 309(1–2):48–54.

34. Vidziumaite R., Mikulskis P., Kulyš J. Chemiluminescent immunoassay (CLIA) for the detection of brucellosis and tularemia antigens. J. Biolumin. Chemilumin. 1995; 10(4):199–203.

35. Zeidner N.S., Carter L.G., Monteneiri J.A., Petersen J.M., Schriefer M., Gage K.L. et al. An outbreak of *Francisella tularensis* in captive prairie dogs: an immunohistochemical analysis. J. Vet. Diagn. Invest. 2004; 16(2):150–2.

N.A.Syrova, N.E.Tereshkina, Z.L.Devdariani

## Current State of Tularemia Immunodiagnosics

Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

This review is devoted to the analysis of the main achievements of the Russian and foreign scientists in the sphere of development of immunodiagnostic methods for detection of *Francisella tularensis* and specific serum antibodies. The most important problems concerning perspectives of constructing of the modern effective test-systems for tularemia immunodiagnosics are discussed.

**Key words:** *Francisella tularensis*, immunodiagnosics, specific antibodies, immunodiagnostic preparations.

Поступила 30.04.08.

УДК 616.981.452 (471.631)

А.А.Кузнецов, Т.В.Князева, А.Н.Матросов

## ПАЗИТАРНЫЕ КОНТАКТНЫЕ СЕТИ В ПОСЕЛЕНИЯХ ГРЕБЕНЩИКОВЫХ И ПОЛУДЕННЫХ ПЕСЧАНОК И ИХ БЛОХ В ПЕСКАХ ВОЛГО-УРАЛЬСКОГО МЕЖДУРЕЧЬЯ

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

В результате перемещений песчанок рода *Meriones* и форезии блох в их поселениях формируются паразитарные контактные сети, способные обеспечить эффективное расселение эктопаразитов и распространение возбудителя чумы. Контактная сеть охватывает всю территорию, занятую поселениями грызунов, не имеющими пространственной разобщенности.

*Ключевые слова:* песчанки, блохи, форезия, паразитарные контакты, расселение.

Одним из экологических механизмов, обеспечивающих выживание любого биологического вида, является расселение [2]. Это в полной мере относится к блохам – паразитам грызунов, расселяющимся на основе форических связей со своими прокормителями [1]. По-видимому, в паразитарной системе «грызуны-блохи» выработалось оптимальное соотношение трофических (временный гнездово-норовый паразитизм) и подчиненных форических связей, обеспечивающее рациональный режим питания и широкий разнос эктопаразитов хозяевами. Это положение подтверждается наличием весьма обширных ареалов многих видов блох и их достаточно высокой численностью.

Целью настоящего исследования является оценка широты и разветвленности паразитарных контактных сетей в поселениях песчанок рода *Meriones*. Анализ принципиальных (фактологических) схем расселения блох среди прокормителей и их топографическая интерпретация позволили визуальнo представить процесс форезии эктопаразитов и оценить его роль в формировании популяционных ареалов. Дополнительно рассмотрено значение различных элементов структуры контактных сетей для повышения интенсивности разноса блох.

### Материалы и методы

Материалы получены в Волго-Уральском песчаном очаге чумы при изучении перемещений гребенщиковой (*Meriones tamariscinus* Pall.) и полуденной (*M. meridianus* Pall.) песчанок, форезии массовых видов блох (*Nosopsyllus laeviceps* Wagn. и *Xenopsylla conformis* Pall.) в их поселениях, а также вероятности смены прокормителей этими эктопаразитами. Анализ параметров перемещений грызунов и форезии блох показал непрерывное и достаточно быстрое объединение обитателей поселения в единую сеть, в которой непосредственный паразитарный контакт осуществляется между всеми соседями, чьи норы удалены

друг от друга на 1–3 дистанции ежесуточных перемещений. В данной работе проведен анализ реально выявленных контактных сетей, служащих примером высокой способности блох расселяться, перемещаясь в пространстве с помощью хозяев. Получение необходимых данных обеспечено применением метода индивидуального мечения блох [4, 5, 6].

Полевые исследования проведены в течение пяти различных фенологических периодов 1991–1994 гг. на двух стационарных участках наблюдений (площадью 6 и 9 га), расположенных в центральных частях Волго-Уральских песков. По данным за каждый сезон были изготовлены принципиальные схемы переходов блох с одного хозяина на другого и схематические планы пространственных перемещений грызунов и эктопаразитов, послужившие предметом анализа.

### Результаты и обсуждение

Схемы переходов блох *Ns. laeviceps* с одного прокормителя на другого в поселениях малых песчанок и серых хомячков, полученные весной и осенью 1991 г., приведены в наших работах [3, 5], характеризуют лишь часть зарегистрированных контактных сетей. По материалам 1993–1994 гг. паразитарные сети были выявлены полнее и включали данные обо всех меченых блохах, встречавшихся повторно и хотя бы один раз менявших хозяев. Схемы этих сетей позволили более объективно охарактеризовать элементы их формирования.

Принципиальная схема переходов блох *X. conformis* в совместном поселении полуденных (ПП) и гребенщикowych (ГП) песчанок весной 1993 г. приведена на рис. 1. На этой и других схемах представлены только те блохи, которые один и более раз встречались повторно после мечения и хотя бы один раз меняли прокормителя. Изображения блохи на рисунке (см. условные обозначения) связаны между собой черными стрелками. Если конкретный грызун

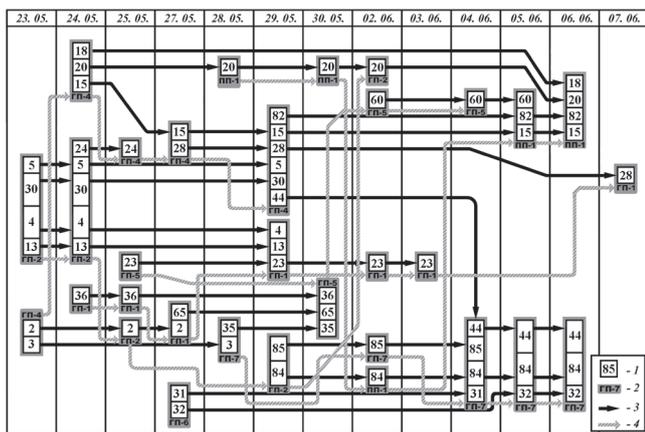


Рис. 1. Принципиальная схема контактной сети в поселении гребенчиковых и полуденных песчанок и блох *Xenopsylla conformis* на стационарном участке наблюдений в Волго-Уральских песках весной 1993 г.:

Верхняя строка – даты регистрации меченых животных.

1 – номера блох; 2 – аббревиатуры и номера прокормителей (см. в тексте); 3 – пути передачи блох; 4 – участие грызунов в передаче разных блох в разное время

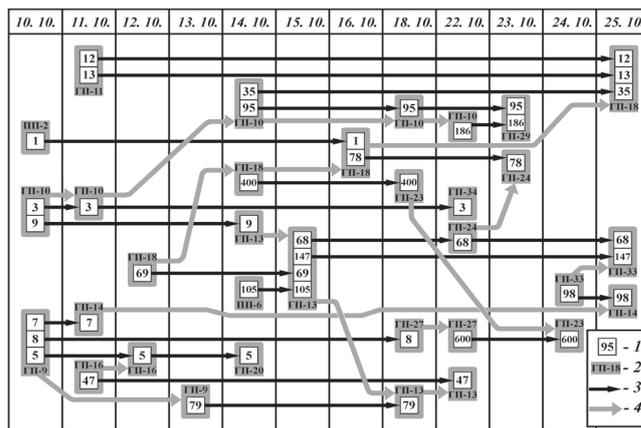


Рис. 2. Принципиальная схема контактной сети в поселении гребенчиковых и полуденных песчанок и блох *Nosopsyllus laeviceps* на стационарном участке наблюдений в Волго-Уральских песках осенью 1993 г.:

Верхняя строка – даты регистрации меченых животных.

1 – номера блох; 2 – аббревиатуры и номера прокормителей (см. в тексте); 3 – пути передачи блох; 4 – участие грызунов в передаче разных блох в разное время

неоднократно имел на себе меченых блох, подлежащих изображению на схеме, то его значки были соединены серой стрелкой. Все изображения грызунов с находящимися в их шерсти блохами, связанные хотя бы одной из двух типов стрелок, составляли единую контактную сеть. В данный сезон повторно от 1 до 4 раз встречались 22 эктопаразита, что в сумме составило 46 повторов, из которых 26 были со сменой хозяина. Выявленная контактная сеть возникла в результате перемещений 7 из 9 обитавших на площадке грызунов. Отдельных фрагментов с индивидуально контактирующими зверьками не зафиксировано.

Осенью 1993 г. контактная сеть формировалась так же, как и в 1991 г. при участии блох *Ns. laeviceps* (рис. 2). Со сменой хозяина зафиксировано 23 повтора-перехода, осуществленных 21 блохой. Сеть без образования отдельных фрагментов была сформирована перемещениями 16 зверьков из 40 ловившихся на площадке.

Весной 1994 г., как и прошлой осенью, сеть формировалась при участии блох *Ns. laeviceps*. Со сменой хозяина зафиксировано 50 повторов из 68, образовавших сеть, осуществленных 46 насекомыми. В этом сезоне отмечен один маленький изолированный фрагмент сети, когда одна блоха сменила двух хозяев. Всего же в формировании сети принимала участие 21 гребенчиковая песчанка из 30 зверьков, встречавшихся на площадке. В связи с большими размерами, густотой и разветвленностью, рисунок сети за этот сезон мы не приводим, однако подчеркиваем наличие в ней всех известных элементов, необходимых для ее формирования.

Следует заметить, что наличие изолированных паразитарных связей объясняется, прежде всего, тем, что за ограниченный экспедиционным сроком отрезок времени мы не успевали установить их вхождение в общую сеть. Кроме того, многие меченые блохи

могли переместиться за пределы площадки и обеспечить связь с обитающими там грызунами. Истинные размеры сети, безусловно, во много раз обширнее и она гуще, а объединение фрагментов является лишь делом времени и в значительной мере – делом случая. Степень «недооценки» сети можно представить, если учесть небольшую долю повторов относительно общего числа меченых эктопаразитов и не поддающуюся точной оценке долю меченых относительно всех обитающих на площадке блох.

Как было видно на представленных выше рисунках, при формировании паразитарной контактной сети реализуются все формы связи: и схождение, и расхождение эктопаразитов, сцепленные, а также стандартные (повторяющиеся) передачи. Дважды зафиксирован возврат блохи на одного из предыдущих хозяев после паразитирования на промежуточном зверьке. Бесспорно то, что реализация различных форм переходов является обязательным условием формирования сети.

Не менее впечатляюще выглядит пространственное изображение контактной сети. На рис. 3 изображена схема расположения на участке городков гребенчиковых и полуденных песчанок весной 1993 г., а также путей перемещений грызунов и транспортировки блох. В целях разгрузки изображены только наиболее характерные маршруты. Как видно из рисунка, не все направления переносов эктопаразитов совпадают с трассами передвижений песчанок. Это можно объяснить тем, что повторное обнаружение блохи зачастую происходило через больший срок, чем грызуна, и в этот период она могла неоднократно паразитировать на других животных и «путешествовать» с их помощью по участку. При этом истинный маршрут ее транспортировки остается неизвестным и может быть достаточно сложным. Это обстоятельство объясняет также то, что среднее расстояние переноса блох

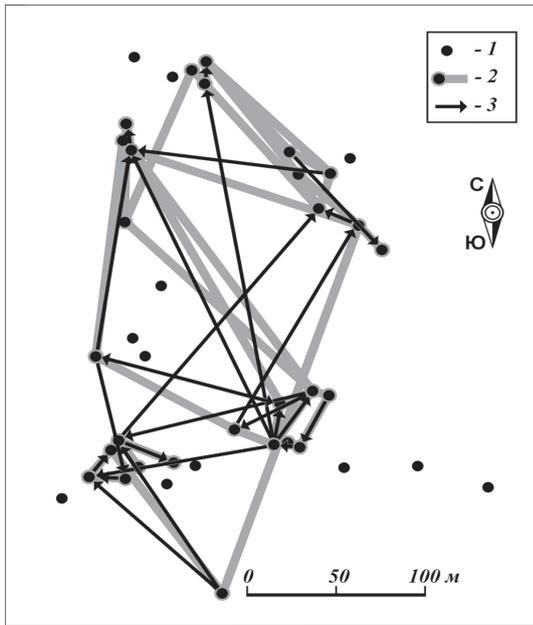


Рис. 3. План контактной сети в поселении гребенщиковых и полуденных песчанок и блох *Xenopsylla conformis* на стационарном участке наблюдений в Волго-Уральских песках весной 1993 г.:

1 – норы, возле которых отлавливались грызуны; 2 – условное изображение «трасс» перемещений песчанок, участвовавших в формировании сети; 3 – условное изображение направлений переноса меченых блох между точками их последовательных обнаружений

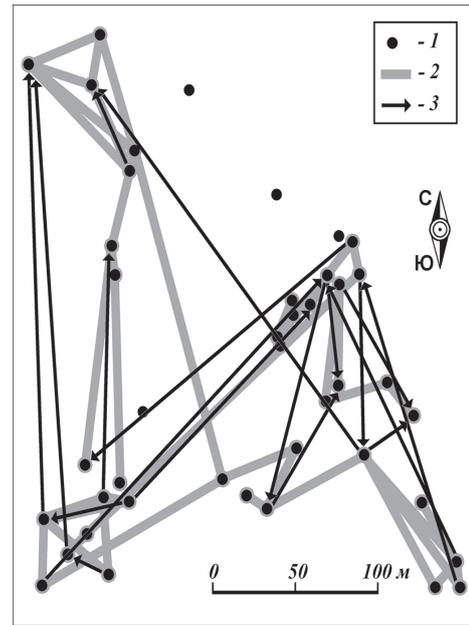


Рис. 4. План контактной сети в поселении гребенщиковых песчанок и блох *Nosopsyllus laeviceps* на стационарном участке наблюдений в Волго-Уральских песках осенью 1993 г.:

1 – норы, возле которых отлавливались грызуны; 2 – условное изображение «трасс» перемещений песчанок, участвовавших в формировании сети; 3 – условное изображение направлений переноса меченых блох между точками их последовательных обнаружений

приблизительно вдвое превышает среднее расстояние перемещений грызунов. По этой же причине и результирующий путь передачи блохи часто не совпадает ни с одним из маршрутов зверьков.

Принимая во внимание небольшую величину выборки, очевидно, что далеко не все трассы перемещений грызунов нами выявлены и не все факты пребывания блох на зверьках зарегистрированы, однако в природе каждый перенос паразита обязательно накладывается на передвижение хозяина. Поскольку истинный путь транспортировки блохи нам не известен, мы вынуждены использовать его стилизованное изображение.

Близкая по сути картина наблюдалась и осенью 1993 г. (рис. 4). Здесь заметны те же особенности пространственного расположения путей перемещений контактирующих между собой животных и результирующих путей переноса блох, не всегда совпадающих друг с другом.

То же самое можно сказать и о ситуации, сложившейся весной 1994 г. Правда, в этот сезон густота маршрутов передвижений песчанок и переносов блох оказалась гораздо более высокой. Существенный рост объема данных в этом случае связан с продолжительным сроком работ, составившим два месяца. Несмотря на это и здесь были отмечены пути переноса блох, формально не совпадающие с маршрутами передвижений грызунов.

Индивидуальные схемы форезии блох, попадавших несколько раз, так же, как и общая схема сети, говорят о хаотичности их перемещений и о той или

иной изломанности маршрутов переноса. Вероятно, экземпляры, транспортировавшиеся по круто изломанным путям, смогли на большее время задержаться на участке и попасть в число многократно обнаруженных насекомых. Экземпляры, транспортировавшиеся по более прямым путям, вероятно, быстрее других покинули участок и смогли «уйти» из под нашего контроля. Здесь необходимо пояснить, что поселения песчанок без больших разрывов на многие километры продолжались во все стороны от выбранного для работы участка.

Таким образом, установлено, что результатом форезии блох с помощью грызунов-прокормителей является непрерывное формирование паразитарной контактной сети, связывающей между собой практически всех обитателей единого заселенного пространства (сопряженных популяционных ареалов хозяев и их эктопаразитов). Структура сети образована двумя основными формами связей: сходящимися и расходящимися, которые обеспечивают ее монолитность и постоянное расширение числа контактов между грызунами при помощи блох.

Из всего вышесказанного вытекает вывод о том, что разработанная нами методология выявления паразитарных контактных сетей вполне способна обеспечить получение достоверных результатов по этому вопросу. Однако при доступной интенсивности исследований обнаруживается лишь небольшая часть сети, об истинных размерах которой и о количественных характеристиках ее элементов можно только догадываться. Не будет преувеличением по-

лагать, что весь совместный ареал грызунов-хозяев и их блох, если он или какая-либо его часть не имеют изолирующих пространственных разрывов, представляет собой сплошную паразитарную контактную сеть. Именно это обстоятельство обеспечивает гомеостаз и генетическое единство популяций насекомых-эктопаразитов, не способных самостоятельно передвигаться по просторам своих огромных ареалов. Кроме того, изучение контактных сетей позволяет лучше понять механизм трансмиссии возбудителя чумы в ее природных очагах.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 06-04-48107.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беклемишев В.Н. О классификации биоценологических (симфизиологических) связей. Бюл. Моск. об-ва испытат. природы. Отд. биол. 1951; 56(5):3–30.
2. Кеннеди К. Экологическая паразитология. М.: Мир; 1978. 230 с.
3. Кузнецов А.А. Совершенствование мониторинга за очагами чумы песчаночьего и крысиного типов на основе анализа эколого-эпизоотологических закономерностей их функционирования [Автореф. дис. ... д-ра биол. наук]. Саратов; 2005. 47 с.

4. Кузнецов А.А., Матросов А.Н. Применение индивидуального мечения блох (*Siphonaptera*) для изучения их разноса хозяевами. Зоол. журн. 2003; 82(8):964–71.

5. Кузнецов А.А., Матросов А.Н. Передвижения и контакты песчанок *Meriones meridianus* и *M. tamariscinus* (*Rodentia, Cricetidae*) в Волго-Уральских песках. Зоол. журн. 2004; 83(6):733–44.

6. Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Никитин П.Н., Эйгелис С.Ю. Метод индивидуального мечения блох и результаты его испытания для изучения разноса эктопаразитов малыми песчанками Волго-Уральских песков. Пробл. особо опасных инф. 1993; 3(73):58–64.

A.A.Kuznetsov, T.V.Knyazeva, A.N.Matrosov

#### Parasitic Contact Nets in the Settlements of Tamarisk and Middy Gerbils and their Fleas in the Sands of Volga-Ural Country between Two Rivers

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

As a result of transitions of the *Meriones* genus gerbils and fleas phoresy the parasitic contact nets are formed in their settlements to provide the effective settling of ectoparasites and spreading of plague etiological agent. The contact net covers all the territory occupied by the rodent settlements that do not have spatial disconnection.

Key words: gerbils, fleas, phoresy, parasitic contacts, settling.

Поступила 01.04.08.

УДК 599.32(471.44)

И.В.Кутырев<sup>1</sup>, Е.А.Билько<sup>2</sup>, И.Н.Шарова<sup>2</sup>, Т.Ю.Красовская<sup>2</sup>, В.Н.Чекашов<sup>2</sup>, А.Н.Матросов<sup>2</sup>

#### ОЦЕНКА РОЛИ ФОНОВЫХ ВИДОВ МЫШЕВИДНЫХ ГРЫЗУНОВ В СОХРАНЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ АРБОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ В ПОЛУПУСТЫННОЙ ЗОНЕ САРАТОВСКОГО ЗАВОЛЖЬЯ

<sup>1</sup>ГОУ ВПО Саратовский государственный медицинский университет Росздрава, <sup>2</sup>ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

Рассмотрена роль фоновых видов мышевидных грызунов в сохранении арбовирусных инфекций в полупустынной зоне Саратовского Заволжья. Установлены показатели их численности в околородных и антропогенных биотопах, инфицированности отдельных видов арбовирусными инфекциями. Обоснована высокая потенциальная эпидемическая опасность интразональных биотопов как центров формирования природных очагов сочетанных арбовирусных инфекций.

*Ключевые слова:* арбовирусные инфекции, мышевидные грызуны, околородные и антропогенные биотопы, показатели численности и инфицированности, потенциальная эпидемическая опасность.

В конце XX столетия на территории юга Саратовского Заволжья отчетливо проявилась тенденция формирования природных очагов сочетанных арбовирусных инфекций [1, 2, 3, 8, 11, 12]. Этот процесс совпал во времени с повышением температуры в период зимних месяцев и расширением северных границ ареалов многих носителей и переносчиков зоонозных инфекций [4, 6, 10]. Особенно значительные изменения биоценотической структуры первичных природных комплексов произошли в зонах ирригации и орошения территории Саратовского Заволжья, где отмечен значительный рост численности домовых мыши [7]. Все это, в целом, могло привести к широкому распространению возбудителей арбовирусных инфекций в популяциях фоновых видов мышевидных грызунов, что обусловило необходимость оцен-

ки их современной эпизоотологической значимости.

В настоящем сообщении обобщены материалы, полученные в 2006–2007 гг. при проведении эпизоотологического обследования Александрово-Гайского и Новоузенского административных районов Саратовской области. Добыто и исследовано на наличие возбудителей арбовирусных 583 экз. мышевидных грызунов 4 видов. Накоплено 4055 ловушечных, в том числе в околородных биотопах – 3105, антропогенных – 650, скирдах – 300. Учеты численности грызунов выполнены стандартными методами [5, 9]. Лабораторные исследования осуществляли в стационарной лаборатории диагностики инфекционных болезней РосНИПЧИ «Микроб», а также в полевых условиях в мобильной лаборатории эпидразведки и индикации на базе автомашины ГАЗ-2705.

Выявление антигенов арбовирусов проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческого диагностикума производства ГУ НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН, Москва.

В результате выполненных в 2006–2007 гг. исследований установлено, что на территории полупустынной зоны Саратовской области в многовидовых сообществах грызунов, сформировавшихся в околородных и антропогенных биотопах, доминирующее положение занимает домовая мышь. Общая доля в отловах этого вида достигает 69,2 % (табл. 1). В качестве видов содоминантов зарегистрированы малая лесная мышь, обыкновенная и общественная полевки.

Проведенные иммунологические исследования выявили наличие антигенов 6 арбовирусов в 48 пробах полевого материала, из них Синдбис – 1, Западного Нила (ЗН) – 7, серокомплекса Калифорнийского энцефалита (СКЭ – Тягиня, Инко) – 32, Батаи – 3, Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ) – 5. Причем 79,2 % (38 проб) положительных результатов получено при исследовании суспензий мозга от домовых мышей, у которых выявлены антигены всех 6 видов арбовирусов, зарегистрированных в 2006–2007 гг. в полупустынной зоне Саратовского Заволжья. Показатели инфицированности грызунов составляли: домовой мыши – 9,4 %, малой лесной мыши – 4,1 %, полевки обыкновенной – 11,5 %, полевки общественной – 1,8 %. Для сравнения эпизоотологической значимости фоновых видов грызунов, природных резерватов арбовирусов, выполнена соответствующая оценка степени их доминирования в антропогенных и околородных биотопах. В частности, установлено, что в сезонном аспекте доля в отловах домовой мыши в околородных биотопах составляет в весенний период 60–70 %; в осенний – 48–65 %. Более высокая численность домовой мыши отмечена в антропогенных биотопах – до 90 % (табл. 2). В ан-

тропогенных биотопах в качестве вида содоминанта выступает обыкновенная полевка, для которой установлена высокая инфицированность арбовирусами (табл. 1). В осенний период здесь также зарегистрирована малая лесная мышь, а с 2007 г. отмечено расселение общественной полевки.

Полученные данные показали присутствие возбудителей арбовирусных инфекций в антропогенных биотопах. Подтверждением этого служат факты обнаружения антигенов вируса Синдбис, ЗН, Тягиня и Батаи осенью 2006 г. и антигена вируса Инко весной 2007 г., при лабораторном исследовании проб органов от домовых мышей, добытых в окрестностях животноводческих ферм и скирдах соломы, а также регистрации антигена вируса Батаи в биологическом материале от домовых мышей, добытых осенью 2007 г. в жилом доме животновода (окрестности п. Варфоломеевка).

Результаты полевых и лабораторных исследований свидетельствуют также о потенциальной опасности заражения человека арбовирусными инфекциями и при посещении околородных биотопов. При проведении эпизоотологического обследования здесь неизменно регистрировали широкий спектр маркеров возбудителей арбовирусных инфекций среди фоновых видов мышевидных грызунов, в том числе в 2006 г. обнаружены антигены вирусов Синдбис, ЗН, Батаи и СКЭ; в 2007 г. – Инко. Необходимо отметить, что ранее, в 1998–1999 гг., на территории Дергачевского и Александрово-Гайского районов в зоне действия Саратовского магистрального оросительного канала среди фоновых видов мышевидных грызунов впервые в Саратовском Заволжье установлена циркуляция вируса геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) [8]. Сформировавшиеся здесь устойчивые паразитарные системы, включающие широкий спектр млекопитающих, лимнофильных видов птиц, кровососущих членистоногих, способны обеспечить

Таблица 1

Участие фоновых видов мышевидных грызунов в циркуляции возбудителей арбовирусных инфекций в полупустынной зоне Саратовского Заволжья в 2006–2007 гг.

Вид грызуна	Кол-во добытых зверьков, экз.	Доля вида в отловах, %	Кол-во проб, содержащих антигены арбовирусов, абс.	Показатель инфицированности грызунов, %
Мышь домовая <i>Mus musculus</i> Linnaeus, 1758	403	69,2	38	9,4
Мышь малая лесная <i>Apodemus uralensis</i> Pallas, 1771	73	12,5	3	4,1
Полевка обыкновенная <i>Microtus arvalis</i> Pallas, 1778	52	8,9	6	11,5
Полевка общественная <i>Microtus socialis</i> Pallas, 1773	55	9,4	1	1,8
<i>Итого</i>	583	100	48	8,2

Таблица 2

Численность фоновых видов мышевидных грызунов в околородных и антропогенных биотопах полупустынной зоны Саратовского Заволжья в 2006–2007 гг.

Год и сезон проведения работ	Добыто грызунов, экз.	Численность грызунов, %	Доля вида в отловах, %			
			Домовая мышь	Малая лесная мышь	Обыкновенная полевка	Общественная полевка
<i>Околородные биотопы</i>						
Весна 2006	34	7,6	76,5	2,9	20,6	-
2007		7,7	61,7	27,2	11,1	-
Осень 2006	79	20,8	48,1	19,0	30,4	2,5
2007	164	14,6	65,2	16,5	7,3	11,0
<i>Антропогенные биотопы</i>						
Весна 2006	19	9,5	89,5	-	10,5	-
2007						
Осень 2006	50	25,0	90,0	4,0	6,0	-
2007	55	22,0	50,9	-	-	49,1

длительное сохранение и циркуляцию возбудителей различных арбовирусных инфекций. А в связи с линейным характером территориального расположения околводных биотопов (поймы рек, берега каналов, водохранилищ, лиманов и др.) в полупустынной зоне Саратовского Заволжья, сохраняется возможность экспансии переносчиков возбудителей арбовирусных инфекций и на прилегающие территории, заселенные представителями степной и полупустынной фауны.

Представленные выше результаты исследований позволяют рассматривать интразональные биотопы в качестве многочисленных первичных «центров» формирования природных очагов арбовирусных инфекций в полупустынной зоне Саратовского Заволжья. Учитывая, что мышевидные грызуны играют важное значение в прокормлении личинок и нимф определенных видов иксодовых клещей, нельзя отрицать их значения в распространении эпидемически значимых возбудителей арбо- и хантавирусов. При этом доминирующее положение домовых мыши в антропогенных и околводных биотопах обуславливает опасность их заноса в жилье человека.

В качестве заключения отметим, что наблюдаемый широкий видовой спектр выявляемых арбовирусов в популяциях мелких млекопитающих свидетельствует об их интенсивной циркуляции на всей территории полупустынной зоны Саратовской области. Причем наибольшую потенциальную эпидемическую опасность представляют интразональные ландшафты, в том числе зоны ирригации и орошения земель, где необходимо проведение постоянного эпизоотологического мониторинга популяций мышевидных грызунов и контроля их численности в постройках человека.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев Е.В., Кнороз М.Ю., Сухин В.И. и др. Биогеографическое прогнозирование арбовирусов на территории Саратовской области. Деп. в ВИНТИ. N 2660-В 90. Саратов; 1990. 10 с.
2. Кнороз М.Ю., Ляпин М.Н., Ермаков Н.М., Скворцова Т.М. Изоляция вируса Батаи (*Bunyaviridae*, *bunyavirus*, комплекс Буньямвера) на территории Саратовской области. Деп. в ВИНТИ N 362-В 92. Саратов; 1992. – 7 с.
3. Ляпин М.Н., Ермаков Н.М., Малюкова Т.А., Головки Е.М.,

Куляш Г.Ю., Андреева Л.Б. и др. Прогнозирование и выявление циркуляции арбовирусов в Саратовской области. Вопр. риккетсиол. и вирусол. Астрахань-Москва; 1996. С. 88–93.

4. Опарин М.Л., Опарина О.С. Изменение распространения млекопитающих в степях Нижнего Поволжья в связи с глобальным потеплением климата. Поволжский экологический журнал. 2005; 2:173–9.

5. Отлов, учет и прогноз численности мелких млекопитающих и птиц в природных очагах инфекций. Методические указания. МУ 3.1.1029-01. М.; 2001. 72 с.

6. Попов Н.В., Куклев Е.В., Студский А.А., Удовиков А.И., Матросов А.Н., Князева Т.В. и др. Эпизоотологические последствия современного потепления климата в природных очагах чумы России и стран СНГ. В кн.: Противочумные учреждения России и их роль в обеспечении эпидемиологического благополучия населения страны. М.: ЛЮ МОО «Сокольники»; 2004. С. 27–31.

7. Попов Н.В., Корнеев Г.А., Санджиев В.Б.Х., Козлова Т.А., Тарасов М.А., Яковлев С.А. Эколого-эпизоотологические последствия ирригации и орошения Нижнего Поволжья. РЭТ-инфо. 2000; 3:21–2.

8. Попов Н.В., Корнеев Г.А., Тарасов М.А., Щербакова С.А. и др. Ландшафтно-эпизоотологическое районирование энзоотических по ГЛПС территорий Саратовской области. Пробл. особо опасных инф. 2001; 89(1):55–63.

9. Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих-переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций. Методические указания. МУ 3.1.1027-01. М.; 2002. 55 с.

10. Турцева М.А. Спонтанные микробиоценозы некоторых видов иксодовых клещей (*Ixodidae*) и слепней (*Tabanidae*) [автореф. дис. ... канд. биол. наук]. Саратов; 2005. 20 с.

11. Щербакова С.А., Куляш Г.Ю., Куклев Е.В., Кутырев В.В. Арбовирусные инфекции и их актуальность для здравоохранения Саратовской области. Пробл. особо опасных инф. 2001; 81(1):13–25.

12. Щербакова С.А., Билько Е.А., Ключева Е.В., Данилов А.Н. и др. Особенности экологии и ландшафтного распространения арбовирусов на территории Саратовской области. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005; 5:27–30.

I.V.Kutyrev, E.A.Bil'ko, I.N.Sharova, T.Yu.Krasovskaya, V.N.Chekashov, A.N.Matrosov

#### Assessment of the Role of Mouse-Like Rodents Background Species in the Preservation of Arboviral Infections Agents in the Semi-Desert Zone of Saratov Zavolzhie

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

The role of the background species of mouse-like rodents in the preservation of arboviral infections in the semi-desert zone of Saratov Zavolzhie was studied. Determined were the indices of their number in the near-water and anthropogenic biotopes, and arboviral infection rate in some species. Substantiated was high potential epidemic danger of the intrazonal biotopes as centers of formation of associated natural foci of arboviral infections.

*Key words:* arboviral infections, mouse-like rodents, near-water and anthropogenic biotopes, potential epidemic danger.

Поступила 22.08.08.

В.П.Топорков, Л.Н.Величко, А.Е.Шиянова,  
О.В.Кедрова

## ДИНАМИКА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ЧУМОЙ В МИРЕ

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

Анализ заболеваемости с 1984 по 2007 год выявил сложную эпидемиологическую ситуацию по чуме в мире, особенно в период с 1991 по 2003 год. Наиболее напряженная ситуация сложилась в Африке. В анализируемый период наблюдалась тенденция к повышению заболеваемости чумой в мире в 2,4, в Африке – в 4,1, к снижению – в Америке и Азии в 11,1 и 1,7 раза. Установлен неравномерный характер распределения заболеваний чумой в мире: на Африку приходится 80,1, Азию – 14,1, Америку – 5,8 % больных. В мире с 1990 по 2006 год зарегистрировано 10 локальных вспышек легочной чумы, 4 – в Азии, 5 – в Африке, одна – в Америке.

*Ключевые слова:* динамика заболеваемости, чума, континенты.

Анализ динамики заболеваемости чумой в мире с 1899 по 1980 год [3] выявил ряд характерных особенностей, во-первых, постоянное снижение заболеваемости по десятилетним периодам как в мире, так и в Азии и Африке. В Америке исключение составил период с 1961 по 1970 год, когда заболеваемость чумой повысилась по сравнению с предыдущим десятилетием в 4,5 раза (с 1228 до 5560 случаев). Вторая особенность заключалась в подавляющем большинстве случаев заболеваний в Азии в 30–50-е годы до 90,2–95,7 % за счет Индии, Индонезии, Бирмы, в 60–70-е годы – до 78,0–80,6 % за счет Вьетнама. В-третьих, анализ показал, что современные методы профилактики и борьбы с чумой эффективны, они привели к снижению уровня заболеваемости.

Учитывая вышеизложенное, в настоящей работе проведено определение тенденции динамики заболеваемости чумой в мире с 1984 по 2003 год в период регулярно поступающей и обобщающей информации и анализ отрывочной информации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по этой инфекции с 2004 по 2007 год.

Для анализа использованы данные официальной статистики ВОЗ и литературные источники. Тенденцию динамики заболеваемости чумой определяли по параболе I порядка [8]. Статистический анализ заболеваемости проводили по 3 временным периодам: 1984–1993, 1994–2003, 1984–2003 годы.

В 26 странах мира с 1984 по 2003 год зарегистрировано 44579 случаев чумы [9–24]. В мире прослеживалась тенденция к повышению заболеваемости в 2,4 раза ( $y_1=1325,68-3132,41$  случаев в абсолютных числах). В 1984–1993 гг. наблюдалось 16049 случаев чумы. Наибольшее число больных зарегистрировано с 1991 по 1993 год (2232–3059 случаев), наименьшее – в 1985 и 1989 гг. (877, 876 случаев), в остальные годы – 1207–1426. С 1994 по 2003 год зарегистрировано 28530 заболеваний, среднее число больных в этот период оказалось выше в

1,8 раза аналогичной величины за предыдущее десятилетие. В начале периода с 1994 по 2003 год в течение 4 лет наблюдался рост заболеваемости, в течение следующих 6 лет – снижение ее. Средний темп роста заболеваемости в 1994–1997 гг. составил 17,6 %, средний темп снижения в 1998–2003 гг. – 23,6 %. Наибольшее число случаев чумы зарегистрировано в 1996 и 1997 гг. (3017 и 5419 больных), наименьшее – в 2002 г. (1925 случаев), в остальные годы более 2000 случаев ежегодно (2232–2939 больных, рис. 1).

В 2004–2006 гг. в мире, по неполным данным ВОЗ, зарегистрированы 371 больной и 1174 подозрительных на чуму случаев в 6 странах (Монголия, Китай, США, Эквадор, Уганда, Демократическая республика (ДР) Конго), в том числе в 2004 г. выявлено 30, 2005 г. – 141, 2006 г. – 331 больной чумой и 1174 подозрительных на эту инфекцию случаев. В 2004–2005 гг. в ДР Конго регистрировали около 1000 больных легочной чумой ежегодно, в 2006 г. – более 1000, генез которых не определен и не все случаи лабораторно подтверждены [5, 7, 26, 29].

Подавляющее число больных наблюдалось в Африке. В 13 странах Африки за анализируемый

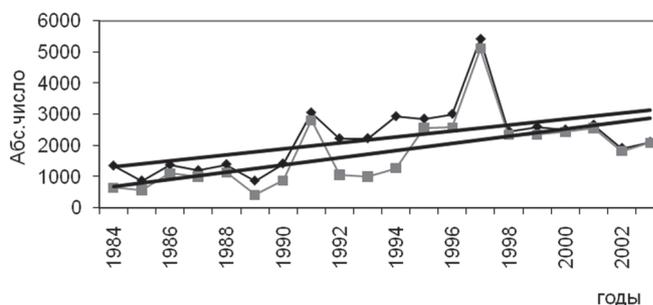


Рис. 1. Динамика заболеваемости чумой в мире и Африке:

◆ – мир; ■ – Африка; — — линия тренда (динамика заболеваемости в мире); — — линия тренда (динамики заболеваемости в Африке)

период зарегистрировано 35731 случай чумы, в целом в Африке наблюдалась тенденция к повышению заболеваемости в 4,1 раза ( $y_1 = 695,06 - 2878,2$  случаев чумы). В 1984–1993 гг. на континенте зарегистрировано 10635 случаев чумы. Наибольшее число больных чумой наблюдалось в 1986–1988 и 1991–1993 гг. (1000–2811 случаев), наименьшее – в 1984–1985, 1989 гг. (421–648 случаев). В 1994–2003 гг. в Африке зарегистрировано более 25 тыс. больных. Сравнение среднего числа больных этого периода с предыдущим выявило повышение заболеваемости в 2,4 раза. В 1994–1997 гг. наблюдался рост заболеваемости, средний темп его составил 30,2 %, в 1998–2003 гг. – снижение со средним темпом равным 17,2 %. Наибольшее число больных зарегистрировано в 1997 г. (5101 случай), наименьшее – в 1994, 2000 гг. (1273, 1822 случаев), в остальные годы – от 2219 до 2567 случаев. В Алжире после пятидесятилетнего отсутствия чумы среди людей протекала локальная вспышка в энзоотичной по чуме зоне. Эпизоотологическое исследование в этой зоне Алжира не проводилось ни до, ни после вспышки.

В Африке в зоне природной очаговости чумы находится 16 стран. В последние годы в них при содействии ВОЗ созданы лаборатории. На Мадагаскаре с 1991 г. осуществляется долгосрочная национальная программа по борьбе с чумой, финансируемая Всемирным банком и предусматривающая искоренение чумы. В зонах риска созданы 294 Центра здоровья. Для диагностики применяют, разработанный в институте Пастера (Мадагаскар), быстрый диагностический тест (хроматографический метод определения антигена Ф1 микроба чумы, позволяющий поставить диагноз у постели больного в течение получаса). В результате проведенной работы на Мадагаскаре удалось снизить заболеваемость чумой и летальность от нее с 35 до 5 % [5].

В 8 странах Азии за анализируемый период зарегистрировано 6281 случай чумы, заболеваемость снизилась в 1,7 раза ( $y_1 = 395,06 - 233,04$  случаев чумы

в абсолютных числах). В 1984–1993 гг. в Азии выявлено 3606 случаев чумы. Наибольшее число больных зарегистрировано в 1989, 1990, 1992, 1993 гг. (425,505, 1012, 605 случаев), в остальные годы – от 118 до 227. В 1994–2003 гг. заболеваемость чумой на континенте снизилась до 2675 случаев чумы, а среднее число больных было ниже в 1,4 раза аналогичной величины в предыдущем периоде. Наибольшее число больных выявлено в 1994 г. (1228 случаев), наименьшее – 1998, 2000, 2002, 2003 гг. (26–99 случаев), в остальные годы – от 102 до 386 (рис. 2).

В 5 странах Америки с 1984 по 2003 год зарегистрировано 2567 случаев чумы, заболеваемость в этот период снизилась в 11,1 раза ( $y_1 = 235,6 - 21,13$  случаев чумы). Наибольшее число больных наблюдали в 1984, 1993 гг. (500, 621 случаев), наименьшее – с 1987 по 1991 год (21–88 случаев), в остальные годы – от 128 до 162. В 1994–2003 гг. наблюдалось 759 больных чумой, произошло снижение среднего числа больных в 2,4 раза по сравнению с предыдущим десятилетием. Наибольшее число больных выявлено в 1994 г. (438 случаев), наименьшее – с 1996 по 2003 год (1–55 случаев), в 1995 г. – 115.

В 1984–1993 гг. в мире чумой было поражено 20 стран, в 1994–2003 гг. их число составило 23. В Африке в 1994–2003 гг. были поражены чумой Мадагаскар, ДР Конго, Танзания, Уганда, Намибия, Замбия, Зимбабве (в них чума регистрировалась и в предыдущий период), Алжир, Малави, Мозамбик. В Азии во второй период чума встречалась в Казахстане, Китае, Монголии, Мьяме, Вьетнаме (как и в предыдущий период), Индии, Индонезии, Лаосе. В Америке в оба периода были поражены чумой Боливия, Бразилия, Перу, Эквадор, США.

Установлен неравномерный характер распределения заболеваний чумой в мире: на Африку в 1984–1993 гг. пришлось 66,3, в 1994–2003 гг. – 88,0 % от общего числа больных в мире. На Азию в 1984–1993 гг. пришлось 22,5, в 1994–2003 гг. – 9,3 %, на Америку в 1984–1993 гг. – 11,2, в 1994–2003 гг. – 2,7 % от заболеваемости в мире (таблица).

В Африке в 1984–1993 гг. доля Танзании, Намибии, ДР Конго составила 93,1 % от общего числа больных на континенте. В 1994–2003 гг. удельный вес больных на Мадагаскаре, Танзании и ДР Конго равнялся 83,3 % от заболеваемости в Африке. В Азии в 1984–1993 гг. наибольшая доля больных наблюдалась во Вьетнаме и Мьяме, она составила 92,9 % от общего числа на континенте. В 1994–2003 гг. удельный вес больных во Вьетнаме и Индии равнялся 83 % от заболеваемости в Азии. В Америке в 1984–1993 гг. на Перу и Бразилию пришлось 85,9 %, в 1994–2003 гг. на Перу – 83,1 % от заболеваемости на континенте.

Летальность в мире составила 9,1; 7,0 %, в Африке – 10,8; 7,1 %, в Азии – 5,2; 7,0 %, в Америке – 7,0; 5,4 % в 1984–1993, 1994–2003 гг. соответственно. В 1984–1993 гг. на Мадагаскаре летальность равнялась 20,9, в ДР Конго – 23,3, в Кении – 18,1 %. В 1994–2003 гг. летальность равнялась в ДР Конго 9,9,

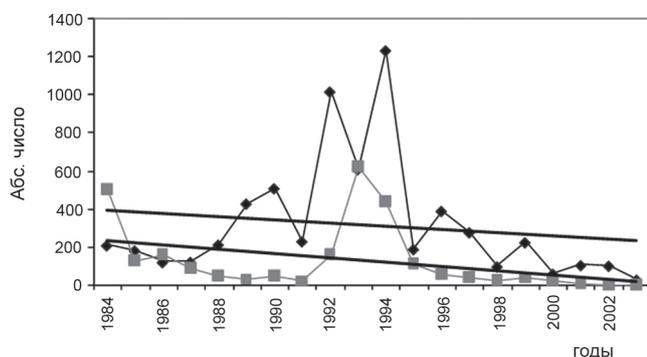


Рис. 2. Динамика заболеваемости чумой в Азии и Америке:

◆ – Азия; ■ – Америка; — — линия тренда (динамика заболеваемости в Азии); — — линия тренда (динамики заболеваемости в Америке)

Заболееваемости чумой в мире с 1984 по 2003 год

Континент, страна	1984–1993		1994–2003		Всего больных
	Кол-во больных	% от числа больных в мире / на континенте	Кол-во больных	% от числа больных в мире / на континенте	
Мадагаскар	1147	7,1/10,8	12270	43,0/48,9	13417
Танзания	3817	23,8/35,9	3527	12,4/14,0	7344
Намибия	2780	17,8/26,1	135	4,7/0,5	2915
Д. Р. Конго	2159	13,5/20,3	3619	12,7/14,4	5778
Замбия	1	0,006/0,09	1169	4,1/4,6	1170
Мозамбик	-	-	2387	8,4/9,5	2387
Малави	-	-	907	3,2/3,6	907
Уганда	507	3,1/4,7	654	2,3/2,6	1161
Зимбабве	1	0,006/0,09	417	1,5/1,6	418
Ботсвана	173	1,0/1,6	-	-	173
Кения	44	0,3/0,4	-	-	44
Алжир	-	-	11	-	11
Ливия	6	0,04/0,06	-	-	6
<i>Всего в Африке</i>	10635	66,3/100,0	25096	88,0/100,0	35731
Вьетнам	2531	15,8/70,2	1331	4,7/49,7	3862
Мьяма	819	5,1/22,7	6	0,02/0,2	825
Индия	-	-	892	3,1/33,3	892
Китай	189	1,2/5,2	357	1,2/13,3	546
Монголия	57	0,3/1,6	59	0,2/2,2	116
Казахстан	10	0,06/0,3	14	0,05/0,5	24
Индонезия	-	-	6	0,02/0,2	6
Лаос	-	-	10	0,3/0,4	10
<i>Всего в Азии</i>	3606	22,5/100,0	2675	9,3/100,0	6281
Боливия	120	0,7/6,6	27	0,1/3,5	147
Бразилия	306	1,9/16,9	26	0,09/3,4	332
Перу	1247	7,7/69,0	631	2,2/83,1	1878
США	125	0,7/6,9	61	0,2/8,0	186
Эквадор	10	0,06/0,5	14	0,05/1,8	24
<i>Всего в Америке</i>	1808	11,3/100,0	759	2,7/100,0	2567
<i>Всего в мире</i>	16049	100,0	28530	100,0	44579

в Уганде – 17,1 %. Летальность была высокой в оба периода в Монголии (29,8; 32,2 %) и Казахстане (40,0; 21,4 %), в 1994–2003 гг. в Китае – (19,0 %), в Индии в 2002 г. – (25 %). Летальность в США равнялась 10,4; 11,4 % в 1984–1993, 1994–2003 гг. соответственно, в 1998 г. в Эквадоре – 100 %. На Африку приходится 78,5; 88,8 % от летальных случаев в мире, на Азию – 12,8; 9,2 %, на Америку – 8,7; 2,0 % в 1984–1993, 1994–2003 годы соответственно

Преобладающей клинической формой чумы у больных была бубонная, но встречалась и легочная, более опасная в эпидемиологическом отношении для человека. В 1961–1980 гг. в мире зарегистрировано 7 вспышек легочной чумы во Вьетнаме (3 вспышки), Иране, Мадагаскаре, Лесото, Танзании. С 1981 по декабрь 1990 вспышек легочной чумы не наблюдали [2, 4].

С 1990 по 2007 год в мире зарегистрировано 10 локальных вспышек легочной чумы в Танзании, Индии (2 вспышки), Китае, Эквадоре, Монголии, Уганде, ДР Конго среди рабочих карьера по добыче алмазов (3 вспышки). В 1984–1993 гг. в мире регистри-

рована одна локальная вспышка легочной чумы. В декабре – январе 1990–1991 гг. в Танзании зарегистрировано 6 случаев легочной формы в провинции Luchoto [27]. В сентябре – октябре 1994 г. в Индии выявлено 77 случаев легочной чумы в г. Сурат, летальность составила 67,5 %, в феврале 2002 г. в поселке в Гималаях – 16 с летальностью в 25 0 % [6, 25, 28]. В Китае в 1996 г. выявлено 7 больных с легочной формой чумы в двух деревнях автономного края Xizang [20]. В феврале – марте 1998 г. в провинции Чимборазо в Эквадоре протекала локальная вспышка легочной чумы, все 12 больных умерли [19]. Вспышка в Эквадоре возникла на фоне полного эпидемического благополучия по чуме в течение 12 лет, в Индии – через 25 и 7 лет благополучия. На Мадагаскаре в 2000 и 2001 гг. зарегистрировано 2,4 и 1,7 % легочной формы чумы, за период с 2000 по 2005 – 3 %, в то время как в 80-е годы их было до 5 % в год [4, 5, 23]. В сентябре 2003 г. в Монголии зарегистрировано 4 случая легочной чумы в одном аймаке [5, 24]. В 2004 г. в Уганде зарегистрировано 4 случая легочной чумы (2 случая вторичной легочной чумы, 2 – первичной) с летальностью в 75,0 % [9]. В 2004–2006 гг. в ДР Конго из-за гражданской войны, массовых миграций населения, распада системы здравоохранения обострилась ситуация по чуме. В 2004–2005 гг. среди рабочих карьера по добыче алмазов и жителей близлежащих деревень в Zobia зарегистрировано около 1000 больных легочной чумы ежегодно, в 2006 г. – более 1000 (194 случая легочной чумы, 75 из них с летальным исходом и 1174 подозрительных случаев на легочную чуму) [5, 7, 29]. Мониторинг эпизоотий в стране практически не проводится. В Zobia затруднены лабораторные подтверждения и осуществление мероприятий в очагах из-за удаленности территорий, нерегулярной транспортной связи, наличия боевых действий. Вспышки легочной чумы на всех континентах зарегистрированы на энзоотических по чуме территориях.

Проведенный анализ заболеваемости с 1984 по 2007 год выявил сложную эпидемиологическую ситуацию по чуме в мире, особенно в период с 1991 по 2003 год. Наиболее напряженная ситуация сложилась в Африке. За весь анализируемый период наблюдалась тенденция к повышению заболеваемости чумой в мире в 2,4, в Африке – в 4,1, к снижению – в Америке и Азии в 11,1 и 1,7 раза. Установлен неравномерный характер распределения заболеваний чумой в мире: на Африку приходится 80,1 %, Азию – 14,1 %, Америку – 5,8 % больных. В мире с декабря 1990 по 2007 год зарегистрировано 10 локальных вспышек легочной чумы, 4 – в Азии, 5 – в Африке, одна – в Америке. Особенностью легочной чумы в современных условиях является регистрация ее в прибрежной зоне эндемичных стран (Индия, Мадагаскар), в то время как ранее считалось, что она чаще встречается на плоскогорьях [1, 6]. На основании анализа можно

сделать вывод о неблагоприятном прогнозе по чуме в ближайшее время, особенно в странах Африки.

В апреле 2006 г. на Мадагаскаре проходила Международная конференция по профилактике и борьбе с чумой под эгидой ВОЗ. В работе конференции участвовали 70 представителей из 24 стран. На конференции было отмечено, что после последнего технического совещания по чуме (Атланта, 2000 г.) произошло обострение эпидемической ситуации в мире и проблема чумы должна касаться всего мирового сообщества, а не только стран, эндемичных по чуме. Конкретные рекомендации конференции будут опубликованы в изданиях ВОЗ [26].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акиев А.К. Эпидемиология чумы с элементами эпизоотологии. Пробл. особо опасных инф. 1970; 4(14):45–57.
2. Бароян О.В. Очерки по мировому распространению важнейших заболеваний человека (заболеваемость в зарубежных странах). М.: Медицина; 1967. 346 с.
3. Величко Л.Н., Иванов В.А., Хотько Н.И. Заболеваемость чумой за рубежом. Эпидемиол. и профилактик. чумы и холеры. 1983. С. 11–8.
4. Величко Л.Н., Кедрова О.В., Кокушкин А.М. Легочная чума (обзор вспышек) за рубежом. Пробл. особо опасных инф. 1998. С. 3–10.
5. Грижебовский Г.М. Чума в мире: старая инфекция – новые проблемы (с международной конференции по чуме). В кн.: Матер. VII Межгос. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ; 3–5 окт. 2006; Оболенск, Московской обл., Россия. Оболенск; 2006. С. 28–31.
6. Грижебовский Г.М., Топорков В.П., Брюханова Л.Д. и др. Эпидемиологическая характеристика вспышки чумы в Индии в 1994 г. Пробл. особо опасных инф. 2003; 85:28–37.
7. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Кривуля С.Д. и др. Санитарная охрана территории Российской Федерации: современное нормативно-методическое, организационное и научное обеспечение. Пробл. особо опасных инф. 2007; 1(93):5–10.
8. Плохинский Н.А. Биометрия. М.: Изд-во Моск. ун-та; 1970. 365 с.
9. Begier E.M., Asiki G., Anywaine Z. et al. Pneumonic plague cluster, Uganda. Emerg. Infect. Dis. 2006; 3:460–6.
10. Human plague in 1984. Wkly Epidem. Rec. 1985; 60(39): 297–8.
11. Human plague in 1985. Wkly Epidem. Rec. 1986; 61(36): 273–7.
12. Human plague in 1987. Wkly Epidem. Rec. 1988; 63(47): 360–2.
13. Human plague in 1988. Wkly Epidem. Rec. 1989; 64(40): 345–7.
14. Human plague in 1989. Wkly Epidem. Rec. 1990; 65(42): 321–3.
15. Human plague in 1990. Wkly Epidem. Rec. 1991; 66(44): 321–4.
16. Human plague in 1991. Wkly Epidem. Rec. 1993; 68(4): 21–3.
17. Human plague in 1993. Wkly Epidem. Rec. 1995; 70(7): 45–7.
18. Human plague in 1995. Wkly Epidem. Rec. 1997; 72(46): 344–7.
19. Plague, Ecuador. Wkly Epidem. Rec. 1998; 73(19):144.
20. Human plague in 1996. Wkly Epidem. Rec. 1998; 73(47): 366.
21. Human plague in 1997. Wkly Epidem. Rec. 1999; 74(41): 340–4.
22. Human plague in 1998 and 1999. Wkly Epidem. Rec. 2000; 75(42):338–43.
23. Human plague in 2000 and 2001. Wkly Epidem. Rec. 2003; 78(16):130–5.
24. Human plague in 2002 and 2003. Wkly Epidem. Rec. 2004; 79(33):301–6.
25. International team of experts, India. Wkly Epidem. Rec. 1994; 69(43):321–7.
26. International meeting on preventing and controlling plague: the old calamity still has a future. Wkly Epidem. Rec. 2006; 81(28):273–84.
27. Plague, United Republic of Tanzania. Wkly Epidem. Rec. 1991; 66(3):14.
28. Plague, India. Wkly Epidem. Rec. 2002; 77(9):69.
29. Plague, Democratic Republic of the Congo. Wkly Epidem. Rec. 2005; 80(10):86.

V.P.Toporkov, L.N.Velichko, A.E.Shiyanova,  
O.V.Kedrova

#### The Tendency of Plague Morbidity Dynamics in the World

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

The analysis of sickness rate carried out from 1984 to 2006 revealed the complicated epidemiologic situation with plague in the world, especially during the period of 1991–2003. The most strained situation formed in Africa. During the analyzed period the tendency to increase the plague incidence in the world – 2.4-fold, in Africa – 4.1-fold and to decrease in America – 11.1-fold and in Asia – 1.7-fold was observed. Uneven character of plague cases distribution in the world was determined: 80.1 % of cases were registered in Africa, 14.1 % – in Asia and 5.8 % – in America. From 1990 to 2006 10 local outbreaks of pneumonic plague were registered in the world: 4 – in Asia, 5 – in Africa and 1 – in America.

*Key words:* morbidity dynamics, plague, continents.

Поступила 21.03.08.

Шиянова А.Е.<sup>1</sup>, Топорков В.П.<sup>1</sup>, Луценко С.Н.<sup>2</sup>, Меркулова Т.К.<sup>1</sup>, Шилова Л.Д.<sup>1</sup>

## ВОПРОСЫ ГАРМОНИЗАЦИИ НОРМАТИВНОЙ БАЗЫ В ОБЛАСТИ САНИТАРНОЙ ОХРАНЫ ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ С ТРЕБОВАНИЯМИ СОГЛАШЕНИЙ ВСЕМИРНОЙ ТОРГОВОЙ ОРГАНИЗАЦИИ

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

<sup>2</sup>Управление Роспотребнадзора по Псковской области

Гармонизация национальной нормативно-методической базы Российской Федерации в области санитарной охраны с ММСП (2005 г.) одновременно будет означать и гармонизацию с требованиями Соглашений ВТО и не приведет к противоречию с ними. Требования, содержащиеся в нормативных документах в области санитарной охраны, приоритетны по отношению к положениям документов ВТО, поскольку касаются защиты здоровья людей. В методических документах необходимо предусмотреть стандартную продолжительность процедуры санитарно-карантинного контроля грузовых транспортных средств, товаров и грузов.

*Ключевые слова:* санитарная охрана территории, гармонизация.

Основанная в 1995 г. Всемирная торговая организация (ВТО) является правопреемницей Генерального Соглашения по тарифам и торговле (ГАТТ), учрежденного в 1948 г., однако предъявляет более жесткие требования в более широкой области международных торговых отношений. Главной задачей ВТО является либерализация мировой торговли путем ее регулирования преимущественно тарифными методами при последовательном сокращении уровня импортных пошлин, а также устранении различных нетарифных<sup>1</sup> барьеров, количественных ограничений и других препятствий в международном обмене товарами и услугами [1].

По данным депутата Государственной Думы, кандидата экономических наук А. Чиркина, перед Россией в связи с подачей в 1995 г. заявки о вступлении в ВТО стоит концептуальная цель – приблизить свое законодательство к требованиям ВТО. После присоединения к ВТО России придется отказаться от существующих сейчас протекционистских мер (установление высоких пошлин на импорт, его количественные ограничения в целях повышения конкурентоспособности отечественных производителей и т.д.). Проблемы в области внешнеторговой деятельности призван разрешить Закон Российской Федерации от 08.12.2003 г. № 164-ФЗ «Об основах государственного регулирования внешнеторговой деятельности» [5].

В связи с этим актуальным является вопрос гармонизации с требованиями Соглашений ВТО национальной нормативной базы в области санитарной охраны. Анализу требований Соглашений ВТО, относящихся к области здравоохранения, и необходимости учета их при переработке документов в области санитарной охраны, предусмотренных в плане Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации по обеспечению гармонизации

национальной нормативно-методической базы с Международными медико-санитарными правилами (2005 г.) (утвержден Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 25 июня 2007 г.), посвящена данная работа.

Цель ВТО при регулировании внешнеторгового оборота – обеспечение свободного трансграничного перемещения товаров и услуг в условиях прозрачности и предсказуемости норм регулирования. Главный принцип ВТО – отсутствие дискриминации как по отношению к разным странам – торговым партнерам, так и по отношению к импортным товарам по сравнению с национальными, а также обеспечение доступности соответствующей информации.

В общем контексте экономической глобализации ВТО заявляла о желательности внедрения единых международных стандартов качества экспортных товаров, признавая возможность использования индустриально развитыми странами национальных технических норм и стандартов в качестве нетарифных барьеров, ограничивающих импорт из развивающихся стран. Однако, по мнению А.Мукерджи, представителя Индии в ВТО, заместителя главы Миссии Индии в России [2], санитарные и фитосанитарные требования тракуются развитыми странами так, что создают угрозу для стран третьего мира, уменьшая их экспортные доходы. Кроме того, многие экспортеры незнакомы со стандартами и не могут адаптироваться к ним.

На решение этого вопроса направлен отдельный раздел «Соглашения по техническим барьерам в торговле», связанный с предоставлением дифференцированного и более благоприятного режима в отношении развивающихся стран, являющихся участниками Соглашения. Признана возможность принятия развивающимися странами определенных технических регламентов, стандартов или процедур оценки соответствия, направленных на сохранение местной технологии и методов и процессов произ-

<sup>1</sup>Тариф – официально установленная норма сборов, оплаты за что-то.

водства, отвечающих их потребностям развития несмотря на наличие международных стандартов, руководств и рекомендаций. Комитет по техническим барьерам в торговле наделен правом предоставлять им по запросу четко определенные, ограниченные по срокам полные или частичные освобождения от обязательств по Соглашению.

Профессор факультета юстиции, эксперт в области международного права и общественного здравоохранения David P. Fidler, анализируя процесс пересмотра ММСП, отметил, что ВТО со времени своего создания стала центральным юридическим механизмом, регулирующим международные торговые отношения, в том числе при контроле за инфекционными болезнями. «Соглашение по правам интеллектуальной собственности, связанным с торговлей», «Соглашение по применению санитарных и фитосанитарных мер» и мощный механизм по урегулированию споров сделали ВТО более значимой в политике контроля за инфекциями, чем исчерпавшие себя в случае распространения новых инфекций ММСП 1969 г. [6].

В 2002 г. было опубликовано совместное исследование ВОЗ и ВТО, проведенное относительно путей влияния Соглашений ВТО на политику здравоохранения [10]. К Соглашениям ВТО, касающимся политики здравоохранения, относятся: «Соглашение по техническим барьерам в торговле» (ТВТ), «Соглашение по применению санитарных и фитосанитарных мер» (SPS Agreement), «Соглашение по торговым аспектам прав интеллектуальной собственности» (TRIPS), «Генеральное соглашение по торговле услугами» (ГАТС). Как и исторически (ст. 20 ГАТТ), Соглашения ВТО гарантируют странам право принимать меры по ограничению импорта или экспорта, если это необходимо для защиты здоровья людей, животных или растений, при этом определяя уровень защиты, наиболее соответствующий данному риску. Здоровье человека постулируется ВТО как наиболее важная степень.

«Соглашение по техническим барьерам в торговле» определяет условия применения стандартов, технических регламентов, процедур сертификации. Положения Соглашения не применяются к санитарным и фитосанитарным мерам, как они определены в Приложении «А» «Соглашения по применению санитарных и фитосанитарных мер» (п. 1.5). Под действие положений Соглашения подпадают только товары, включая промышленные и сельскохозяйственные (п. 1.3). Основное содержание Соглашения – использование соответствующих международных стандартов или их соответствующих разделов в качестве основы для национальных технических регламентов, что исключало бы возможность дискриминации стран-экспортеров. При этом признается, что ни одной стране не должно создаваться препятствий для принятия мер, необходимых для защиты жизни и здоровья людей, охраны окружающей среды (ст.2 п. 2.2.).

«Соглашение по применению санитарных и фитосанитарных мер» определяет условия применения мер санитарного и фитосанитарного контроля. Как и ТВТ, позволяет странам в необходимой степени ограничивать торговлю по легитимным причинам, включая и охрану здоровья, однако, в отличие от ТВТ, направлено на специфические риски в здравоохранении. Согласно Приложению «А» Соглашения, к санитарным мерам относятся любые меры, применяемые для защиты жизни или здоровья людей от рисков, возникающих в связи с завозом инфекционного агента, с контаминацией пищевых продуктов биологическими или химическими веществами. Согласно Руководству по применению данного Соглашения, санитарные меры включают все соответствующие законы, декреты, инструкции, требования и процедуры, в том числе критерии изделия, методы производства, проводимые испытания, легализацию, процедуры одобрения (сертификации), карантинные обработки (процедуры), а также требования к транспортировке, упаковке, маркировке, связанные с безопасностью продукции, методам оценки риска [7]. Важно отметить, что данное Соглашение разрешает применять санитарные меры на, фактически, дискриминационной основе в отношении товаров из тех стран, из которых исходит угроза заражения. Кроме того, Соглашение разрешает временное превентивное применение санитарных и фитосанитарных мер в случае, когда научного обоснования риска нет, но де-факто ситуация требует применения подобных мер.

«Соглашение по торговым аспектам прав интеллектуальной собственности» определяет права и обязательства членов ВТО в области защиты интеллектуальной собственности. В качестве одного из принципов постулирует принятие при разработке или изменении национальных законов и правил мер, необходимых для охраны здоровья населения. Области здравоохранения касаются положения о патентуемых объектах и об охране закрытой информации. Согласно ст. 27 ч. II допускается исключение из области патентуемых тех изобретений, коммерческое использование которых необходимо предотвратить в пределах территории государства для охраны жизни или здоровья людей, животных или растений, или чтобы избежать серьезного ущерба окружающей среде. Возможно также исключение из области патентуемых диагностических, терапевтических и хирургических методов лечения людей. Согласно ст. 39 в обязательства стран – членов ВТО входит охрана закрытых данных об испытаниях или других сведений от недобросовестного коммерческого использования, когда такие данные требуются в качестве условия для разрешения сбыта фармацевтических или агрохимических продуктов, в которых используются новые химические вещества.

«Генеральное соглашение по торговле услугами» определяет основы режима торговли услугами, права и обязательства членов ВТО в этой сфере. Ст. 14 ого-

варивает, что положения Соглашения не понимаются как препятствие любому члену принимать или применять меры, необходимые для защиты жизни или здоровья людей, животных или растений.

ВТО является одним из ключевых партнеров ВОЗ среди межправительственных организаций, с которыми согласно ст. 14 ММСП (2005 г.) предполагается сотрудничество при их имплементации [8]. ВОЗ имеет статус наблюдателя в Комитетах по SPS и TBT соглашениям, а также в TRIPS соглашении. С другой стороны, ВТО имеет аналогичный статус в ВОЗ [9]. Сравнительный анализ Соглашений ВТО и ММСП (2005 г.) показал, что в ММСП (2005 г.) учтены многие положения «Соглашения по применению санитарных и фитосанитарных мер». В частности, определения, используемые для целей ММСП – «медико-санитарные меры», «риск для здоровья населения» – являются проекцией определений «санитарная мера» и «оценка риска» в Соглашении. Принципиальные требования, касающиеся применяемых медико-санитарных мер (применение их на основе оценки степени риска, научных данных, без создания больших ограничений для перевозок и др., ст. 17, ст. 27 п.б, ст. 30, ст. 31 п. 1, ст. 43 ММСП (2005 г.) и процедуры их применения, согласуются с требованием ст. 2, ст. 3 п. 3 и Приложения «С» Соглашения.

Таким образом, гармонизация национальной нормативно-методической базы Российской Федерации в области санитарной охраны с ММСП (2005 г.) одновременно будет означать и гармонизацию с требованиями Соглашений ВТО и не приведет к противоречию с ними. Требования, содержащиеся в нормативных документах в области санитарной охраны, приоритетны по отношению к положениям документов ВТО, поскольку касаются именно защиты здоровья людей. Согласованию с требованиями ВТО могут подлежать нормативные документы, устанавливающие требования непосредственно к показателям качества и безопасности продукции, упаковке, к процедуре производства, сертификации и т.д., то есть те документы, к которым обращаются положения, касающиеся санитарно-гигиенического направления в санитарной охране территории Российской Федерации.

В ст. 30 Закона Российской Федерации от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» одним из направлений санитарной охраны территории Российской Федерации, реализованным затем и в ММСП (2005 г.), обозначено предотвращение ввоза на территорию Российской Федерации товаров, химических, биологических веществ, радиоактивных материалов, отходов, других грузов, представляющих опасность для человека. Для санитарной охраны территории в пунктах пропуска через Государственную границу Российской Федерации, согласно ст. 30 п. 3 указанного Закона, вводится санитарно-карантинный контроль. Проведение санитарно-карантинного контроля в пунктах пропуска определено так-

же Постановлением правительства Российской Федерации от 19.01.98 г. № 60 «Об утверждении Положения о пунктах пропуска через государственную границу Российской Федерации» (с изменениями от 31.10.98 г. и 02.02.2000 г.), Постановлением Правительства Российской Федерации от 16.02.08 № 94 «О видах контроля, осуществляемых в пунктах пропуска через государственную границу Российской Федерации».

Проведение санитарно-карантинного контроля возложено на Федеральную службу по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Постановлением Правительства Российской Федерации от 30.06.04 г. № 322 «Об утверждении Положения о Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека».

В соответствии с этим в Санитарно-эпидемиологические правила (2008 г.) «Санитарная охрана территории Российской Федерации» СП 3.4. 2318-08 (переработаны в соответствии с Планом по обеспечению гармонизации нормативно-методической базы Российской Федерации с ММСП (2005 г.), утвержденные Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 22.01.2008 г. № 3, включен раздел, устанавливающий основные требования к мероприятиям, проводимым в пунктах пропуска через Государственную границу Российской Федерации в отношении грузов и товаров. Согласно п. 1 данного раздела в отношении грузов и товаров санитарно-эпидемиологические требования предъявляют:

если есть санитарно-эпидемиологические основания считать, что эти грузы, товары, отходы и вещества могли быть контаминированы возбудителями какой-либо болезни, на которые распространяются санитарные правила (наличие насекомых, грызунов и следов их пребывания);

в отношении товаров и грузов, потенциально опасных для здоровья населения;

в случае превышения допустимых значений мощности излучения и поверхностного загрязнения радионуклидами при перевозке радиоактивных материалов;

при наличии грузов в поврежденной упаковке с признаками утечки содержимого.

Согласно ст. 66 Таможенного кодекса Российской Федерации [4], таможенное оформление товаров и транспортных средств, перемещаемых через таможенную границу, может быть завершено только после осуществления санитарно-карантинного контроля, если товары подлежат такому контролю в соответствии с федеральными законами и иными правовыми актами Российской Федерации.

Должностные лица, осуществляющие санитарно-карантинный контроль, не разрешают:

ввоз продукции и товаров, не имеющих санитарно-эпидемиологического заключения, а также ввоз грузов и товаров в случаях выявления нару-

шений требований санитарных правил;

ввоз впервые внедряемой в производство продукции, ранее неиспользовавшихся химических, биологических веществ, отдельных видов продукции, представляющих потенциальную опасность для человека, новых пищевых продуктов, материалов и изделий, ввоз которых осуществляется на территорию Российской Федерации без государственной регистрации;

ввоз товаров и грузов на территорию Российской Федерации, содержащих несанкционированные источники ионизирующего излучения и неоформленные в соответствии с действующим законодательством;

ввоз опасных грузов в поврежденной упаковке с признаками утечки содержимого;

ввоз радиоактивных материалов на территорию Российской Федерации, имеющих превышение допустимых значений мощности дозы излучения и поверхностного загрязнения радионуклидами.

По показаниям возможно проведение лабораторного и инструментального контроля грузов и товаров, прибывающих из зараженных в результате радиоактивных, химических и биологических аварий районов, на безвозмездной основе. На основании проведенных лабораторных исследований лица, проводившие экспертизу, дают заключение в письменной форме. В целом же организация и проведение экспертизы грузов и товаров, которые не имеют регламентированных документов о соответствии санитарно-эпидемиологическим правилам либо о государственной регистрации, является негосударственной услугой; наличие у владельца груза этих документов, получаемых им на стадии заключения контракта на поставку товара, груза на территорию Российской Федерации – необходимое условие для импортирования товара, груза.

Вопрос безопасности ввозимых грузов обеспечен законодательно следующими документами:

Закон Российской Федерации от 02 января 2000 г. № 29-ФЗ «О качестве и безопасности пищевых продуктов»; Закон Российской Федерации от 07.02.1992 г. № 2300-1 «О защите прав потребителей»; «Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан» от 22.07.1993 г. № 5487-1; Федеральный закон от 09.01.1996 г. N 3-ФЗ (ред. от 22.08.2004) «О радиационной безопасности населения»; Федеральный закон от 24.06.98 г. N 89-ФЗ «Об отходах производства и потребления»; Федеральный закон от 24.06.97 г. N 109-ФЗ «О безопасном обращении с пестицидами и агрохимикатами»; Федеральный закон от 27.12.2002 г. N 184-ФЗ «О техническом регулировании»; Указ Президента Российской Федерации от 8 августа 2001 г. № 1004. Список возбудителей заболеваний (патогенов) человека, животных и растений, генетически измененных микроорганизмов, токсинов, оборудования и технологий, подлежащих экспортному контролю; Постановление Правительства Российской

Федерации от 29.08.2001 г. № 634 «Положение об осуществлении контроля за внешнеэкономической деятельностью в отношении возбудителей заболеваний человека, животных и растений, генетически измененных микроорганизмов, токсинов, оборудования и технологий»; Постановление Правительства Российской Федерации от 21.12.2000 г. № 987 «О государственном надзоре и контроле в области обеспечения качества и безопасности пищевых продуктов»; Постановление Правительства Российской Федерации от 22.02.2000 г. №148 «Положение о ввозе в Российскую Федерацию и вывозе из нее лекарственных средств и фармацевтических субстанций»; Постановление Правительства Российской Федерации от 1.07.96 г. № 766 «Положение о государственном регулировании трансграничных перевозок опасных отходов»; Постановление Правительства Российской Федерации от 17.07.2003 г. № 442 «О трансграничном перемещении отходов»; Постановление Правительства Российской Федерации от 11.07.2003 г. № 418 «Положение о ввозе в Российскую Федерацию облученных тепловыделяющих сборок ядерных реакторов»; Постановление Правительства Российской Федерации от 16.03.96 г. № 291 «Положение о порядке вывоза из Российской Федерации и ввоза в Российскую Федерацию радиоактивных веществ и изделий на их основе»; Постановление Правительства Российской Федерации от 8.05.96 г. № 563 «Положение о порядке ввоза в Российскую Федерацию и вывоза из Российской Федерации озоноразрушающих веществ и содержащей их продукции».

Согласно ст. 6 Закона Российской Федерации № 164-ФЗ от 08.12.2003 г. «Об основах государственного регулирования внешнеторговой деятельности», установление обязательных на территории Российской Федерации требований и критериев безопасности для жизни и здоровья граждан, животных и растений, для окружающей среды при ввозе в Российскую Федерацию товаров так же, как и деятельность в области подтверждения соответствия товаров обязательным требованиям в связи с их ввозом в Российскую Федерацию и вывозом из Российской Федерации, находится в ведении государства. При этом возможно введение мер, если они необходимы для охраны жизни и здоровья граждан, растений и животных, окружающей среды, для обеспечения соблюдения обязательства вывезти или уничтожить товары, не соответствующие санитарным требованиям (ст. 32).

Безопасность товаров и грузов, потенциально опасных для здоровья населения, определяется при проведении санитарно-эпидемиологических экспертиз. Требования нормативных документов в области сертификации продукции относятся как к импортируемой продукции, так и к отечественной, что соответствует принципу ВТО – отсутствие дискриминации между ними. Что касается правомерности требований российского законодательства к показателям

безопасности продукции, то следует отметить, что Статьей 3 п. 3 «Соглашения по применению санитарных и фитосанитарных мер» предусмотрена возможность при введении санитарных мер руководствоваться, помимо международных стандартов, также и национальными требованиями, в том числе к показателям безопасности ввозимой продукции, если государство считает международные стандарты неадекватными для надлежащего уровня санитарной защиты. «Соглашение по техническим барьерам в торговле» также допускает возможность наличия национальных требований, отличных от международных, если это обосновано с точки зрения обеспечения безопасности товара для здоровья населения; в этом случае должно быть опубликовано уведомление в печати о предполагаемом введении конкретного технического регламента, а также по запросу предоставлены заинтересованным странам подробные описания или тексты технического регламента с указанием, по возможности, разделов, которые существенно отличаются от соответствующих международных стандартов. То есть Соглашения ВТО никоим образом не запрещают государствам-членам развивать национальные системы технического регулирования, стандартизации и оценки соответствия. Государства-члены ВТО вправе применять в рамках национального законодательства необходимые меры в области технического регулирования, направленные на обеспечение жизни и здоровья населения, предотвращение обмана потребителей и другие подобные меры. Таким образом, присоединение к ВТО не лишит Россию возможности эффективно бороться с наплывом некачественных товаров на внутренний рынок мерами, предусмотренными национальным законодательством.

В отношении процедур сертификации, инспектирования и контроля следует отметить требования Приложения «С» «Соглашения по применению санитарных и фитосанитарных мер» по опубликованию сведений о стандартной продолжительности их проведения или уведомлению заявителя по его запросу. В Административном регламенте Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека исполнения государственной функции по осуществлению санитарно-карантинного контроля в пунктах пропуска через Государственную границу Российской Федерации [3] опубликована средняя продолжительность процедуры санитарно-карантинного контроля транспортных средств международного сообщения, касающейся эпидемиологических вопросов. Данные по стандартной продолжительности каждой процедуры санитарно-карантинного контроля грузовых транспортных средств, а также товаров и грузов, необходимо предусмотреть в методических документах. В вышеуказанном Административном регламенте обозначена и процедура рассмотрения претензий.

К процедуре санитарно-карантинного контро-

ля товаров и грузов можно отнести положение 5.2.6 «Соглашения по техническим барьерам в торговле»: размещение объектов, используемых в процедурах оценки соответствия, и процедура отбора образцов не должны приводить к созданию излишних неудобств для заявителей или их представителей. Этот вопрос решен адекватно применительно к пунктам пропуска, расположенным на территории, где имеется аккредитованная лабораторная база для проведения санитарно-токсикологической экспертизы ввозимых товаров. В пунктах пропуска с небольшим транспортным потоком, удаленных от областного центра, в случае необходимости подтверждения безопасности ввозимого груза для здоровья населения потребуется дополнительное время.

По предложению Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Правительством Российской Федерации принято Постановление № 110 от 21.02.08 «Об определении перечней пунктов пропуска через Государственную границу Российской Федерации, специально оборудованных и предназначенных для ввоза на территорию Российской Федерации товаров, химических, биологических и радиоактивных веществ, отходов и иных грузов, представляющих опасность для человека, пищевых продуктов, материалов и изделий». Реализация данного Постановления, помимо повышения эффективности санитарно-карантинного контроля грузов и товаров в пунктах пропуска, оборудованных в соответствии с требованиями технических регламентов, позволит также реализовать требования ММСП (2005) к пунктам въезда, что в свою очередь, создаст условия для выполнения требований Соглашений ВТО.

Гармонизация национальной нормативно-методической базы Российской Федерации в области санитарной охраны с Международными медико-санитарными правилами (2005 г.) одновременно будет означать и гармонизацию с требованиями Соглашений ВТО и не приведет к противоречию с ними. Требования, содержащиеся в нормативных документах в области санитарной охраны, приоритетны по отношению к положениям документов ВТО, поскольку касаются защиты здоровья людей. В методических документах, предусмотренных Планом Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации по обеспечению гармонизации национальной нормативно-методической базы с Международными медико-санитарными правилами (2005 г.), необходимо предусмотреть такие требования Соглашений ВТО, как указание стандартной продолжительности каждой процедуры санитарно-карантинного контроля грузовых транспортных средств, а также товаров и грузов; четкость формулировки правил применения процедур санитарно-карантинного контроля грузов; осуществление их на недискриминационной основе.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. ВТО: справочно-аналитическая записка. Подготовлена Отделом ВТО ДМЭС МВЭС России. <http://www.crc.ru/wto>
2. Мукерджи А. Внедрение нормативов ВТО: проблемы развивающихся стран. МЭМО. 2003: 6. С. 3–14
3. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 31.12.2006 г. № 893
4. Таможенный кодекс Российской Федерации от 28 мая 2003 г. N 61-ФЗ (ТК РФ) (с изменениями от 23 декабря 2003 г., 29 июня, 20 августа, 11 ноября 2004 г., 18 июля, 31 декабря 2005 г., 10 января, 18 февраля, 19, 30 декабря 2006 г., 6, 26 июня, 24 июля, 30 октября, 6 декабря 2007 г.).
5. Чиркин А. Предстоящее вступление России в ВТО и потенциальные экономические риски. *Вопр. экономики.* 2005; 5:132–9.
6. Fidler D.P. Emerging Trends in International Law Concerning Global Infectious Disease Control. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9(3):285–90.
7. How to apply the transparency provisions of the SPS Agreement. A Handbook prepared by the WTO Secretariat. September, 2002. 74 p.
8. International Health Regulation (2005): Areas of work for implementation. WHO/CDS/EPR/IHR/2007.1.
9. The WTO and the World Health Organization. [http://www.wto.org/thewto\\_e/coher\\_e/wto\\_who\\_e.htm](http://www.wto.org/thewto_e/coher_e/wto_who_e.htm)
10. WTO Agreements and Public Health. A joint study by the WHO and the WTO Secretariat. 2002. 175 c. [http://www.wto.org/res\\_e/booksp\\_e/who\\_wto\\_e.pdf](http://www.wto.org/res_e/booksp_e/who_wto_e.pdf)

A.E.Shiyanova, V.P.Toporkov, S.N.Lutsenko,  
T.K.Merkulova, L.D.Shilova

**Problems of Harmonization  
of the Normative Basis  
in the Sphere of the Sanitary Protection  
of the Territory of the Russian Federation  
with the Requirements  
of the World Trade Organization Agreements**

*Russian Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov;  
Rospotrebnadzor Authority for Pskov Region*

Harmonization of the national normative methodical basis of the Russian Federation in the sphere of the sanitary protection of the territory with the IHR (2005) will simultaneously signify its harmonization with the requirements of the World Trade Organization Agreements and will not lead to the contradiction with them. Requirements contained in the normative documents referring to the sphere of the sanitary protection are priority ones regarding to the regulations of the World Trade Organization documents as they touch upon public health protection. The standard duration of the procedure of the sanitary and quarantine control of cargo transport, goods and cargos should be foreseen in the methodical documents.

*Key words:* sanitary protection of the territory, harmonization.

Поступила 31.03.08.

УДК 591.9(471.631)

С.А.Яковлев<sup>1</sup>, Г.В.Сангаджиева<sup>2</sup>, А.И.Удовиков<sup>1</sup>, В.Б.-Х.Санджиев<sup>2</sup>, В.П.Осипов<sup>3</sup>,  
В.В.Диканская<sup>2</sup>, Н.В.Попов<sup>1</sup>

**ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ИРРИГАЦИИ И ОРОШЕНИЯ НА ИЗМЕНЕНИЕ ЗАПАДНОЙ ГРАНИЦЫ  
АРЕАЛА ТАМАРИСКОВОЙ ПЕСЧАНКИ *MERIONES TAMARISCINUS PALLAS, 1773*  
(*RODENTIA, CRICETIDAE*) НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КАЛМЫКИЯ**

<sup>1</sup>Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов;  
<sup>2</sup>Элистинская противочумная станция, Элиста; <sup>3</sup>Астраханская противочумная станция, Астрахань

Установлены современные границы распространения тамарисковой песчанки – *Meriones tamariscinus* (Pallas, 1773) на территории Республики Калмыкия. Показана роль ирригации и орошения земель в расширении ее ареала в западном и северо-западном направлениях. Рассмотрены эпизоотологические и эпидемиологические последствия расселения тамарисковой песчанки на территории Прикаспийского Северо-Западного степного природного очага чумы. Подтверждена тенденция формирования единого природного очага чумы песчаночьего типа в регионе Северо-Западного Прикаспия и в Предкавказье.

*Ключевые слова:* тамарисковая песчанка, домовая мышь, ирригация и орошение земель, изменение ареала, биоценогическая структура природного очага чумы, эпизоотологические последствия.

В настоящее время продолжается процесс трансформации биоценогической структуры природных очагов чумы, расположенных в регионе Северо-Западного Прикаспия [1, 5, 6]. Аридизация климата и интенсивное опустынивание территории Прикаспийской низменности в 70–80-х гг. прошлого столетия повлекло за собой исчезновение здесь поселений малого суслика *Spermophilus pygmaeus*, (Pallas, 1778) и смену носителей чумного микроба в восточных и южных районах Республики Калмыкия [8, 12]. Доминирующее положение в биоценогических комплексах Прикаспийской низменности заняли полуденная *Meriones meridianus* (Pallas, 1773) и тамарисковая *Meriones tamariscinus* (*Rodentia, Cricetidae*) (Pallas, 1773) песчанки, что явилось одной из основных причин формирования здесь

нового Прикаспийского песчаного очага чумы [3]. В последующие годы отмечена тенденция увеличения общей площади поселений малых песчанок и расширения западных и северо-западных границ их распространения, в первую очередь *M. tamariscinus* [11]. Причем в настоящее время, наряду с климатическими факторами, значительное воздействие на современный видовой спектр носителей и переносчиков чумного микроба продолжают оказывать антропогенные факторы, в первую очередь ирригация и орошение земель, пескозакрепительные работы. На территории Республики Калмыкия особенно значительное влияние на распространение тамарисковой песчанки *M. tamariscinus* оказало строительство Черноземельской и Сарпинской оросительно-обводнительных систем [4, 6]. Начиная с 70–80-х гг.

прошлого столетия в зонах орошаемого земледелия значительно расширился спектр биотопов, благоприятных для обитания тамарисковой песчанки [10]. Заселяя береговые линии оросительных каналов и кромки орошаемых полей, тамарисковая песчанка значительно расширила границы своего ареала в западном и северо-западном направлениях [6, 10, 11], сформировав на территории Прикаспийского Северо-Западного степного природного очага чумы (Черные земли, Кумо-Манычская впадина, Северные Ергени, Сарпинская низменность) крупные устойчивые поселения. Причем расселение тамарисковой песчанки в Сарпинской низменности и на Северных Ергенях установлено впервые. Изменение западных границ ареала тамарисковой песчанки на территории Республики Калмыкия также во многом способствовало современному потеплению климата, в условиях которого продолжается процесс расширения западных границ Прикаспийского песчаного очага чумы [12]. Происходящая трансформация пространственной и биоценотической структур природных очагов чумы на территории Республики Калмыкия обуславливает необходимость оценки их эпизоотологических и эпидемиологических последствий, что и явилось основной целью проведения настоящего исследования.

### Материалы и методы

В основу данной статьи положены собственные материалы, полученные авторами при проведении эпизоотологического обследования энзоотичных по чуме территорий Республики Калмыкия в 1988–2008 гг. Также были использованы архивные данные Астраханской и Элистинской противочумных станций за 1985–2006 гг. и материалы ГМС Элисты. При проведении учетных работ и полевых наблюдений применялись методы, рекомендованные к использованию в противочумных учреждениях России [2, 9]. Проведение эпизоотологического обследования энзоотичной по чуме территории сочеталось с работой на эпизоотологических стационарах, расположенных в различных ландшафтно-географических районах Республики Калмыкия. Учеты мелких млекопитающих проводились методом ловушко-ночей с использованием давилок «Геро» и дуговых капканов № 0 и № 1. Для всех точек сбора полевого материала проводилась привязка к местности с использованием топографических карт масштаба 1:200000, 1:1000000. Все зарегистрированные места отлова песчанок архивировались и в последствии картографировались. Обработка материалов выполнена с помощью пакета компьютерных программ Microsoft office Excel 2003, GIMPv2.0.5.

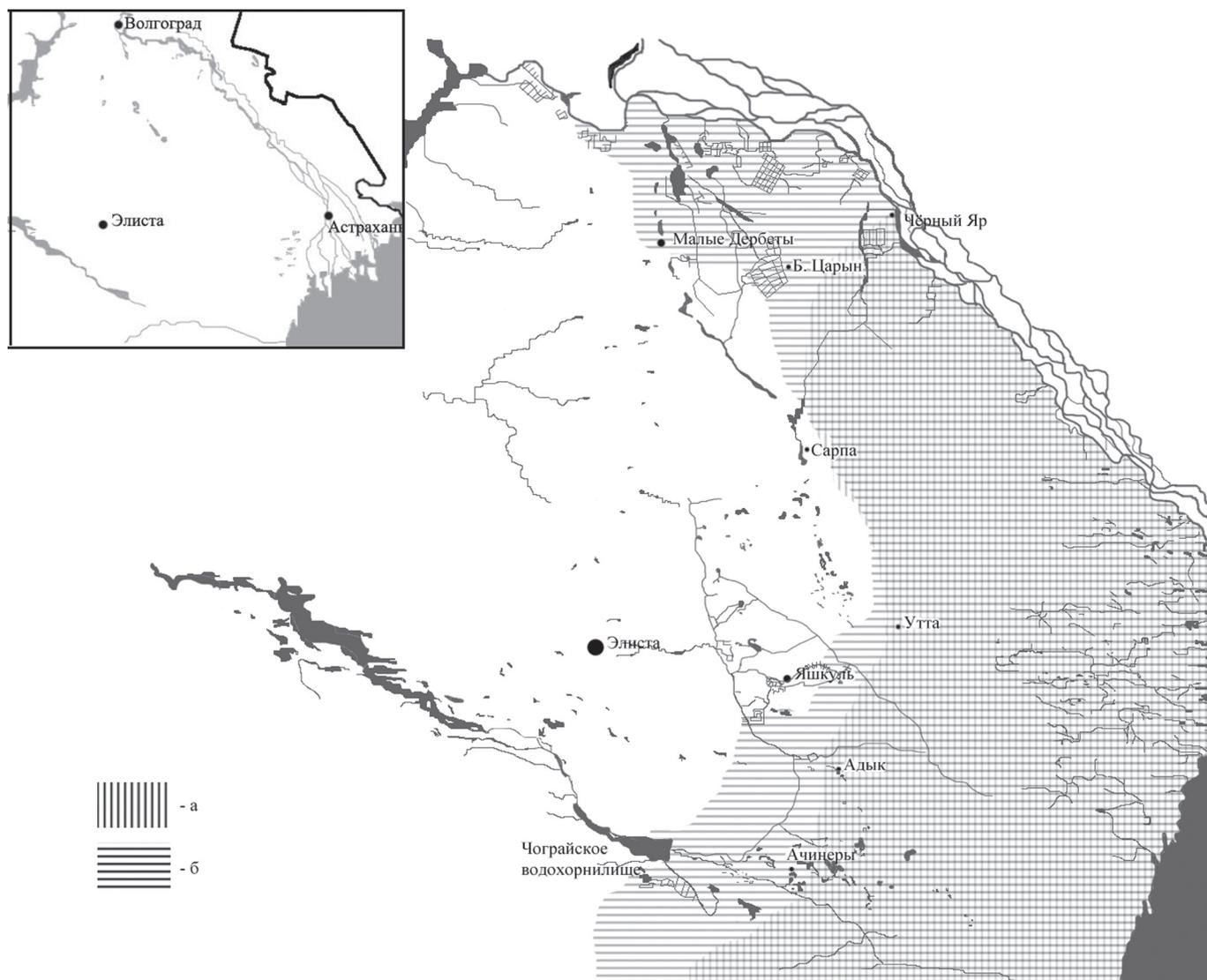
### Результаты и обсуждения

В результате выполненных исследований установлено, что современное расширение западных границ ареала тамарисковой песчанки на террито-

рии Республики Калмыкия обусловлено совместным влиянием антропогенных и климатических факторов. При этом в период 1950–2008 гг. различные формы антропогенной трансформации (распашка, перевыпас, пескозакрепительные работы, ирригация и орошение земель) первичных степных и полупустынных биоценологических комплексов неизменно оказывали благоприятное воздействие на состояние популяций малых песчанок на территории Прикаспийской низменности [3, 6, 11]. В последнее десятилетие вследствие современного потепления климата на территории Республики Калмыкия отмечено повышение средних температур зимних месяцев до +1,2 °С, с -0,83 °С за период 1950–1970 гг., что привело к снижению средней величины снежного покрова и увеличению длительности бесснежного периода. Увеличение частоты малоснежных, относительно теплых зим, особенно благоприятно отразилось на состоянии популяций тамарисковой песчанки в восточных и южных районах Республики Калмыкия, создав тем самым определенные предпосылки для начала продвижения этого вида грызунов в западном направлении. Причем начало расселения тамарисковых песчанок за границы своего исторического ареала совпало во времени с расширением границ полупустынной и пустынной ландшафтно-географических зон на территории Республики Калмыкия [8].

В 50-х гг. прошлого столетия на территории Республики Калмыкия западная граница ареала тамарисковой песчанки, по данным А.Н.Павлова [14], пролегла по условной линии Черный Яр – Ачинеры. Активное расселение *M. tamariscinus* из оптимальной части своего ареала началось в 1972 г., когда на всей территории Прикаспийской низменности отмечен значительный рост численности и площади поселений этого вида [3, 11]. Согласно результатам выполненного анализа архивных материалов в этот же период началось расселение *M. tamariscinus* на территории Сарпинской низменности и в правобережных районах Волги. Дальнейший анализ картографических материалов, характеризующих территориальное распределение мест отловов тамарисковых песчанок в период 1987–2007 гг. показал, что западная граница ареала этого вида грызунов на территории Калмыкии значительно изменилась. В частности, на севере Республики Калмыкия западная граница распространения тамарисковой песчанки продвинулась примерно на 120 км, охватив практически всю территорию Сарпинской низменности и северную часть Ергенинской возвышенности, вплоть до н.п. Червленого (Светлоярский район Волгоградской области). На юге Калмыкии продвижение оказалось не столь значительным и составило около 60 км. Подчеркнем, что на юге Республики Калмыкия расширение западной границы тамарисковой песчанки в последние 50–60 лет так же, как и в северной ее части, полностью совпадает с зоной ирригации и орошения (рисунок).

Следует особо подчеркнуть, что на фоне ак-



Распространение *Meriones tamariscinus* на территории Калмыкии по данным 1959 и 2007 годов:

а – ареал тамарисковых песчанок 1959 г. по А.Н.Павлову,

б – ареал тамарисковых песчанок 2007 г.

тивного расселения в 1972–2007 гг. тамарисковой песчанки в северных и южных районах Республики Калмыкия, в центральной ее части границы ареала этого вида за последние 50–60 лет практически не изменились. Последнее позволяет считать, что современная западная экспансия тамарисковой песчанки на территории Республики Калмыкия обусловлена, в основном, именно антропогенными факторами, в первую очередь комплексным влиянием ирригации и орошения земель (возникновение интразональных биотопов, появление кустарников, повышение влажности почвогрунтов и др.).

Вполне очевидно, что вплоть до настоящего времени, созданная сеть оросительных каналов, равно как и прилегающие, как правило, к ним бахчи, огороды, залежи и прочие поливные угодья продолжают играть роль своеобразных экологических желобов для расселения малых песчанок в условиях антропогенных ландшафтов. Однако, несмотря на

широкое современное распространение поселений тамарисковой и полуденной песчанок на территории Республики Калмыкия, для каждого из этих двух видов грызунов характерно обитание в относительно узком спектре природных биотопов [13]. Причем тамарисковая песчанка как влаголюбивый вид постоянно тяготеет к относительно мезофильным местообитаниям с сочной растительностью [7]. Высокая потребность тамарисковых песчанок во влажном корме связана со спецификой пищеварения: оптимальным для функционирования желудка является уровень влажности корма в 60 %, что вынуждает песчанок питаться зелеными частями растений [15]. С нашей точки зрения, именно поэтому в южных районах Республики Калмыкия в границах территорий, расположенных западнее Черноземельского магистрального канала, где отсутствует развитая гидромелиоративная сеть, *M. tamariscinus* не находит благоприятных условий существования. Соответственно,

значительно большая площадь орошаемых земель и более развитая сеть ирригационных сооружений в северной части Республики Калмыкия целиком предопределили потенциальные границы современного распространения тамарисковой песчанки на территории Сарпинской низменности. Более того, в настоящее время началось расселение этого вида в зоне орошаемых земель на юге Волгоградской области (Светлоярский район).

В настоящее время, как и ранее [13, 14], на территории Республики Калмыкия поселения *M. tamariscinus* не отмечены на участках с солончаково-луговой и лугово-болотной растительностью (разливы, лиманы, саги, высыхающие озера), широко распространенных в ложине Даван. С нашей точки зрения, именно высокая степень засоленности почв ложины Даван служит основным ограничительным фактором для расселения тамарисковой песчанки в центральной части Республики Калмыкия. Подчеркнем, что в период выпадения осадков широко распространенные в ложине Даван различные формы понижений рельефа оказываются подтопленными и фактически превращаются в болотистые равнины. В летний период их поверхность покрыта твердой глинистой коркой. Для подобных мест характерно отсутствие нор не только малых песчанок, но и прочих грызунов. Тамарисковая песчанка обычна в мелкобугристых, полужакрепленных и закрепленных песках, зарослях кустарников, бурьянистой растительности, тростника на валах каналов, в поймах различных водотоков, садах, лесополосах. Хотя встречается и на участках полынно-злаковой песчаной степи. Вблизи заселенных зверьками природных биотопов этот вид отмечен в хозяйственных постройках человека, скирдах. При этом исторически наиболее устойчивые и многочисленные поселения тамарисковой песчанки приурочены к заросшим песчаным массивам. Современные показатели численности *M. tamariscinus* в разных местообитаниях колеблются в значительных пределах – от единичных до нескольких десятков особей на гектар. Причем в северо-западной части территории Черных земель тамарисковая песчанка значительно уступает по численности полуденной. Напротив, в Приморье в совместных поселениях малых песчанок тамарисковая повсеместно занимает доминирующее положение так же, как и на юге Черных земель.

Следует особо подчеркнуть, что современное расширение западной границы ареала тамарисковой песчанки в северных и южных районах Республики Калмыкия влечет за собой негативные эпизоотологические и эпидемиологические последствия. Появление в зонах интенсивной хозяйственной деятельности человека на территории Сарпинской низменности, Северных Ергеней, Черных Земель и Кумо-Маньчской впадины нового высокочувствительного к чумному микробу носителя этой инфекции может привести к значительному увеличению эпидемического потенциала этих территорий. Особую

эпидемическую опасность представляет расселение тамарисковой песчанки в густонаселенные районы Калмыкии (Северные Ергени) и южные районы Волгоградской области. Тем более, что в настоящее время отчетливо проявилась тенденция дальнейшего усложнения паразитарной системы Прикаспийского Северо-Западного природного очага чумы за счет расширения границ ареала активных переносчиков чумного микроба, в первую очередь блох *Xenopsylla conformis* (Черные Земли, Кумо-Маньчская впадина и др.). Рост потенциальной эпидемической опасности в зонах действия Черноземельской и Сарпинской оросительно-обводнительных систем также связан с доминирующим положением в многовидовых сообществах грызунов синантропного вида – домовая мышь [6]. Все это в целом создает реальную угрозу возникновения здесь эпизоотий чумы в смешанных поселениях малых песчанок и мышевидных грызунов с последующим заносом чумного микроба в жилье человека.

В связи с коренным изменением структуры паразитарных систем в северной и юго-восточной частях Прикаспийского Северо-Западного степного природного очага (депрессия численности малого суслика, расселение тамарисковой песчанки и блох *X. conformis* и др.) возникла необходимость пересмотра сложившейся тактики эпизоотологического обследования принятой для очагов сусликового типа. Следует отнести все проблемные территории (зоны ирригации и орошения Республики Калмыкия, Республики Дагестан, Ставропольского края, Волгоградской и Астраханской области) к Прикаспийскому песчаному очагу чумы. Современную трансформацию биоценологических комплексов в регионе Северо-Западного Прикаспия следует рассматривать как подтверждение прогноза [12] на дальнейшее расширение западных границ Прикаспийского песчаного очага чумы в условиях современного потепления климата. С целью минимизации возможных негативных эпидемических последствий современной тенденции трансформации пространственной и биоценологической структуры природных очагов чумы на территории Республики Калмыкия следует значительно усилить мониторинг популяций синантропных видов грызунов (домовая мышь, серая крыса) в зонах орошаемого земледелия, увеличить объемы профилактических мероприятий в расположенных здесь населенных пунктах.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бананова В.Д. Растительный мир Калмыкии. Элиста; 1977. С 142.
2. Зонн С.В. Опустынивание природных ресурсов антропогенного производства Калмыкии за последние 70 лет и меры борьбы с ним. Биота и природная среда Калмыкии. Москва-Элиста; 1995. С. 19–52.
3. Калабухов Н.И., Пряхин В.А. Некоторые эколого-физиологические особенности песчанок: гребенщиковой (*Meriones tamariscinus* Pall) и полуденной (*M. meridianus* Pall). Зоол. журн. 1954; 33(4):889–902.
4. Князева Т.В., Кузнецов А.А., Матросов А.Н. и др. // Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих-переносчиков возбудителей природно-очаговых

инфекций. МУ 3.1.1027-01. М.: Минздрав России; 2002. С. 55.

5. Корнеев Г.А., Тарасов М.А., Кузнецов А.А. и др. // Отлов, учет и прогноз численности мелких млекопитающих и птиц в природных очагах инфекций. МУ 3.1.1029-01. М.: Минздрав России; 2002. С. 71.

6. Магомедов М.Р.Д., Ахтаев М.-Х.Р. Зависимость питания и состояние популяции гребенщиковой песчанки (*Meriones tamariscinus*) от динамики кормовых ресурсов. Зоол. журн. 1993; 72(2):101–110.

7. Павлов А.Н. К вопросу о распространении полуденных и гребенщиковой песчанок на правом берегу реки Волги. Труды Ростовского-на Д. НИПЧИ. Сталинград; 1959; XIV:235–43.

8. Попов Н.В., Удовиков А.И., Яковлев С.А., и др. Оценка влияния роли современного потепления климата на формировании нового природного очага чумы песчаночье типа на территории европейского Юго-Востока России. Поволжский экологический журнал. 2007; 1:55–64.

9. Попов Н.В., Корнев Г.А., Санджиев В.Б.-Х. Эколого-эпизоотологические последствия ирригации и орошения Нижнего Поволжья. РЭТ-инфо. 2000; 3:21–2.

10. Ралль Ю.М. Очерк экологии гребенщиковой песчанки *Meriones tamariscinus* Call. Грызуны и борьба с ними. Саратов; 1941; 1:179–207.

11. Сувернева Э.А., Тихомиров Э.Л., Тихомирова Н.И. // Распространение песчанок и их блох на территории Северо-Западного Прикаспия в 1970–1988 гг. Эпизоотология и профилактика особо опасных инфекций в антропогенных ландшафтах. Саратов, 1990. С. 74–80.

12. Тихомиров Э.Л. Особенности проявления эпизоотий чумы в условиях антропогенной трансформации ландшафтов (на примере Прикаспийского Песчаного очага чумы) [дис. ... канд. биол. наук]. Саратов; 1991. 133 с.

13. Удовиков А.И., Санджиев В.Б.-Х., Толоконникова С.И., и др. Динамика численности малого суслика в регионе Северо-Западного Прикаспия в XX столетии и факторы, ее определяющие. Биоресурсы и биоразнообразие экосистем Поволжья.

Саратов; 2005. С 195–7.

14. Шилова С.А., Чабовский А.В., Неронов В.В. Экономические перестройки и природные очаги инфекции. РЭТ-инфо. 2004; 1:8–10.

15. Яковлев С.А. Эпизоотологические последствия орошения Прикаспийской низменности [дис. ... канд. биол. наук]. Саратов; 1996. 118 с.

S.A. Yakovlev, G.V. Sangadzhieva, A.I. Udovikov, V.B.-H. Sandzhiev, V.P. Ossipov, V.V. Dikanskaya, N.V. Popov

#### Assessment of the Influence of Irrigation and Watering on the Changing of the Western Boundary of Tamarisk Gerbil *Meriones Tamariscinus Pallas, 1773 (Rodentia, Cricetidae)* Natural Habitat in the Territory of the Republic of Kalmykia

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

The modern boundaries of distribution of tamarisk gerbil – *Meriones Tamariscinus (Pallas, 1773)* were determined in the territory of the republic of Kalmykia. Shown was the role of irrigation and watering of the land in the expansion of its natural habitat to the north and north-west. Epizootiologic and epidemiologic consequences of tamarisk gerbil settling in the territory of Pre-Caspian North-Western steppe natural focus of plague were considered. The tendency of formation of the integrated plague natural focus of the gerbil type in the North-Western Pre-Caspian region and Ciscaucasia was confirmed.

*Key words:* tamarisk gerbil, house mouse, irrigation and watering of the land, natural habitat changing, biocenotic structure of the plague natural focus, epizootiologic consequences.

Поступила 04.05.08.

## МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК 616.932+616.981.48

И.М.Крепостнова, Л.Ф.Ливанова, С.А.Бугоркова,  
Н.И.Смирнова

### ИЗУЧЕНИЕ ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ СКОНСТРУИРОВАННОГО РЕКОМБИНАНТНОГО ДИПЛАЗМИДНОГО ШТАММА *VIBRIO CHOLERAЕ* СЕРОГРУППЫ O139, ПРОДУЦИРУЮЩЕГО В-СУБЪЕДИНИЦУ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА И ФАКТОР КОЛОНИЗАЦИИ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ CFA/I

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

Показано, что сконструированный авирулентный диплазмидный штамм *Vibrio cholerae* KM182, продуцирующий В-субъединицу холерного токсина и фактор колонизации кишечной палочки CFA/I (обеспечивающих формирование антитоксического и антиколонизирующего иммунитета соответственно), способен защищать иммунизированных модельных лабораторных животных от экспериментальной холеры, вызванной вирулентным штаммом холерного вибриона O139 серогруппы. Определены оптимальные иммунизирующие и заражающие дозы.

*Ключевые слова:* *Vibrio cholerae* O139 серогруппы, плаزمид, метод RITARD, В-субъединица холерного токсина, фактор колонизации CFA/I.

Эпидемически опасные штаммы холерного вибриона относятся к двум серогруппам – O1 (*Vibrio cholerae* классический и эльтор биовар) и O139 (*V. cholerae* O139 с синонимом Бенгал). Вспышки холеры, впервые вызванные в 1992 г. возбудителем *V. cholerae* O139 серогруппы в Индии и Бангладеш (бенгальская холера), продолжают регистрироваться в ряде регионов Юго-Восточной Азии (Киргизия, Узбекистан, Казахстан, Гонконг, Япония и др.) и в не-

которых странах Европы (Германия, Великобритания, Дания, Франция и др.) [4, 6, 7, 9, 12]. Что касается Российской Федерации, то в последнее десятилетие продолжает существовать проблема неконтролируемой миграции и пребывания на территории страны иностранных граждан и лиц без гражданства, что обеспечивает реальную возможность завоза бенгальской холеры на ее территорию [3]. Между тем до сих пор отсутствуют отечественные живые безопасные

и эффективные вакцины против возбудителя холеры новой серогруппы, способные индуцировать напряженный и длительный иммунитет у населения всех возрастных групп [11]. Такая ситуация обусловила конструирование нами авирулентного штамма холерного вибриона O139 серогруппы с высокой продукцией основных протективных антигенов – В-субъединицы холерного токсина и фактора колонизации энтеротоксигенных штаммов кишечной палочки CFA/I, обеспечивающих формирование анти-токсического и антиколонизирующего иммунитета соответственно.

В качестве носителя генов протективных антигенов нами был использован авирулентный, выделенный из воды штамм *V. cholerae* 170 серогруппы O139, геном которого, по данным полимеразной цепной реакции (ПЦР), лишен основных генов вирулентности [5]. В клетки этого штамма с помощью конъюгационных скрещиваний последовательно были введены конъюгативные рекомбинантные плазмиды pIEM3, содержащая клонированный ген *ctxB*, кодирующий продукцию иммуногенной В-субъединицы холерного токсина, и несущая ген резистентности к тетрациклину Tc<sup>r</sup> и канамицину Km<sup>r</sup> [2], и pCFAI. Плазида pCFAI содержит клонированный ген *cfal*, контролирующий биосинтез основного фактора колонизации CFA/I патогенных для человека штаммов кишечной палочки и ген резистентности к триметоприму Tr<sup>r</sup> [10]. Было установлено, что введенные в состав плазмид клонированные гомо- и гетерологичные гены *ctxB* и *cfal* в условиях *in vitro* и *in vivo* стабильно наследовались и обеспечивали эффективную продукцию двух основных защитных антигенов.

Цель работы – определение протективных свойств сконструированного нами диплазмидного штамма, обозначенного как *V. cholerae* KM182 (pIEM3)(pCFAI).

### Материалы и методы

Протективные свойства штамма *V. cholerae* KM182 определяли на модели взрослых кроликов породы «шиншилла», иммунизированных внутрижелудочно этим штаммом, с последующим заражением их вирулентным штаммом с помощью RITARD (removable intestinal tie-adult rabbit diarrhea) – техники. Метод RITARD основан на внутрикишечном заражении вирулентными штаммами *V. cholerae* взрослых кроликов [13] с предварительным наложением особой скользящей временной лигатуры на подвздошную кишку в области мезоаппендикса на срок, необходимый для адгезии и ранней колонизации тонкого кишечника холерными вибрионами, и последующего мониторинга инфекционного процесса в течение 5 суток. При этом регистрировали клинические признаки экспериментальной холеры: диарея (наличие жидких каловых масс, их цвет). Ежедневно осуществляли забор ректального мате-

риала с последующим высевом на 1 % пептонную воду и щелочной агар.

Внутрижелудочную иммунизацию осуществляли трехкратно с интервалом в 21 день взрослым кроликам массой 2,5–3 кг живыми клетками изучаемого штамма. Клетки вводили по методу Craу с соавт. [8], используя желудочный зонд. Для нейтрализации кислого содержимого желудка было введено (с помощью желудочного зонда) 15 мл 5 % раствора гидрокарбоната натрия с интервалом в 15 мин. Иммунизирующие дозы составляли 10<sup>9</sup> м.к. и 5·10<sup>10</sup> м.к. в 1 мл бульона LB (таблица).

На 14-е сутки после последней иммунизации кроликов заражали вирулентным штаммом. Контролем служили 2 интактных животных, зараженных аналогичным образом. Патолого-анатомические исследования как опытных, так и контрольных животных проводили по мере их гибели и после умерщвления их хлороформом по истечении 5 сут. Оценивали изменения внутренних органов по состоянию кровенаполнения сосудов, наличие признаков дистрофии. В желудочно-кишечном тракте описывали состояние сосудов, степень наполнения кишечника содержимым, определяли его цвет, характер и объем. Для гистологических исследований брали кусочки внутренних органов – сердце, легкие, печень, селезенку, почки с надпочечником, мезентериальные лимфатические узлы и 3 отрезка тонкого и толстого кишечника, которые фиксировали в 10 % водном растворе формалина. После фиксированные кусочки внутренних органов изучали по общепринятой схеме [1].

### Результаты и обсуждение

Для изучения протективных свойств штамма *V. cholerae* KM182(pIEM3)(pCFAI) O139 серогруппы, содержащего антигены, обеспечивающие анти-бактериальный (O139 соматический антиген и полисахаридная капсула), антитоксический (В-субъединица холерного токсина), антиколонизирующий (фактор колонизации кишечной палочки CFA/I) иммунитет, взрослые кролики были проиммунизированы внутрижелудочно в дозах, указанных в таблице. В качестве контроля были использованы интактные кролики.

Интактные кролики, зараженные по методу

Дозы заражения и иммунизации, используемые для изучения протективных свойств потенциально вакцинного штамма *V. cholerae* KM182

№ группы	Доза иммунизации, м.к.	Доза заражения, м.к.	% выживших животных	Клиническое проявление инфекционного процесса
Контроль	0	10 <sup>9</sup>	0	++++
1	10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>	100	-
2	10 <sup>9</sup>	10 <sup>9</sup>	50	-
3	5·10 <sup>10</sup>	10 <sup>8</sup>	100	-
4	5·10 <sup>10</sup>	10 <sup>9</sup>	50	-

RITARD токсигенным штаммом *V. cholerae* P16064 в дозе  $10^9$  м.к., пали в течение 24 ч после заражения с характерной для холерной инфекции патоморфологической картиной острой диареи с последующим высевом чистой культуры холерного вибриона. При гистологических исследованиях обнаружены дистрофические изменения органов, гемодинамические нарушения в виде различной степени выраженности полнокровия сосудов, в почках значительные поля некротического нефроза, в кишечнике выраженный катар.

Иммунные кролики через 14 дней после последней иммунизации были заражены по методу RITARD вирулентным штаммом *V. cholerae* P16064 O139 серогруппы в дозах  $10^8$  м.к. и  $10^9$  м.к. Все выжившие кролики (срок наблюдения 5 дней) были умерщвлены хлороформом.

В зависимости от иммунизирующей и заражающей доз все опытные животные были поделены на 4 экспериментальные группы (всего 8 животных).

Животные 1-й и 3-й опытных групп доживали до 5-х суток в 100 % случаев. У этих животных были обнаружены минимальные гемодинамические расстройства в виде незначительного полнокровия сосудов паренхиматозных органов и серозной оболочки тонкого кишечника. В тонком кишечнике содержалось небольшое количество серозно-слизистого содержимого желтого или желтовато-зеленоватого цвета. В толстом кишечнике было обычное содержимое. При гистологических исследованиях у животных этих групп регистрировали признаки умеренного функционального напряжения паренхиматозных элементов внутренних органов (печень, миокард) и незначительное очаговое полнокровие сосудов. Хотя у животных 3-й группы наблюдали на фоне полнокровия сосудов коры и мозгового вещества почек очаги некронефроза, умеренное полнокровие капиллярных клубочков, усиление клеточности ряда клубочков. В кишечнике отмечены относительно минимальные доброкачественные изменения: умеренная очаговая гидропическая дистрофия эпителия, незначительное очаговое полнокровие сосудов подслизистой оболочки, небольшие циркуляторные нарушения – умеренный очаговый отек подслизистой оболочки. Наблюдалось увеличение количества МЭЛ (межэпителиальных лимфоцитов) в тонком кишечнике с признаками их активации, усиление гиперпластической реакции в строме ворсин и собственной пластинки слизистой за счет увеличения количества лимфоцитов и плазматических клеток, появление бластических элементов. Такого рода изменения больше были выражены у животных 3-й группы. У животных этих групп отмечены достаточно четкие признаки вторичного иммунного ответа со стороны периферических органов иммунной системы, обычно в лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником. Наблюдалась гиперплазия клеток в периартериальных муфтах селезенки

с накоплением значительного числа бластических элементов в этих зонах (Т-зонах). В светлых центрах фолликулов и мозговых тяжах лимфатических узлов, зародышевых центрах и маргинальных зонах мальпигиевых телец селезенки чуть в меньшей степени регистрировали гиперпластические процессы и усиление митотической активности (В-зоны). Образование крупных светлых центров в фолликулах лимфоидных органов у животных 3-й группы отражало формирование наиболее полноценной иммунной реакции. В лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником (пейеровы бляшки), наблюдали активацию Т- и В- зон, накопление плазматических клеток и плазмобластов в купольной части лимфоидных образований. Все эти показатели показывают на достаточно высокую активность лимфоидных органов, даже с признаками некоторой гиперактивации, что можно объяснить завышенной дозой иммунизации.

Во 2-й и 4-й группах выжило 50 % кроликов. У выживших животных отмечали умеренную инъекцию сосудов серозной оболочки тонкого кишечника, регистрировали наличие незначительного объема серозно-слизистого желтоватого содержимого в верхних отделах тонкого кишечника и несколько в большом объеме слизистого желтовато-зеленоватого содержимого в нижних отделах тонкого кишечника. В толстом кишечнике кашицеобразное содержимое коричневого цвета. Умеренное полнокровие коркового вещества почек.

При гистологическом исследовании внутренних органов у животных этих групп отмечали достаточно выраженные признаки вторичного иммунного ответа, Т-зоны в селезенке и мезентериальных лимфатических узлах широкие плотные, с признаками активации (усиления митотической активности).

У животных 2-й группы у 50 % (павшие) наблюдался умеренный катар тонкого кишечника с наполнением жидкостью серозной слизи желтого цвета, в нижнем отделе скопление газа и кашицы только у павших животных. У выживших в течение 5 сут зараженных кроликов не наблюдалось изменений со стороны внутренних органов. Гистологические изменения наблюдали только у павших животных. У выживших животных не выявлены признаки специфического инфекционного воспаления. Обнаружено умеренное проявление активности в периферических лимфоидных органах, умеренное функциональное напряжение со стороны внутренних органов. Выжившие животные 4-й группы не имели макроскопических изменений внутренних органов.

Таким образом, сконструированный авирулентный штамм *V. cholerae* KM182 обладал достаточной протективностью. Оптимальная доза иммунизации, защищающая лабораторных животных от развития инфекционного процесса при заражении их высоковирулентным штаммом *V. cholerae* P16064 в дозе  $10^8$ , составила  $10^9$  м.к./мл.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. М.: Медицина; 1982.  
 2. Ильина Т.С., Смирнов Г.Б., Смирнова Н.И. и др. Рекombинантная плазмидная ДНК, кодирующая синтез В-субъединицы холерного токсина, способ ее конструирования и штамм бактерий *Vibrio cholerae* продуцент В-субъединицы холерного токсина. АС № 1505022 от 18.09.87.  
 3. Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Безмертный В.Е. и др. Холера в мире, странах СНГ и России: эпидемиологическая обстановка (1998–2007 г.) Холера и патогенные для человека вибрионы. Сб. матер. пробл. комиссии. Ростов н/Д, 2008; 21:13–6.  
 4. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Федоров Ю.М., Подосинникова Л.С., Горобец А.В. Холера в начале XXI века. Прогноз. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005; 3:44–8.  
 5. Осин А.В., Ливанова Л.Ф., Ерошенко Г.А., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Изучение особенностей наследования и экспрессии рекombинантной плазмиды с клонированными генами холерного токсина в авирулентном штамме. Холера и патогенные для человека вибрионы. Сб. матер. пробл. комиссии. Ростов н/Д, 2002; 15:103–6.  
 6. Alam M., Hasan N.A., Sadique A., Bhuiyan N.A., Ahmed K.U., Nusrin S. et al. Seasonal cholerae caused by *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 in the coastal aquatic environment of Bangladesh. Appl. Environ. Microbiol. 2006; 72(6):4096–104.  
 7. Albert M.J., Siddique A.K., Islam M.S. Large outbreak of clinical cholerae due to *Vibrio cholerae* non-O1 in Bangladesh. Lancet. 1993; 341:704.  
 8. Cray W.C., Tokunaga E., Pierson N.F. Successful colonization and immunization of adult rabbits by oral inoculation with *Vibrio cholerae* O1. Infect. Immun. 1983; 41(20):735–41.  
 9. Faruque S.M., Chowdhury N., Kamruzzaman M., Shafi Ahmad O., Faruque A.S.G., Salam M.A. et al. Emerg. Infect. Dis. 2003; 9(9):1116–22.  
 10. Evans D.G., Evans D.J., Clegg S., Pauley J.A. Purification and characterization of the CFA1 antigen of enterotoxigenic

*Escherichia coli*. Infect. Immun. 1979; 25(2):738–48.  
 11. Ledon T., Valle E., Valmaseda T., Faruque A.S.G., Ansaruzzaman M., Faruque S.M. et al. Construction and characterization of O139 cholera vaccine candidates. Vaccine 2003; 21(11–12):1282–91.  
 12. Outbreak verification list. 27. WHO. Geneva, Switzerland 2005.  
 13. Spira W.M., Sack R.B., Froelich J.F. Simple adult rabbit model for *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea. Infect. Immun. 1981; 32:739–47.

I.M.Krepostnova, L.F.Livanova, S.A.Bugorkova,  
N.I.Smirnova

**Investigation of Protective Properties of the Constructed Recombinant Biplasmid Strain of *Vibrio cholerae* O139 Serogroup Producing Cholera Toxin B Subunit and *Escherichia coli* Colonization Factor CFA/1**

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe",  
Saratov

The constructed avirulent biplasmid *Vibrio cholerae* strain KM182 producing cholera toxin B subunit and *Escherichia coli* colonization factor CFA/1 (providing for antitoxic and anti-colonization immunity formation, correspondently) was demonstrated to protect immunized model laboratory animals from experimental cholera caused by the virulent *Vibrio cholerae* O139 strain. The optimal doses for immunization and challenging were determined.

**Key words:** *Vibrio cholerae* O139 Serogroup, plasmid, RITARD method, cholera toxin B subunit, colonization factor CFA/1.

Поступила 10.07.08.

УДК 616.981.452:575

Л.М.Куклева, Г.А.Ерошенко, В.Е.Куклев, Я.М.Краснов, Н.П.Гусева, Г.Н.Одинокоев, В.В.Кутырев

**СРАВНЕНИЕ ПОЛНОЙ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГЕНА *rhaS* У ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ ОСНОВНОГО И НЕОСНОВНЫХ ПОДВИДОВ**

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

Определена полная нуклеотидная последовательность гена *rhaS* – регуляторного гена *rha* локуса хромосомы у штаммов *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов, а также у *Y. pseudotuberculosis* I–III сероваров. Установлено наличие в гене *rhaS* значимых и несущественных нуклеотидных замен, которые, по-видимому, являются причиной различной способности к ферментации рамнозы у штаммов возбудителя чумы (основного и неосновных подвидов) и псевдотуберкулеза.

**Ключевые слова:** возбудитель чумы, основной и неосновные подвиды *Y. pestis*, ферментация рамнозы, нуклеотидная последовательность.

Ферментация рамнозы является одним из важнейших диагностических признаков, позволяющих дифференцировать возбудителей чумы и псевдотуберкулеза. *Yersinia pseudotuberculosis* активно использует этот углевод в качестве источника углерода и энергии, тогда как штаммы основного подвида *Y. pestis* не способны к ферментации рамнозы [1, 5]. Штаммы неосновных подвидов чумного микроба, занимающие промежуточное положение между основным подвидом *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, способны ферментировать рамнозу, хотя выраженность этого признака у разных подвидов варьирует. Так, штаммы кавказского и алтайского подвидов активно ферментируют рамнозу в первые 24–48 ч от начала культивирования, а штаммы улэгейского подвида – в более поздние сроки через (48–96 ч)

[3]. Для штаммов гиссарского подвида отмечена изменчивость сроков проявления этого признака (от 1–2 сут до ее полного отсутствия) [4]. Причины столь существенных различий в проявлении способности к ферментации рамнозы у штаммов основного и неосновных подвидов остаются к настоящему моменту невыясненными. Устойчивое отсутствие этого признака у штаммов основного подвида *Y. pestis* свидетельствует о наличии генетического дефекта в генах локуса *rha*, кодирующего ферменты утилизации рамнозы.

L-рамноза (метилпентоза) утилизируется бактериальными клетками с помощью группы ферментов, синтез которых детерминируется генами, расположенными в *rha* локусе. Строение рамнозного регулона подробно изучено на модели кишечной палочки.

Установлено наличие четырех структурных генов: *rhaA*, кодирующего рамнозоизомеразу, *rhaB* – рамнулокиназу, *rhaD* – рамнулозо-1-фосфат-альдолазу [8] и *rhaT*, детерминирующий транспортный белок для рамнозы [7]. Регуляцию функционирования *rha* локуса осуществляют продукты генов *rhaR* и *rhaS*. Продукт гена *rhaR* при наличии в среде рамнозы активирует транскрипцию оперона *rhaSR*, далее RhaS активирует транскрипцию генов *rhaBAD*, кодирующих ферменты катаболизма L-рамнозы и *rhaT* – транспортного белка для L-рамнозы – RhaT [6]. Аминокислотные последовательности белков RhaS и RhaR совпадают на 30 %, и оба этих фермента являются членами семейства активаторов транскрипции – AraC/XylS [10].

Проведенный нами математический анализ генов *rha* локуса возбудителей чумы и псевдотуберкулеза на основе полных нуклеотидных последовательностей геномов 6 штаммов возбудителя чумы и 2 штаммов псевдотуберкулезного микроба, представленных в базе данных NCBI GenBank, показал полное совпадение строения *rha* локуса у возбудителя чумы и кишечной палочки и выявил наличие у чумного микроба генов *rhaA, B, D, R, S* и *T*.

По результатам математического анализа наибольшей вариабельностью структуры у возбудителя чумы по сравнению с псевдотуберкулезным микробом обладает ген *rhaS*, что позволяет предположить, что изменение нуклеотидной последовательности

именно этого гена является причиной различного отношения к рамнозе у штаммов основного и неосновных подвидов *Y. pestis*. Результаты математического анализа, а также предварительные собственные экспериментальные данные свидетельствуют об отсутствии различий в нуклеотидной последовательности генов *rhaA, rhaB* и *rhaR* у изученных нами штаммов чумного микроба (основного и неосновных подвидов), а также возбудителя псевдотуберкулеза (данные готовятся к публикации). В структурном гене пермеазы – *rhaT* математический анализ отличий не выявил.

Для выяснения причин различной ферментативной активности в отношении рамнозы нами было проведено секвенирование гена *rhaS* у штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвидов, а также изучена возможность использования выявленных различий в нуклеотидной последовательности гена *rhaS* для генетической дифференциации этих подвидов.

### Материалы и методы

**Бактериальные штаммы.** В работе использовано 15 типичных штаммов *Y. pestis* основного, алтайского, кавказского, улэгейского и гиссарского подвидов, таласской группы, выделенных в различных природных очагах России и сопредельных государств, а также 3 штамма возбудителя псевдотуберкулеза I–III сероваров (табл. 1). Штаммы по-

Таблица 1

Характеристика использованных штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*

Штаммы	Подвид/серовар	Время и место выделения (природный очаг)	Источник выделения	Ферментация рамнозы, сут
<i>Yersinia pestis</i>				
M-231	Основной	1947, Аксайский	Серый сурик	-
A-161	"	1962, Устюртский	Блохи большой песчанки	-
A-1836	"	1988, Сарыджасский	Серый сурик	-
M-519	"	1977, Копетдагский	Большая песчанка	-
A-1793	"	1978, Зауральский	Малый суслик	-
1146	Кавказский	1962, Зангезуро-Карабахский	Обыкновенная полевка	1
818	"	1968, Приараксинский	Блохи гнезда обыкновенной полевки	1
A-1728	Гиссарский	1972, Гиссарский	Арчовая полевка	2
A-1249	"	1970, Гиссарский	Арчовая полевка	2
И-2998	Алтайский	1982, Алтайский горный	Монгольская пищуха	1
И-2359	"	1973, Алтайский горный	Блохи гнезда монгольской пищухи	1
И-3069	Улэгейский	1982, МНР, Убурхангай	Полевка Брандта	2
И-3131	"	1984, МНР, Южно-Гобийский аймак	Монгольская пищуха	2
A-1802	Таласский	1980, Таласский хребет, Киргизия	Блохи	2
A-1815	"	1980, Таласский хребет, Киргизия	Блохи мыши-полевки	2
<i>Y. pseudotuberculosis</i>				
I	I	Получен из института Пастера (Франция)	Коллекция Г.Моляре	1
III	III	Получен из института Пастера (Франция)	Коллекция Г.Моляре	1
312	I	1973, Владивосток	Больной дальневосточной скарлатиноподобной лихорадкой	1

лучены из Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб», где они хранились в лиофильно высушенном состоянии. Культивирование штаммов и изучение их биохимической активности проводили в соответствии с рекомендациями, изложенными в Руководстве по профилактике чумы [2].

*Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности регуляторного гена rhaS* проводили с использованием баз данных NCBI GenBank у штаммов *Y. pestis* KIM (биовар *medievalis*), CO92 (биовар *orientalis*), Nepal156 и Antiqua (биовар *antiqua*), Pestoides F (по отечественной классификации – кавказский подвид) и *Y. pseudotuberculosis* IP32953 и IP31758.

*Конструирование праймеров и условия проведения полимеразной цепной реакции.* Для определения нуклеотидной последовательности гена *rhaS* с помощью программы Primer Express были рассчитаны праймеры, фланкирующие полную нуклеотидную последовательность указанного гена [(*rhaSc-s* (GGT TTA GTC ATC ACT GCT GC) и *rhaSc-a* (GTT CAC GCC CTT TCT TGC)]. ПЦР проводили на амплификаторе БИС-110 (ООО «БИС-Н», Россия). Реакционная смесь имела состав: 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0); 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>; по 0,2 мМ каждого из нуклеотидов dATP, dCTP, dGTP, dTTP; по 0,6 мМ каждого праймера; 5 ед. Taq ДНК-полимеразы (Бионем, Москва) и 10 нг ДНК. Температурный профиль амплификации: 1 цикл 95 °С в течение 5 мин, затем 30 циклов (95 °С – 30 с, 58 °С – 30 с, 72 °С – 1 мин) и завершающий цикл при 72 °С в течение 5 мин. В качестве матрицы в ПЦР использовали препараты тотальной ДНК штаммов *Y. pestis*. Синтез олигонуклеотидных праймеров осуществляли на автоматическом синтезаторе ДНК АСМ-800 (Биоссет, Россия) в РосНИПЧИ «Микроб». Электрофоретический анализ ПЦР-продуктов проводили в 2 % агарозном геле (Bio-Rad, США) и регистрировали в УФ-свете. Для контроля молекулярной массы использовали коммерческие маркеры GenRuler TM 50 bp DNA Ladder (МБИ Fermentas, Литва).

*Определение нуклеотидной последовательности гена rhaS* исследуемых штаммов проводили с помощью ферментативного секвенирования методом «терминаторов» [9].

Для первичной обработки данных использовали программы: «3100 Data Collection Software 1.1» и «DNA Sequencing Analysis Software 3.7». Выравнивание и сравнение полученных последовательностей проводили в программе MEGA 4. Для сравнения секвенированных нами нуклеотидных последовательностей с представленными в базе данных NCBI GenBank использовали алгоритм BLAST.

### Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования проведен сравнительный анализ нуклеотидной последовательности регуляторного гена *rhaS* штаммов *Y. pestis* KIM, CO92, Antiqua, Nepal 156, Pestoides F и *Y. pseudotu-*

*berculosis* IP32953 и IP31758, представленных в базе данных NCBI GenBank.

Представленные в международной базе данных штаммы возбудителя чумы относятся к различным биоварам основного подвида *Y. pestis* и не ферментируют рамнозу, тогда как штаммы *Y. pseudotuberculosis* способны катаболизировать этот углевод. Штаммы возбудителя псевдотуберкулеза были использованы для сравнения с возбудителем чумы, поскольку, по современным представлениям, этот микроорганизм является непосредственным предшественником чумного микроба и целый ряд генов, продукты которых участвуют в метаболических процессах, у чумного микроба повреждены в процессе эволюционного перехода к новому способу существования.

Результаты, полученные при анализе нуклеотидных последовательностей гена *rhaS* у *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*, свидетельствуют о наличии ряда нуклеотидных замен в изучаемом гене у штаммов возбудителя чумы по сравнению с псевдотуберкулезным микробом, некоторые из которых, возможно, являются причиной различной способности этих возбудителей ферментировать рамнозу.

Для выяснения причин неодинаковой ферментативной активности в отношении рамнозы у штаммов возбудителя чумы, циркулирующих на территории России и ближнего зарубежья, нами была определена полная нуклеотидная последовательность регуляторного гена *rhaS* у 5 штаммов основного подвида *Y. pestis* (Зауральский степной, Устюртский, Копетдагский пустынные, Сарыджаский и Аксайский высокогорные очаги чумы) и 10 штаммов неосновных подвидов: по 2 изолята кавказского (Зангезуро-Карабахский и Приараксинский горные), алтайского (Алтайский горный), гиссарского (Гиссарский высокогорный), улэгейского (Монголия) подвидов чумного микроба, а также 2 штамма из Таласского высокогорного очага чумы. Были изучены также 3 штамма *Y. pseudotuberculosis* I–III сероваров (табл. 1).

Результаты анализа структуры гена *rhaS*, размер которого составляет 822 п.н., свидетельствуют о том, что штаммы *Y. pseudotuberculosis* I, III, 312 (секвенированы нами), как и *Y. pseudotuberculosis* IP31758 (NCBI GenBank), содержат в позициях 416 и 495 п.н. – аденин, в отличие от штамма *Y. pseudotuberculosis* IP32953 (GenBank), у которого в этих положениях находится гуанин. В штаммах *Y. pseudotuberculosis* I и III в позициях 183 п.н. и 702 п.н. содержится тимин, тогда как в геноме штамма *Y. pseudotuberculosis* 312 и представленных в базе данных NCBI GenBank *Y. pseudotuberculosis* IP32953 и IP31758 – цитозин. Нами выявлены также уникальные нуклеотидные замены у штаммов *Y. pseudotuberculosis* 312 в позиции 789 п.н. (гуанин вместо аденина у остальных штаммов) и *Y. pseudotuberculosis* IP31758 в позиции 790 п.н. (гуанин вместо цитозина у остальных изолятов). Однако выявленные нами единичные нуклеотидные замены, очевидно, не имеют значения для проявления изучаемого свойства у возбудителя

псевдотуберкулеза, поскольку все штаммы возбудителя способны к ферментации рамнозы и, следовательно, способность катаболизировать этот углевод является видоспецифическим признаком для *Y. pseudotuberculosis*.

На следующем этапе исследования проведен сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена *rhaS* штаммов чумного микроба основного подвида (не ферментируют рамнозу) и неосновных подвигов (ферментируют рамнозу). Было установлено, что штаммы кавказского, алтайского, гиссарского, улэгейского подвигов и таласские изоляты в позиции 671 п.н. гена *rhaS* содержат гуанин. Этот же нуклеотид выявлен и у штаммов *Y. pseudotuberculosis* как представленных в базе данных NCBI GenBank, так и секвенированных нами (табл. 2). В отличие от них, у всех изученных нами штаммов основного подвида *Y. pestis* – А-1836, А-161, М-519, М-231, А-1793 (не ферментируют рамнозу), выделенных на территории России и приграничных государств, как и у штаммов,

представленных в базе данных NCBI GenBank (KIM, CO92, Nepal156, Antiqua), в позиции 671 п.н. находится аденин (табл. 2). Поскольку это единственное общее отличие между штаммами основного подвида возбудителя чумы и штаммами неосновных подвигов, а также псевдотуберкулезным микробом, то, вероятно, наличие именно этой нуклеотидной замены является причиной отсутствия способности к ферментации рамнозы у штаммов основного подвида.

Для обработки полученных результатов мы использовали программное обеспечение Mega 4, с помощью которого установлено, что выявленная нами нуклеотидная замена в положении 671 п.н. приводит к смене триплета CGC, кодирующего аминокислоту аргинин (*Y. pseudotuberculosis*, неосновные подвиды *Y. pestis*) на триплет САС, детерминирующий синтез гистидина (основной подвид *Y. pestis*). Эти аминокислоты различаются между собой по строению боковых цепей: в состав аргинина входит гидроксильная группа, тогда как молекула гистидина содержит

Таблица 2

Вариабельность гена *RhaS* (822 п.н.) у штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*

Штамм	Подвид, серовар	Положение единичных замен									
		789	790	780	702	671	494	495	482	416	183
<i>Yersinia pestis</i>											
А 1836	Основной	А	С	С	С	А	Т	А	Г	А	С
М 519	"	А	С	С	С	А	Т	А	Г	А	С
А 161	"	А	С	С	С	А	Т	А	Г	А	С
231	"	А	С	С	С	А	Т	А	Г	А	С
А1793	"	А	С	С	С	А	Т	А	Г	А	С
А-1728	Гиссарский	А	С	С	С	Г	Т	А	А	А	С
А-1249	Гиссарский	А	С	С	С	Г	Т	А	А	А	С
818	Кавказский	А	С	С	С	Г	С	А	Г	А	С
1146	Кавказский	А	С	С	С	Г	С	А	Г	А	С
И-2359	Алтайский	А	С	С	С	Г	Т	А	Г	А	С
И-2998	Алтайский	А	С	С	С	Г	Т	А	Г	А	С
И-3069	Улэгейский	А	С	С	С	Г	Т	А	Г	А	С
И-3131	Улэгейский	А	С	С	С	Г	Т	А	Г	А	С
А-1802	Таласский	А	С	С	С	Г	Т	А	Г	А	С
А-1815	Таласский	А	С	С	С	Г	Т	А	Г	А	С
Pestoides F*	Кавказский	А	С	С	С	Г	С	А	Г	А	С
CO92*	Orientalis	А	С	С	С	А	Т	А	Г	А	С
KIM*	Medievalis	А	С	С	С	А	Т	А	Г	А	С
Antiqua, Nepal 516*	Antiqua	А	С	С	С	А	Т	А	Г	А	С
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>											
III	III	А	С	С	Т	Г	С	А	Г	А	Т
I	I	А	С	С	Т	Г	С	А	Г	А	Т
312	I	Г	С	А	С	Г	С	А	Г	А	С
IP 31758**		А	Г	А	С	Г	С	А	Г	А	С
IP 32953**		А	С	С	С	Г	С	Г	Г	Г	С

\*Штаммы *Y. pestis* KIM, CO92, Nepal156, Antiqua биоваров antiqua, medievalis, orientalis, и Pestoides F. \*\*Штаммы *Y. pseudotuberculosis* IP32953 и IP31758 представлены в базе данных NCBI GenBank.

имидазольное кольцо. Возможно, что такое изменение первичной структуры молекулы регуляторного белка RhaS способно видоизменять его вторичную или третичную структуру и затруднять контакт фермента с молекулой-мишенью.

При анализе структуры гена *rhaS* у штаммов кавказского подвида (818 и 1146), ферментирующих рамнозу на 1-е сутки, выявлена идентичность с нуклеотидной последовательностью секвенированного нами гена *rhaS* штаммам *Y. pseudotuberculosis*, что свидетельствует о наличии у штаммов кавказского подвида гена *rhaS* «дикого» типа и, в конечном итоге, об эволюционной древности этого подвида.

У штаммов гиссарского подвида выявлена уникальная нуклеотидная замена в позиции 482 п.н. (аденин), отсутствующая у штаммов других подвигов (гуанин). По данным математического анализа с использованием программы Mega 4, эта замена приводит к изменению аминокислотной последовательности регуляторного белка RhaS у штаммов гиссарского подвида – появление тирозина вместо цистеина. Возможно, что эта нуклеотидная замена является причиной неустойчивого фенотипического проявления признака ферментации рамнозы у штаммов гиссарского подвида и может рассматриваться как генетическая особенность этих штаммов (табл. 2).

У штаммов гиссарского, алтайского, улэгейского подвигов и штаммов из Таласского природного очага чумы, в отличие от кавказского подвида, обнаружена нуклеотидная замена в позиции 494 п.н. (тимин вместо цитозина у *Y. pseudotuberculosis*), что приводит к появлению в составе регуляторного белка RhaS аминокислоты валин вместо аланина. По-видимому, эта замена не является значимой, поскольку штаммы алтайского подвида, несущие эту замену, ферментируют рамнозу в короткие сроки.

Таким образом, секвенирование полной нуклеотидной последовательности регуляторного гена *rhaS* свидетельствуют о наличии в этом гене синонимических и несинонимических нуклеотидных замен в геноме чумного микроба основного и неосновных подвигов по сравнению с возбудителем псевдотуберкулеза, которые, по-видимому, являются причиной различной способности основного и неосновных подвигов ферментировать рамнозу. Выявленные единичные нуклеотидные замены позволяют дифферен-

цировать штаммы возбудителя псевдотуберкулеза и кавказского подвида *Y. pestis* от остальных подвигов чумного микроба, основной подвид от неосновных подвигов возбудителя чумы, а также, благодаря наличию уникальных нуклеотидных замен, дифференцировать штаммы гиссарского подвида.

Работа поддержана грантами РФФИ 06-04-08152 ОФИ, 07-04-00100а, 08-04-00731а.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кутырев В.В., Проценко О.А. Классификация и молекулярно-генетические исследования *Yersinia pestis*. Пробл. особо опасных инф. 1998; 78:11–22.
2. Наумов А.В., Самойлова Л.В., редакторы. Руководство по профилактике чумы. Саратов; 1992.
3. Онищенко Г.Г., Федоров Ю.М., Кутырев В.В., Попов Н.В. и др. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 192 с.
4. Слудский А.А., Деряжко К.И., Головкин Э.Н., Агеев В.С. Гиссарский природный очаг чумы. Саратов: Изд-во Сарат. ун-та; 2003. 248 с.
5. Шурыгина И.А., Чеснокова М.В., Климов В.Т. и др. Псевдотуберкулез. Новосибирск: Наука; 2003.
6. Holcroft C., Egan S. Interdependence of activation at rhaRS by cyclic AMP receptor protein, the RNA polymerase alpha subunit C-terminal domain, and RhaR. J. Bacteriol. 2000; 182(23):6774–82.
7. Moralejo P., Egan S., Hidalgo E. et al. Sequencing and characterization of a gene cluster encoding the enzymes for L-rhamnose metabolism in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 1993; 175(17):5585–94.
8. Power J. L-rhamnose genetic system in *Escherichia coli*. Genetics. 1967; 55:557–68.
9. Sanger F., Nicklen L., Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1977; 74(12):5463–67.
10. Wicktrum J., Santangela T., Egan S. Cyclic AMP receptor protein and RhaR synergistically activate transcription from the L-rhamnose-responsive rhaSR promoter in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 2005; 187(19):6708–18.

L.M.Koukleva, G.A.Yeroshenko, V.E.Kouklev, Ya.M.Krasnov, N.P.Guseva, G.N.Odinokov, V.V.Kutyrev

#### Comparison of Complete Nucleotide Sequence of *rhaS* Gene in the Strains of Plague Etiological Agent of Main and Minor Subspecies

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Determined was complete nucleotide sequence of *rhaS* gene, the regulatory gene of *rha* locus of chromosome in *Yersinia pestis* strains of main and minor subspecies and in *Y. pseudotuberculosis* of I–III serovariants. The presence of significant and inessential nucleotide replacements in *rhaS* gene was shown. Evidently, these replacements are the cause of different abilities for rhamnose fermentation in the strains of plague etiological agent (main and minor subspecies) and those of pseudotuberculosis agent.

**Key words:** etiological agent of plague, *Y. pestis* main and minor subspecies, rhamnose fermentation, nucleotide sequence.

Поступила 26.02.08.

Т.А.Бондарева, В.Б.Калининский, И.В.Борисевич, Г.В.Барамзина, О.О.Фоменков

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СОВРЕМЕННЫХ ФТОРХИНОЛОНОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТУЛЯРЕМИИ**

ФГУ «48 Центральный научно-исследовательский институт Минобороны России», Киров

Проведена сравнительная оценка эффективности фторхинолонов при лечении экспериментальной туляремии. В опытах на лабораторных животных показано, что спарфлоксацин, пефлоксацин и моксифлоксацин высокоэффективны при лечении данного заболевания.

*Ключевые слова:* туляремия, лабораторные животные, фторхинолоны, чувствительность возбудителей заболеваний, эффективность, спарфлоксацин, пефлоксацин и моксифлоксацин.

Туляремия – зоонозное природно-очаговое инфекционное заболевание, характеризующееся различными механизмами и путями передачи возбудителя, лихорадкой, интоксикацией, полиморфизмом клеточных проявлений, затяжным течением [13]. Несмотря на несомненные успехи, достигнутые в борьбе с возбудителями особо опасных болезней в целом, значимость туляремийного микроба как этиологического фактора в патологии человека не только не снижается, но и проявляет тенденцию к нарастанию [4, 6, 7].

Это связано с тем, что *Francisella tularensis* вызывает особо опасное заболевание человека, а эндемичные очаги инфекции характеризуются стабильностью и широко распространены в северном полушарии, включая территорию России и соседних стран. Более того, в настоящее время имеется четкая тенденция к формированию новых очагов на ранее не эндемичных территориях (Косово, Испания, Турция, Австралия) [16]. К тому же возбудитель туляремии входит в перечень биологических агентов, которые могут быть использованы в качестве агента биотерроризма. Реальная возможность применения возбудителя туляремии в локальных войнах, вооруженных конфликтах или при террористических актах является серьезной проблемой для любой страны [2, 3]. Поэтому задача совершенствования экстренной про-

филактики и лечения туляремии и на сегодняшний день остается актуальной.

Среди современных антибактериальных химиотерапевтических средств одно из ведущих мест в терапии особо опасных инфекций различной этиологии занимает большая группа синтетических антимикробных препаратов широкого спектра действия – фторхинолоны [9, 14]. Из их числа цiproфлоксацин и пефлоксацин включены в действующие инструкции в качестве средств экстренной профилактики и лечения туляремии [5]. Кроме того, применительно к данному заболеванию имеется сообщение о том, что использование цiproфлоксацина при лечении язвенно-бубонной формы туляремии у детей было эффективным у всех больных [15].

Целью настоящей работы являлось сравнительное изучение эффективности современных фторхинолонов при экстренной профилактике и лечении экспериментальной туляремии у лабораторных животных.

**Материалы и методы**

В экспериментах использовали спарфлоксацин (Спарфло, Индия), моксифлоксацин (Авелокс, Германия), пефлоксацин (Абактал, Словения), гемифлоксацин (Фактив, Россия). Все препараты при-

Таблица 1

Характеристика фторхинолонов [8–12]

Антибактериальный препарат	Фармакокинетика				Курс дозирования для людей
	Разовая доза, мг	T <sub>1/2</sub> , ч	Концентрация в крови, мкг/мл	Биодоступность, %	
Моксифлоксацин	400	9–16	2,5–4,9	86–89	400 мг 1 раз в сутки, 5–14 дней
Спарфлоксацин	400	18–20	1,2–1,6	60	1-й день – 400 мг за 2 приема, 2-й и последующие дни – 200 мг 1 раз, до 10 дней
Пефлоксацин	400	6–14	3,8–4,1	90–100	800–1200 мг за 2–3 приема
Гемифлоксацин	320	7–10	0,7–2,6	70	320 мг 1 раз в сутки, 5–7 дней

Эффективность фторхинолонов при экстренной профилактике туляремии у морских свинок

Антибактериальный препарат	Продолжительность курса, сут	Суточная доза, мг	Кол-во животных		Кол-во выживших животных, %	Среднее время жизни погибших животных, сут
			в опыте	погибло		
Спарфлоксацин	5	8 – 1-й день, 4 – 2–5-е дни	10	1	90	10,0
	7	8 – 1-й день, 4 – 2–7-е дни	10	0	100	0
Гемифлоксацин	5	6,4	10	6	40	11,3
	7	6,4	10	4	60	22,0
Моксифлоксацин	5	8	10	4	60	17,0
	7	8	10	6	40	24,7
Пефлоксацин	5	16	10	2	80	23,0
	7	16	10	0	100	0
Контроль (без лечения)			10	10	0	6,0

меняли в пределах установленных сроков годности. Фармакокинетические характеристики фторхинолонов и предписанные для каждого из них суточные дозы, кратность введения и продолжительность курсов представлены в табл. 1.

Для оценки эффективности антибактериальных препаратов при экстренной профилактике и лечении экспериментальной туляремии использовали морских свинок массой 200–250 г. Животных заражали подкожно 2-суточной агаровой культурой *Francisella tularensis* (штамм 170) в дозе 120–160 ЛД<sub>50</sub>.

Введение спарфлоксацина, моксифлоксацина, пефлоксацина и гемифлоксацина с профилактической целью начинали через 3–6 ч, при лечении – через 24 ч после заражения. Дозы введения препарата выбирали в соответствии со схемой перерасчета на единицу поверхности тела, исходя из рекомендуемых максимально переносимых суточных и курсовых доз для человека [1]. Все фторхинолоны вводили перорально в виде взвеси в 1 % растворе крахмала с помощью шприца с иглой, на конце которой напаяна олива. Суточную дозу пефлоксацина вводили в 2 приема через 12 ч, остальные препараты – только 1 раз в сутки.

Продолжительность профилактического курса введения фторхинолонов составляла 5 и 7 дней, лечебного – 10 и 14 сут. В каждой группе было по 10 животных. Показателем лечебной эффективности

препаратов являлся процент защиты (количество выживших животных). Все животные, погибшие после заражения, а также умерщвленные по окончании срока наблюдения (30 сут после окончания лечения) подвергались патолого-анатомическому и бактериологическому обследованиям.

### Результаты и обсуждение

Результаты исследования профилактической эффективности препаратов фторхинолонового ряда при экспериментальной туляремии у лабораторных животных представлены в табл. 2.

При экстренной профилактике туляремии у морских свинок спарфлоксацином количество выживших животных составило 90 и 100 % при продолжительности курсов 5 и 7 дней соответственно. Из остальных испытанных фторхинолонов только пефлоксацин обеспечивал высокую эффективность превентивного лечения (80 и 100 % выживших животных при продолжительности курсов 5 и 7 дней соответственно).

Максимальная эффективность гемифлоксацина и моксифлоксацина при экстренной профилактике туляремии соответственно составляла 60 и 40 % при 7-дневном курсе введения данных препаратов.

Результаты исследований лечебной эффективности фторхинолонов на подкожно инфицированных

Таблица 3

Эффективность фторхинолонов при лечении экспериментальной туляремии у лабораторных животных

Антибактериальный препарат	Продолжительность курса, сут	Суточная доза, мг	Кол-во животных		Кол-во выживших животных, %	Среднее время жизни погибших животных, сут
			в опыте	погибло		
Спарфлоксацин	10	8 – 1-й день, 4 – 2–10-е дни	10	1	90	26
	14	8 – 1-й день, 4 – 2–14-е дни	10	0	100	-
Гемифлоксацин	10	6,4	10	8	20	11,5
	14	6,4	10	6	40	18
Моксифлоксацин	10	8	10	3	70	24,7
	14	8	10	2	80	20
Пефлоксацин	10	16	10	2	80	9,5
	14	16	10	1	90	18
Контроль (без лечения)			10	10	0	6,0

культурой возбудителя туляремии морских свинок приведены в табл. 3.

Из представленных данных следует, что наибольшей эффективностью при лечении экспериментальной туляремии у морских свинок характеризовался спарфлоксацин. При курсе лечения 14 дней выжили все животные, при курсе лечения 10 дней количество выживших животных составило 90 %, одно животное погибло на 26-е сутки с момента заражения.

Лечение экспериментальной туляремии пefфлоксацином с использованием курсов введения препарата 10 и 14 дней обеспечило выживание 80 и 90 % животных соответственно. Моксифлоксацин при тех же условиях обеспечил выживание соответственно только 70 и 80 % животных, а гемифлоксацин оказался наименее эффективным (20 и 40 % выживших животных соответственно), его применение лишь в 2–3 раза увеличивало сроки жизни морских свинок по сравнению с таковыми у контрольных животных.

При вскрытии у всех выживших после 30 сут наблюдения морских свинок патоморфологическая картина туляремии отсутствовала, возбудитель в посевах из органов не обнаружен. В то время как в контрольной группе (без лечения) у погибших животных в посевах из органов выявлены бактерии *Fr. tularensis*. Средняя продолжительность жизни контрольных животных составила 6,0 дней.

Таким образом, приведенные результаты исследований свидетельствуют о высокой эффективности спарфлоксацина и пefфлоксацина при экстренной профилактике экспериментальной туляремии у морских свинок. Эти же препараты оказались наиболее эффективными и при лечении экспериментальной туляремии у лабораторных животных, особенно при курсе лечения в 14 дней (количество выживших животных в этом случае составило 100 и 90 %, соответственно). Несколько меньшей эффективностью (80 % выживших животных) характеризовался моксифлоксацин при аналогичном курсе введения.

Таким образом, в отношении туляремии спарфлоксацин и пefфлоксацин обладают наибольшей профилактической и лечебной эффективностью из всех испытанных препаратов фторхинолонового ряда.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Владимиров В.Г. Расчет количества лекарственных пре-

паратов на поверхность тела как один из способов определения равноэффективных доз для животных и человека. Фармакол. и токсикол. 1976; 1:123–8.

2. Воробьев А.А. Оценка вероятности использования биоагентов в качестве биологического оружия. Эпидемиол. и инф. бол. 2001; 6:54–6.

3. Лобзин Ю.В., Лукин Е.П., Усков А.И. Некоторые объекты биотерроризма. Мед. акад. журн. 2001; 3(1):3–11.

4. Мецержякова И.С. Туляремия: современная эпидемиология и эпидемиологический надзор. В кн.: Матер. VIII Всерос. съезда эпидемиологов, микробиологов и паразитологов (Москва, 2002). 2002. Т. 1. С. 361–2.

5. МР 0100/3556-04-34 Методические рекомендации. Взаимодействие органов управления, учреждений и специализированных формирований при ликвидации последствий террористических актов с применением патогенных биологических агентов и опасных химических веществ. Введ. 01.01.2005.

6. Онищенко Г.Г. Контроль и ликвидация инфекционных заболеваний – стратегическое направление здравоохранения. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2002; 4:3–16.

7. Онищенко Г.Г. Меры по противодействию биологическому терроризму в Российской Федерации. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005; 4:33–7.

8. Падейская Е.Н., Яковлев В.П. Антимикробные препараты группы фторхинолонов в клинической практике. М.; 1998.

9. Падейская Е.Н., Яковлев В.П. Фторхинолоны. М.: Биоинформ; 1995.

10. Позднякова В.П., Нестерова Л.Я., Смирнова Л.Б. и др. Пefфлоксацина мезилат – клиническая эффективность при различных формах инфекционно-воспалительных заболеваний. Антибиотики и химиотерапия. 1997; 42(7):20–3.

11. Спарфлоксацин: опыт клинического изучения. Антибиотики и химиотерапия. 1996; 41(11):47–8.

12. Яковлев В.П. Ципрофлоксацин – высокоэффективный препарат из группы фторхинолонов. Антибиотики и химиотерапия. 1997; 41(6):4–14.

13. Ellis J, Oyston PC, Green M, Titball RW. Tularemia. Clin. Microbiol. Rev. 2002; 15(4):631–46.

14. Liamaye A.P., Hooper C.J. Treatment of tularemia with fluoroquinolones: two cases and review. Clin. Infect. Dis. 1999; 29:972–4.

15. Jobanson A., Berglund L., Gotbefors L. et al. Ciprofloxacin for treatment of tularemia in children. Pediatr. Infect. Dis. J. 2000; 19: 449–53.

16. Reintjes R., Dedushaj I., Gjini A. et al. Tularemia outbreak investigation in Kosovo: case control and environmental studies. Emerg. Infect. Dis. 2002; 8(1):69–73.

T.A. Bondareva, I.V. Kalininsky, I.V. Borisevich, G.V. Baramzina,  
O.O. Fomenko

#### Comparative Assessment of Modern Fluoroquinolones Efficacy in Experimental Tularemia Treatment

48 Central Research Institute of the Russian Ministry of Defense, Kirov

The comparative assessment of fluoroquinolones efficacy in experimental tularemia treatment was carried out. Sparfloxacin, pefloxacin and moxifloxacin were shown to be highly effective when treating this disease in test animals.

*Key words:* tularemia, test animals, fluoroquinolones, susceptibility of pathogens, efficacy, sparfloxacin, pefloxacin, moxifloxacin.

Поступила 03.07.2008.

С.А.Бугоркова, С.Ю.Задумина, В.В.Кутырев

## РЕАКЦИЯ КЛЕТОК APUD-СИСТЕМЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ БИОМОДЕЛЕЙ НА ПОДКОЖНУЮ ИММУНИЗАЦИЮ ВАКЦИННЫМ ШТАММОМ *YERSINIA PESTIS* EB

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

Установлено, что реакция клеток APUD-системы отражает иммунологические и адаптационно-компенсаторные процессы в организме морских свинок, привитых подкожно вакцинным штаммом *Y. pestis* EB. Показана динамика изменения активности и количества апудоцитов в иммунокомпетентных органах в различные периоды иммуногенеза при противочумной вакцинации биомоделей. Применение количественной оценки содержания и функции апудоцитов в лимфоидных органах и надпочечниках при вакцинном процессе, позволяющая характеризовать адаптационно-компенсаторные реакции в организме биомодели, делает возможным сравнительный анализ реактогенности и безвредности разрабатываемых против этой инфекции вакцин на этапах их доклинического испытания.

**Ключевые слова:** вакцинный штамм EB, апудоциты, иммунизация, адаптационно-компенсаторные реакции.

Вакцинация является эффективным средством борьбы с чумой, но в силу своей реактогенности живая вакцина вызывает в макроорганизме сложный комплекс нейрогуморальных, метаболических и морфологических сдвигов [4], строгий учет которых позволит охарактеризовать безопасность как имеющихся, так и вновь создаваемых противочумных вакцин.

При вакцинации происходит мобилизация иммунной системы и тесно связанной с ней нейроэндокринной или APUD-системы [8]. Наличие большого числа апудоцитов в различных органах, в том числе и иммунокомпетентных, химическая общность действия основных регуляторных пептидов позволяют считать APUD-систему одной из систем реагирования, контроля и защиты макроорганизма [1, 10, 16]. Новый подход к выяснению роли апудоцитов в иммуногенезе при противочумной вакцинации на основе изучения их реакции в функционально значимых системах макроорганизма, расширяя представления о механизмах нейроиммуноэндокринных взаимоотношений, может быть применен для разработки методов оценки безопасности и эффективности противочумных вакцин и коррекции нарушений иммунного статуса при вакцинации ими.

Цель работы – охарактеризовать в динамике иммунологические и адаптационно-компенсаторные процессы в организме морских свинок, подкожно иммунизированных вакцинным штаммом *Y. pestis* EB, по реакции клеток APUD-системы.

### Материалы и методы

Три группы морских свинок массой 400 г (27 особей) иммунизировали подкожно в область правого бедра взвесью двухсуточной агаровой культуры вакцинного штамма *Y. pestis* EB (линии НИИЭГ) в дозах  $1 \cdot 10^7$ ,  $2 \cdot 10^9$  или  $1,5 \cdot 10^{10}$  м.к. в 2 мл изотонического раствора хлорида натрия. Контрольным животным (3 особи) аналогично вводили 2 мл изото-

нического раствора хлорида натрия. Наблюдение за животными осуществляли в течение 14 сут, вскрывая умерщвленных хлороформом морских свинок на 3-и, 7-е и 14-е сутки.

Для гистологического исследования кусочки внутренних органов (печени, почек, сердца, легких, селезенки, тимуса, надпочечников), лимфатических узлов (ЛУ, регионарных, контрлатеральных, отдаленных) и кожи места введения культуры фиксировали в 10 % водном нейтральном растворе формалина, а затем проводили по общепринятой схеме обработки материала для гистологического исследования [7]. Полутонкие парафиновые срезы окрашивали раствором гематоксилина и эозина [6], импрегнировали раствором нитрата серебра по Гримелиусу [13] для выявления аргирофильных (АГ) апудоцитов и по Массону в модификации Гамперля [9] – для выявления аргентафинных (АТ). Готовые препараты просматривали в микроскопе Olympus CX31 с тринокулярным, выполняя подсчет апудоцитов в 10 полях зрения правильно ориентированных срезов органов при увеличении 400 (селезенка, тимус, лимфатические узлы, легкие, надпочечники) и при увеличении 200 (двенадцатиперстная кишка), оценивая морфофункциональное состояние клеток по степени заполнения их аргирофильным или аргентафинным веществом. Статистическая обработка полученных данных выполнялась с использованием программы Microsoft Office Excel 2003.

### Результаты и обсуждение

При макроскопическом исследовании на 3-и сутки после иммунизации морских свинок в месте введения обнаруживали небольшие очаги уплотнения тканей, умеренное полнокровие сосудов и очаговый отек подкожной клетчатки только при использовании максимальной дозы вакцинного штамма *Y. pestis* EB ( $1,5 \cdot 10^{10}$  м.к.). К 7-м суткам эти изменения уже не регистрировались. Гистологические изменения у

животных этой группы характеризовали очаговую тканевую реакцию – выраженную воспалительную инфильтрацию полиморфно-ядерными лейкоцитами (ПМЯЛ) вокруг микробных скоплений. На введение меньших доз к 3-м суткам наблюдали незначительную межучточную мононуклеарную инфильтрацию. В последующие сроки (7–14-е сутки) видимых изменений не находили, и при гистологическом исследовании ни в одном случае не отмечали рубцовых изменений.

Использование наименьшей дозы *Y. pestis* EB вызывало в регионарных лимфатических узлах (РЛУ) минимальные воспалительные изменения (в виде незначительного расширения маргинального синуса и явлений катара синусов мозгового вещества) отчетливее всего выраженные на 7-е сутки.

В течение всего периода наблюдения у животных всех групп преобладали признаки, характеризующие активный иммунный ответ. Об этом свидетельствовали: гиперплазия клеток с накоплением бластических элементов в Т-зоне, нарастающая от значительной до резкой степени выраженности; активация светлых центров фолликулов (В-зоны), ко-

торая постепенно стихала к 13-м суткам, сменяясь гиперплазией клеток в мозговых тяжах (В-зоны), где на фоне плазмобластической реакции даже формировались светлые центры в юкстамедулярной зоне.

Данные по изменению количества клеток APUD-системы в лимфатических узлах и других органах представлены в таблице. После иммунизации дозой  $1 \cdot 10^7$  м.к. динамику реакции клеток APUD-системы в РЛУ характеризовало плавное колебание количества АТ клеток вокруг контрольного значения и достоверное снижение числа АГ клеток на 3-и и 14-е сутки с относительным накоплением нейроэндокринных клеток (НЭК) к 7-м суткам. При введении *Y. pestis* EB в дозе  $2 \cdot 10^9$  м.к. отмечали достоверное снижение количества АТ клеток на 3-и, а АГ – на 7-е сутки, но на 14-е сутки число и тех, и других НЭК превышало аналогичные показатели у контрольных животных. Максимальная иммунизирующая доза ( $1,5 \cdot 10^{10}$  м.к.) вызывала резкое опустошение АТ клеток к 7-м суткам и увеличение их количества к 14-м, в то время как число АГ элементов на протяжении всего срока наблюдения не достигало контрольных значений.

В контрлатеральных и отдаленных ЛУ изме-

Динамика реакции клеток APUD-системы у морских свинок, иммунизированных подкожно вакцинным штаммом *Y. pestis* EB

Орган / окраска	Иммунизирующие дозы вакцинного штамма <i>Y. pestis</i> EB									Интактный контроль
	$1 \cdot 10^7$ м.к			$2 \cdot 10^9$ м.к			$1,5 \cdot 10^{10}$ м.к			
	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки	3-и сутки	7-е сутки	14-е сутки	
<i>Легкие</i>										
Массон	2,6+0,23	2,0+0,89	2,8+0,69	4,1+0,90	3,1+0,05	3,8+0,75	3,4+0,23	5,5+1,04*	2,6+0,72	3,6+0,50
Гримелиус	1,7+0,65	0,9+0,07*	1,3+1,01	2,6+0,89	1,8+0,64*	1,9+0,55*	2,4+0,32	3,2+0,64	1,6+0,23*	3,9+1,52
<i>Группа регионарных лимфатических узлов</i>										
Массон	3,1+0,35	4,2+1,56	3,1+0,65	2,4+0,61*	2,5+0,28	4,8+2,11	3,8+1,11	0,9+0,61*	4,1+0,07	3,3+0,68
Гримелиус	1,5+0,89*	2,9+0,61	1,2+0,46*	3,3+0,89	2,5+0,29*	4,6+1,58	2,3+0,32	2,7+0,51	2,3+0,51	3,7+0,50
<i>Группа контрлатеральных лимфатических узлов</i>										
Массон	2,7+0,75	2,5+1,04	4,1+1,12*	2,2+0,90	4,5+0,76*	3,6+0,65	5,0+2,31*	2,7+1,82	4,0+1,15	2,7+0,51
Гримелиус	1,1+0,47	0,9+0,02*	1,5+0,5	2,7+1,17	4,8+0,64*	3,7+0,89	2,4+0,30	2,4+1,50	3,7+0,51	2,2+0,53
<i>Группа отдаленных лимфатических узлов</i>										
Массон	4,9+1,09	3,2+1,06	4,4+1,28	3,3+0,90	5,2+0,69*	2,9+1,05	1,5+0,54*	3,4+1,05	5,0+1,02*	3,8+1,51
Гримелиус	3,1+1,07	2,9+0,69	2,4+0,5	2,9+0,61	4,9+0,61*	6,6+2,57*	1,7+0,61	2,0+1,10	2,8+0,52	2,8+0,64
<i>Тимус</i>										
Массон	3,6+1,59	18,1+1,18*	2,1+1,12	6,5+1,2*	2,7+1,01	2,4+0,84	2,9+0,89	2,1+0,06	3,1+0,06	2,1+0,95
Гримелиус	2,7+1,17	15,3+2,47*	1,8+0,53	3,8+0,9	3,2+0,64	1,9+0,06	1,6+0,31	3,5+2,02	2,8+0,12	2,8+1,01
<i>Селезенка</i>										
Массон	3,8+0,53	3,7+0,17	2,7+0,51*	2,2+0,65*	5,5+0,29	4,1+0,87	3,9+0,06	2,2+0,53*	3,8+0,11	5,6+0,35
Гримелиус	2,4+0,89*	2,6+1,09	2,7+0,52	2,1+0,36	2,4+1,05	3,6+0,92	3,8+1,50	3,1+2,06	2,8+0,12	3,7+0,64
<i>Надпочечники</i>										
Массон	5,4+2,44	2,5+0,51*	2,4+0,42*	3,5+0,89*	2,5+1,04*	2,3+1,07*	2,8+0,52*	4,7+2,14*	2,8+0,64*	7,1+1,05
Гримелиус	3,1+1,45	1,9+0,75*	1,9+0,51*	3,6+1,44	2,7+1,02	3,2+1,01	1,8+0,61	1,4+0,52*	2,9+1,53	3,7+0,64

\*  $p < 0,05$

нения характеризовали менее интенсивный иммунный ответ: активность Т- и В-зон к 7-м суткам колебались от незначительной (при дозе  $1 \cdot 10^7$  м.к.) до выраженной (при дозе  $2 \cdot 10^9$  м.к.), а умеренные воспалительные явления (лимфаденит, периаденит, в том числе с продуктивной реакцией) в основном встречались при иммунизации максимальной из использованных доз.

В контрлатеральных ЛУ после введения *Y. pestis* EB в дозе  $1 \cdot 10^7$  м.к. при общей тенденции к снижению числа АГ клеток во все сроки по сравнению с контрольным уровнем достоверным оно было на 7-е сутки, а количество АТ элементов, напротив, достоверно возрастало к 14-м. С увеличением дозы иммунизации ( $2 \cdot 10^9$  м.к.) максимальные показатели активности как АГ, так и АТ клеток наблюдали к 7-м суткам, с последующим некоторым снижением их числа к 14-м. Максимальная иммунизирующая доза вызывала резкий подъем числа АТ клеток уже к 3-м суткам, а количество АГ элементов в течение всего периода наблюдения превышало контрольный уровень, особенно на 14-е сутки.

При иммунизации *Y. pestis* EB в дозе  $1 \cdot 10^7$  м.к. в отдаленных лимфатических узлах наблюдали умеренное колебание числа НЭК, достоверно не отличающееся от контрольных показателей. С увеличением иммунизирующей дозы ( $2 \cdot 10^9$  м.к.) регистрировали выраженную активацию обоих видов НЭК к 7-м суткам, и количество АГ клеток росло вплоть до 14-х суток. При максимальной иммунизирующей дозе после начального снижения уровня АТ клеток на 3-и сутки происходило существенное накопление их к 14-м суткам, а число АГ элементов, несколько сниженное в первые два срока, к 14-м суткам так и не превысило контрольный уровень.

В селезенке реакция клеток белой и красной пульпы на введение *Y. pestis* EB в целом характеризовалась высокой интенсивностью. Гиперплазия клеток в органе достигала максимальной степени выраженности в период с 3-х по 7-е сутки. Это проявлялось увеличением размеров мальпигиевых телец, накоплением в их Т- и В-зонах значительного числа бластических форм лимфоцитов, формированием крупных высокоактивных светлых центров. В перитрабекулярных скоплениях (ПТС) красной пульпы, значительно или умеренно выраженных, на пике гиперплазии клеток белой пульпы на 7-е сутки определялись лимфобласты. Помимо лимфобластов в ПТС и в других участках красной пульпы после введения *Y. pestis* EB в дозах  $2 \cdot 10^9$  и  $1,5 \cdot 10^{10}$  м.к. присутствовали в виде небольшой примеси ПМЯЛ, что указывало на развитие очагового инфекционного спленита. С 3-х суток значительно возрастали число и активность макрофагов и стромальных элементов – ретикулярных клеток, активность которых, хотя и сниженная, сохранялась вплоть до 14-х суток. На этом фоне количество АГ и АТ клеток в селезенке во всех случаях было несколько ниже контрольных показателей.

В тимусе признаки гиперплазии клеток и телец

Гассалья выявлялись в течение всего периода наблюдения. Клетки APUD-системы отвечали максимальной активацией на 7-е сутки при иммунизации *Y. pestis* EB в дозе  $1 \cdot 10^7$  м.к. и на 3-и – при иммунизации в дозе  $2 \cdot 10^9$  м.к. А высокая иммунизирующая доза вызывала даже некоторое торможение активации НЭК: АГ на 3-и, а АТ – на 7-е сутки.

Описанные изменения апудоцитов в лимфоидных органах, происходящие в ответ на введение вакцинного штамма *Y. pestis* EB, отражают регуляторные свойства синтезируемых этими клетками биологически активных веществ (БАВ) и пептидов. Активация НЭК тимуса в период с 3-х по 7-е сутки, коррелирующая с процессами активации лимфоидных элементов в органе, согласуется с данными о роли этого органа как координатора молекулярных и клеточных нейроэндокринных взаимодействий [14, 15]. Способность тимусных эпителиальных клеток (ТЭК) секретировать такие БАВ, как серотонин, мелатонин, гистамин и другие [2], и продуцировать сигнальные молекулы – цитокины, играющие важную роль в дифференцировке и пролиферации тимоцитов [5], позволяет предположить участие НЭК не только в иммуномодулирующих процессах, но и в ограничении алергизирующих и общетоксических реакций макроорганизма. В периферических органах иммунной системы первоначально регистрируемое снижение количества апудоцитов, направленное на стимуляцию иммунной реакции, в последующем сменяется увеличением их числа, способствуя ограничению интенсивности процесса [10]. С увеличением дозы *Y. pestis* EB развивающиеся явления острого лимфаденита в РЛУ, по-видимому, сопровождались более ранней (до 3-х суток) активацией апудоцитов, в первую очередь АТ клеток, а к 7-м суткам активность этих элементов резко уменьшалась. К 14-м суткам, когда явления острого воспаления стихают, число НЭК начинает нарастать, что может быть отражением регуляторного влияния продуктов секреции этих клеток на различные компоненты или фазы воспалительного процесса.

В легких у животных до 7-х суток отмечали периваскулярную мононуклеарную инфильтрацию и умеренное полнокровие сосудов и капилляров, к концу периода наблюдения эти проявления заметно ослабевали. При иммунизации большими дозами у отдельных животных обнаруживали мелкие очаги утолщения межальвеолярных перегородок за счет инфильтрации их пролиферирующими гистиоцитами и лимфоидными элементами. Количество АТ элементов было аналогично контрольному уровню при иммунизации в дозе  $1 \cdot 10^7$  и  $2 \cdot 10^9$  м.к., но достоверно увеличивалось к 7-м суткам после введения *Y. pestis* EB в дозе  $1,5 \cdot 10^{10}$  м.к. Ультраструктура эндокринных клеток бронхиального эпителия сходна с ЕС-клетками в кишечнике [12], а физиологический эффект продуктов их секреции предполагает региональный контроль за вентиляцией и перфузией в органе. Поэтому реакция апудоцитов в легких является отражением

нарушенного перфузионно-вентиляционного отношения (ПВО), что наблюдается, например, при использовании больших доз *Y. pestis* EV. ПВО определяли по отношению площади действующих альвеол к площади капилляров на единицу площади среза. Так, при иммунизации животных  $1 \cdot 10^7$  и  $2 \cdot 10^9$  м.к. ПВО к 7-м суткам составляло – 30,12 и 27,82 соответственно. Этот показатель у животных, иммунизированных *Y. pestis* EV в дозе  $1,5 \cdot 10^{10}$  м.к., составлял 10,01 и был в 3 раза ниже контрольного (30).

В миокарде и почках регистрировались лишь признаки функционального напряжения паренхиматозных элементов и незначительного полнокровия сосудов.

В печени встречали очаги баллонной дистрофии гепатоцитов от резкой в ранний срок до значительной и умеренной в поздние сроки, наблюдали умеренную пролиферацию звездчатых ретикулоэндотелиоцитов и мелкие мононуклеарные инфильтраты (до 10 клеток) как вокруг сосудов, так и внутри печеночных долек.

В надпочечниках отмечали очаговое, умеренное или значительное, сужение клубочковой зоны коркового вещества, а также обеднение липоидами сетчатой и/или пучковой зон на 3-й и 7-е сутки. Наблюдалось снижение феохромии мозгового вещества от умеренной до значительной степени на 7–13-е сутки в зависимости от дозы вводимого штамма *Y. pestis* EV. Реакция клеток APUD-системы была однотипной независимо от иммунизирующей дозы вакцинного штамма *Y. pestis* EV и заключалась в резком угнетении в первую очередь АТ элементов в интервале с 3-х по 7-е сутки. Эта реакция апудоцитов укладывается в характеристику стрессорных реакций макроорганизма и подтверждается колебанием концентрации БАВ в крови в ранние сроки после введения препаратов [3, 11].

Таким образом, учет количества апудоцитов в иммунокомпетентных органах, легких и надпочечниках при противочумной вакцинации позволяет судить не только о направленности процессов иммуногенеза, но и о стрессорной реакции макроорганизма на введение различных использованных доз вакцинного штамма *Y. pestis* EV и может быть рекомендован к применению для сравнительной оценки реактогенности и безвредности вновь разрабатываемых противочумных вакцин на этапах их доклинического испытания.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акмаев И.Г. Современные представления о взаимодействии регулирующих систем: нервной, эндокринной и иммунной. Усп. физиол. наук. 1996; 27(1):3-19.
2. Акмаев И.Г. Нейроиммуноэндокринология: факты и гипотезы. Пробл. эндокринологии. 1997; 1(43):3-9.
3. Анисимова Т.И., Сергеева Г.М., Саяпина Л.В. Электрофоретическая подвижность и энергетический заряд адениловой системы лимфоцитов крови морских свинок, привитых против чумы субкультурами штамма *Yersinia pestis* EV с различной иммуногенностью. Биопрепараты. 2005, сентябрь. С. 17–20.
4. Бунин К.В., Гапочко К.Г. Прививочные реакции при иммунизации живыми вакцинами. М.: Медицина; 1970. 296 с.
5. Кветной И.М., Ярилин А.А., Полякова В.О. Нейроиммуноэндокринология тимуса. СПб; 2005. 102 с.
6. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир; 1969. 645 с.
7. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. – М.: Медицина; 1969. 423 с.
8. Пальцев М.А., Иванов А.А., Северин С.Е. Межклеточные взаимодействия. М., 2003.
9. Пирс Э. Гистохимия. Португалов В.В., редактор. М.: Изд-во Иностранная литература; 1962. 962 с.
10. Райхлин Н.Т., Кветной И.М., Осадчук М.А. APUD-система (общепатологические и онкологические аспекты). Обнинск; 1993. Ч. 1–2. 172 с.
11. Шуковская Т.Н. Регуляция нейромедиаторами формирования специфической резистентности к особо опасным инфекциям. Аллергология и иммунология. 2000; 1(2):110–1.
12. Feyrter G.L. Uber die peripheren endokrinen (parakrinen) Drusen des Menschen. Wien-Dusseldorf. W.Maudrich, 1953. 231 s.
13. Grimelius L. A silver nitrate stain for 12 cells in human pancreatic islets. Acta Soc. Med. upsaliensis. 1968. 73:243–70.
14. Manley N.R. Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation. Semin. Immunol. 2000; 12(5):421–8.
15. Maroder M., Bellavista D., Vacca A. et al. The thymus at the crossroad of neuroimmune interactions. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2000; 217:741–7.
16. Toni D.R. The neuroendocrine system: organization and homeostatic role. J. Endocrinol. Invest. 2004; 27 Suppl. 6:35–47.

S.A.Bugorkova, S.Yu.Zadumina, V.V.Kutyrev

**Reaction of APUD-System Cells of Experimental Biomodels to Subcutaneous Immunization by *Yersinia pestis* EV Vaccine Strain**

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe"

It was stated that the reaction of APUD-system cells reflects immunologic and adaptive-compensatory processes in the organisms of guinea-pigs subcutaneously inoculated by *Y. pestis* EV vaccine strain. Shown was the dynamics of changing of activity and quantity of apudocytes in immunocompetent organs in different periods of immunogenesis after anti-plague vaccination of biomodels. Implementation of quantitative assessment of content and function of apudocytes in lymphoid organs and adrenals during vaccination process allows characterizing the adaptive-compensatory reactions in biomodel organism and makes it possible to comparatively analyze reactogenicity and safety of vaccines developed against this infection on the stages of their preclinical trials.

*Key words:* EV vaccine strain, apudocytes, immunization, adaptive-compensatory reactions.

Поступила 20.02.08.

С.А.Витязева<sup>1</sup>, Т.П.Старовойтова<sup>1</sup>, В.И.Дубровина<sup>1</sup>, С.А.Медведева<sup>2</sup>,  
Л.А.Грищенко<sup>2</sup>, Т.Т.Шкаруба<sup>1</sup>

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ ОРГАНАХ ЖИВОТНЫХ В ДИНАМИКЕ ВАКЦИНАЛЬНОГО ПРОЦЕССА, ВЫЗВАННОГО ЖИВОЙ ЧУМНОЙ ВАКЦИНОЙ С ИММУНОМОДУЛЯТОРАМИ

<sup>1</sup>ФГУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»,  
<sup>2</sup>Институт химии СО РАН, Иркутск

Для выяснения возможности усиления специфического иммунитета против чумы в качестве иммуномодуляторов избраны арабиногалактан, изолированный из лиственницы сибирской *Larix sibirica*, и его нанобиокомпозиаты железа и кобальта. Проведен сравнительный морфометрический анализ состояния органов иммунной системы белых мышей, привитых живой чумной вакциной (ЖЧВ), и ее сочетание с иммуномодуляторами. Полученные в ходе экспериментов данные свидетельствуют о том, что арабиногалактан и нанобиокомпозиаты на его основе при сочетанном применении с ЖЧВ усиливают иммуноцитопозитическую функцию органов иммунной системы в большей степени, чем ЖЧВ.

**Ключевые слова:** живая чумная вакцина, иммунитет, иммуномодуляторы, иммунокомпетентные органы.

Практика многолетнего применения живой вакцины для профилактики чумы позволяет считать этот препарат достаточно эффективным, но не лишенным ряда недостатков, к которым относятся относительная реактогенность, выраженное аллергизирующее действие, снижение защитных свойств при заражении атипичными штаммами возбудителя чумы, а главное непродолжительность вызываемого иммунитета [4].

Создание новых и усовершенствование уже имеющих вакцин тесно связано с поиском адекватных методических приемов оценки ответной реакции макроорганизма на введение вакцинных препаратов. В этой связи характеристика изменений показателей клеточного состава иммунокомпетентных органов, обусловленных вакцинацией, занимает важное место при оценке препаратов специфической профилактики инфекционных заболеваний [8], а традиционные методы регистрации морфологических изменений, оставаясь базовыми, должны дополняться системным количественным исследованием [1, 3].

Ранее нами [5] показано, что для стимуляции специфического иммунитета при чуме может быть использован препарат природного происхождения – арабиногалактан лиственницы сибирской (*Larix sibirica*, АГ) и синтезированные на его основе наноразмерные металлосодержащие композиты: феррогал (железосодержащее производное арабиногалактана) и кобальтсодержащее производное арабиногалактана (КСПА) [2]. Все три препарата водорастворимы, не токсичны, не пирогенны для экспериментальных животных и не вызывают значительных изменений клеточного состава иммунокомпетентных органов.

Цель настоящего исследования состояла в отслеживании динамики морфологических изменений в селезенке и лимфатических узлах экспериментальных животных при сочетанном введении живой чумной вакцины с АГ, феррогалом или КСПА.

### Материалы и методы

В качестве экспериментальной модели в опытах использовали 103 белые мыши весом 18–20 г. Мышей опытной группы подкожно иммунизировали *Yersinia pestis* EV (ЖЧВ) в дозах  $10^5$  м.к. ( $ID_{50}$ ), а также вводили в тех же дозах ЖЧВ в сочетании с АГ, феррогалом или КСПА (2 мг/кг). Контролем служили интактные животные. Белых мышей всех групп выводили из эксперимента под наркозом в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (2003 г.) через 3, 7, 14, 21 сут от момента иммунизации.

Материал (регионарные лимфатические узлы и селезенка) фиксировали в 10 % нейтральном формалине, обезвоживали в этиловом спирте возрастающей концентрации, заливали в парафин.

В работе использовали методы обзорной микроскопии с применением окрасок гематоксилином-эозином, метиловым зеленым-пиронином [7]. Количественную оценку клеточного состава и объемных долей коркового и мозгового вещества лимфатического узла, а также белой и красной пульпы селезенки проводили с использованием морфометрии [1] и компьютерной программы «Motic Images Plus» (версия 2) в следующих структурных компонентах: лимфатический узел – герминативный центр (реактивный) и корона лимфатического фолликула [6]; селезенка – периартериальная зона, реактивный центр, мантийная и краевая зоны лимфатического фолликула (100 измерений в различных участках на 5 срезах). Автоматический анализ изображения производили с помощью светового микроскопа «Zeiss» (Германия) с видеокамерой «Moticam 2000», разрешение  $1392 \times 1040$  пикселей, об. 100 и программы «ВидеоТест-Морфология», версия 4 (Санкт-Петербург). Подсчитывали число следующих видов клеток: бластные формы клеток, малые лимфоциты, лимфоциты (большие и средние), плазма-

тические клетки, макрофаги, а также стромальные элементы. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы «Статистика», версия 6 (Новосибирск). Достоверными оценивали различия при уровне значимости  $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$ .

### Результаты и обсуждение

Лимфоузлы и селезенка первыми из органов иммунитета встречаются с антигенным раздражителем. Первичная иммунная реакция в этих органах после введения вакцинного штамма чумного микроба ЕВ линии НИИЭГ к 3-м суткам проявляется активацией центров размножения за счет увеличения содержания бластных форм клеток (в 1,5–3,5 раза по сравнению с контролем), достигая к 7-м суткам (в 3,0–4,0 раза больше, чем в контроле) максимальных показателей. В связи с тем, что к 7–14-м суткам происходит выход лимфоцитов из центра размножения, наблюдается повышение количества малых лимфоцитов в короне лимфатического узелка (в 1,2–1,5 раза,  $p \leq 0,05$ ) и мантийной зоне фолликула селезенки (в 2,0–2,5 раза,  $p \leq 0,05$ ). Наблюдается увеличение к 7-м суткам количества плазматических клеток (от 0,2 до 9,0 абсолютного содержания клеток).

Клеточный состав иммунокомпетентных органов в процессе формирования иммунитета характеризуется значительным увеличением количества плазматических (в 10 раз по сравнению с контролем) и ретикулярных клеток (в 1,5–2,0 раза).

Таблица 1

Клеточный состав селезенки белых мышей, иммунизированных вакцинным штаммом чумного микроба ЕВ линии НИИЭГ (М±m)

Зоны	Клетки	Контроль	Срок наблюдения, сут			
			3	7	14	21
ПА	Л	47,6±0,2	55,4±1,2*	58,1±1,8*	58,4±0,9*	58,2±1,0*
	БК	5,8±0,4	9,4±0,4*	12,7±0,5*	9,6±0,4*	6,5±0,6
	РК	3,2±0,1	3,6±0,2	3,8±0,2	4,0±0,2	4,3±0,4
РЦ	МЛ	6,0±0,4	14,0±0,1**	14,6±0,7**	15,0±0,3**	15,6±1,0**
	Л	36,8±1,3	36,7±1,2	39,9±1,6	42,3±0,4*	41,6±1,7*
	БК	8,0±0,4	13,7±1,0**	24,3±1,3**	18,7±0,8**	10,9±0,9*
	РК	2,4±0,2	2,6±0,4	3,0±0,1	3,6±1,0	3,5±0,3
	МФ	2,2±0,2	2,2±0,4	2,8±0,2	2,0±0,1	2,2±0,2
МЗ	МЛ	10,6±1,4	19,2±0,9**	25,2±1,5**	23,8±0,8**	23,4±1,3**
	Л	59,7±1,2	65,6±1,6*	67,9±1,4*	68,3±0,3*	68,6±2,1*
	ПК	0,3±0,1	0,5±0,2	9,7±0,9**	6,9±0,6	3,6±0,2**
	РК	3,0±0,2	3,3±0,3	3,6±0,2	3,4±0,4	3,2±0,2
	МФ	1,4±0,1	1,8±0,2	1,7±0,1	1,6±0,3	1,3±0,2
КЗ	Л	52,6±0,9	54,6±1,3	56,7±1,4	58,4±0,7*	60,4±1,3*
	МФ	2,8±0,3	3,4±0,4	3,4±0,2	3,3±0,1	3,3±0,3

Примечания: МЗ – мантийная зона; РЦ – реактивный центр; КЗ – краевая зона; ПА – периартериальная зона; Л – лимфоциты; МФ – макрофаги; МЛ – малые лимфоциты; РК – ретикулярные клетки; ПК – плазматические клетки; БК – бластные формы клеток; \*  $p \leq 0,05$  (по сравнению с контролем); \*\*  $p \leq 0,01$ .

Количественные показатели клеток иммунокомпетентных органов у лабораторных животных после введения живой чумной вакцины по результатам серий экспериментов представлены в табл. 1, 2.

На основании результатов морфометрического исследования удалось установить, что сочетанное применение ЖЧВ и иммуномодуляторов вызывают изменения в микроанатомии структурных компонентов лимфатических узлов. У белых мышей, привитых как ЖЧВ, так и ЖЧВ в сочетании с АГ и феррогалом, имела место гиперплазия ткани фолликулов, но в большей степени выраженная при введении ЖЧВ с КСПА. Количество фолликулов со светлыми центрами у опытных животных возрастало уже к 3-м суткам после иммунизации, достигая максимума к 7-м суткам, что указывает на бласттрансформацию и пролиферацию лимфоцитов, и постепенно снижалось к 21-м суткам.

Так, на 3–7-е сутки в лимфатических узлах животных, получивших ЖЧВ совместно с иммуномодуляторами (2, 3, 4-я группы), по сравнению с животными, вакцинированными только ЖЧВ (1-я группа), наблюдалось увеличение объемных долей коркового вещества и паракортикальной зоны на 10,0–23,0 и 1,0–4,0 % ( $p \leq 0,05$ ) соответственно. Причем, показатели тимусзависимой зоны (паракортикальной) оставались более высокими во 2, 3 и 4-й опытных группах. Начиная с 14-х суток, объемные доли мозгового вещества увеличивались на 3,6–5,4 % ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с 1-й группой, что связано с миграцией и накоплением антителообразующих клеток. Таким образом, в течение всего эксперимента у животных 2, 3 и 4-й опытных групп отмечалось плавное увеличение объема коркового вещества, что указывало на пролонгированное стимулирующее действие АГ, КСПА и феррогала на пролиферацию и миграцию лимфоцитов.

В лимфатических узлах животных, вакцинированных ЖЧВ в сочетании с иммуномодуляторами, к 3-м суткам наблюдается активация центров размно-

Таблица 2

Клеточный состав лимфоузлов белых мышей, иммунизированных вакцинным штаммом чумного микроба ЕВ линии НИИЭГ (М±m)

Зоны	Клетки	Контроль	Срок наблюдения, сут			
			3	7	14	21
РЦ	БК	4,4±0,3	15,5±1,7**	15,7±0,5**	9,0±0,3**	7,8±0,5**
	Л	47,5±1,3	42,4±1,7*	41,8±0,7**	43,7±0,6**	45,3±0,7
	МЛ	13,4±1,0	13,0±0,9	11,5±0,5	11,8±0,4	11,6±0,4
	РК	3,2±0,3	3,1±0,1	3,3±0,2	3,5±0,2	3,3±0,2
	МФ	1,0±0,1	1,8±0,1*	1,9±0,2*	2,6±0,1*	2,6±0,2*
КУ	МЛ	78,8±0,5	86,2±1,8*	89,2±2,0*	88,8±0,5*	84,0±1,6*
	РК	3,3±0,2	3,4±0,2	3,6±0,3	3,5±0,2	3,4±0,1
	ПК	0,2±0,1	2,2±0,2**	8,0±0,3**	6,4±0,4**	5,9±0,7**

Примечания: РЦ – реактивный центр; КУ – корона узелка; БК – бластные формы клеток; Л – лимфоциты; МФ – макрофаги; МЛ – малые лимфоциты; РК – ретикулярные клетки; ПК – плазматические клетки; \*  $p \leq 0,05$  (по сравнению с контролем); \*\*  $p \leq 0,01$ .

жения за счет увеличения содержания бластных форм клеток (в 1,3–1,5 раза по сравнению с 1-й группой), достигая к 7-м суткам (в 1,2–1,5 раза больше чем в 1-й группе) максимальных показателей. В связи с тем, что к 7–14-м суткам происходит выход лимфоцитов из центра размножения, наблюдается повышение количества малых лимфоцитов в короне лимфатического фолликула (от 1,2 до 13,0 %). Увеличение содержания плазмоцитов в этой зоне наблюдается к 7-м суткам (в 1,3–1,4 раза по сравнению с 1-й группой экспериментальных животных).

Количественные показатели клеток лимфатических узлов у лабораторных животных после введения ЖЧВ в сочетании с КСПА по результатам серий экспериментов представлены в табл. 3.

При исследовании гистологических срезов нами установлено, что в селезенке мышей, привитых ЖЧВ в сочетании с АГ, феррогалом или КСПА, имела место гиперплазия лимфатических фолликулов, приводящая к увеличению доли белой пульпы (от общего объема органа) на 2,0–6,0 % ( $p \leq 0,05$ ) по сравнению с показателями 1-й группы животных. Показано, что к 3-м суткам в селезенке белых мышей 2, 3 и 4-й групп, по сравнению с 1-й, наблюдалась пролиферация лимфоцитов, приводящая к увеличению объемных долей периартериальных зон (от общего объема фолликула селезенки) в 2,2–3,1 раза. К 7–14-м суткам объемные доли реактивного центра и мантийной зоны селезенки опытных животных (2, 3, 4-й групп) на 1,2–1,7 и 1,3–1,8 % соответственно, превышали таковые показатели у мышей 1-й группы, а к 21-м суткам наблюдалось их снижение.

В реактивном центре и периартериальной зоне селезенки у мышей, иммунизированных комплексом ЖЧВ и иммуномодуляторами (АГ, КСПА или феррогал), в ранние сроки наблюдения имеет место увеличение количества малодифференцированных бластов от 8 до 27 % на 3-и сутки и от 16 до 35 % на 7-е (при  $p \leq 0,05$ ) по сравнению с первой группой (жи-

вотные иммунизированные ЖЧВ). Таким образом, количество зрелых лимфоцитов как в мантийной, так и в краевой зонах увеличивается к 14–21-м суткам на 2–6 и 4–9 % (при  $p \leq 0,05$ ) по сравнению с 1-й группой.

Во всех зонах лимфатического фолликула у животных экспериментальных групп к 7-м суткам наблюдения отмечено незначительное возрастание количества ретикулярных клеток и макрофагов, которые в реактивном центре селезенки участвуют в селекции лимфоцитов, а также фагоцитируют дефектные и погибшие клетки; в периартериальной зоне стимуляцию бласттрансформации Т- и В-лимфоцитов выполняют ретикулярные клетки. Причем, показатели ретикулярных клеток в этих двух зонах на 9–26 и 15–33 % (при  $p \leq 0,05$ ) больше у животных 2, 3, и 4-й опытных групп, чем в 1-й. Количество макрофагов в реактивном центре, мантийной и краевой зонах селезенки мышей, иммунизированных ЖЧВ в сочетании с иммуномодуляторами, во все сроки наблюдения на 3–15; 27–38; 9–23 % соответственно больше, чем у животных 1-й группы. Это указывает на активацию фагоцитирующих клеток, которые обладают киллерной активностью, а также выполняют функцию как антигенпредставляющих, так и продуцирующих регуляторы иммунного ответа (цитокины), что в свою очередь имеет значение при чуме.

Установлено, что содержание плазматических клеток в мантийной зоне лимфатического фолликула селезенки во все сроки наблюдения у мышей 2, 3 и 4-й групп было выше, чем в 1 группе, и достигало максимума на 7-е сутки с последующим снижением, причем характер снижения показателей неоднозначен.

Таким образом, изменения клеточного состава (увеличение бластоцитарной и плазмоцитарной активности, гиперплазия ретикулярной ткани, лимфоидная гиперплазия) лимфатических фолликулов селезенки и лимфоузлов свидетельствует об усилении иммуноцитопоэтических функций органов иммунной системы, что является важным показателем перестройки организма в условиях антигенной стимуляции (иммунизации ЖЧВ). Полученные в ходе экспериментальной работы данные могут быть использованы как для прогнозирования развития патологических процессов, так и для степени заинтересованности иммунокомпетентных органов в адаптивном процессе к препаратам.

Арабиногалактан и нанобиокомпозиты на его основе (феррогал и КСПА) при сочетанном применении с ЖЧВ усиливают иммуноцитопоэтическую функцию органов иммунной системы в большей степени, чем ЖЧВ. Это обстоятельство открывает перспективы для изучения механизмов иммунокорректирующего действия препаратов растительного происхождения и синтезированных на их основе металло-содержащих нанокompозитов, а также возможность их использования в медицинской практике.

Таблица 3

Клеточный состав лимфоузлов белых мышей, иммунизированных вакцинным штаммом чумного микроба ЕВ линии НИИЭГ в сочетании с КСПА (M±m)

Зоны	Клетки	Срок наблюдения, сут			
		3	7	14	21
РЦ	БК	12,6±0,5*	18,0±0,4*	14,0±0,4*	10,6±0,2*
	Л	38,6±0,6	35,2±0,7*	36,8±0,4*	36,9±0,4
	МЛ	14,5±0,5*	11,1±0,3	12,8±0,3	11,9±0,4
	РК	2,2±0,2*	3,1±0,1	3,5±0,2	3,3±0,1
	МФ	2,1±0,1	2,5±0,1*	2,6±0,1*	2,2±0,2
КУ	МЛ	88,6±0,6	89,7±0,2*	92,1±0,2**	99,3±0,3**
	РК	3,1±0,2	3,6±0,1	4,2±0,1*	4,0±0,2*
	ПК	1,6±0,2	8,9±0,2	7,7±0,2*	6,8±0,3*

Примечания: РЦ – реактивный центр; КУ – корона узелка; БК – бластные формы клеток; Л – лимфоциты; МФ – макрофаги; МЛ – малые лимфоциты; РК – ретикулярные клетки; ПК – плазматические клетки; \*  $p \leq 0,05$  (по сравнению с контролем); \*\*  $p \leq 0,01$ .

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М.: Медицина; 1990. 384 с.
2. Александрова Г.П., Медведева С.А., Грищенко Л.А., Дубровина В.И., изобретатели. Металлопроизводные арабиногалактана, способ получения металлопроизводных арабиногалактана. Патент РФ № 2194715 РФ, МПК А61 К 47/48. № 2000 121112; Заявл. 04.08.00; Оpubл. 20.12.02, Бюл. № 35.
3. Бужоркова С.А., Белобородов Р.А., Дальвадянц С.М. Морфологическая характеристика иммунокомпетентных органов морских свинок при ревакцинации живой и химической чумными вакцинами. Пробл. особо опасных инф. 2007; 1(93):69–73.
4. Домарадский И.В. Чума. М.: Наука; 1998. 148 с.
5. Дубровина В.И. Механизмы фагоцитоза и его роль при формировании резистентности к чуме, псевдотуберкулезу и туляремии [автореф. дис. д-ра биол. наук]. Иркутск; 2004. 42 с.
6. Кузнецов С.Л., Мушкамбаров Н.Н., Горячкина В.Л. Атлас по гистологии, цитологии и эмбриологии. М.: МИА; 2002. 373 с.
7. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М.: Мир; 1969. 645 с.
8. Труфакин В.А., Шурлыгина А.В., Робинсон М.В. Морфология. 2005; 4:20–4.

S.A.Vityazeva, T.P.Starovoitova, V.I.Dubrovina, S.A.Medvedeva,  
L.A.Grischenko, T.T.Shkaruba

### Morphological Alterations in Immunocompetent Organs of Animals in Dynamics of Vaccinal Process Caused by Live Plague Vaccine with Immunomodulators

*Anti-Plague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk; Institute of Chemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Science, Irkutsk*

Arabinogalactane isolated from Siberian larch (*Larix sibirica*) and its iron and cobalt nanobiocomposites were selected as immunomodulators to elucidate the possibility of intensification of specific immunity against plague.

Comparative morphometric analysis of immune system organs of white mice inoculated with live plague vaccine (LPV) and its combination with immunomodulators was performed. Experimental data indicate that arabinogalactane and its nanobiocomposites used in combination with LPV increase immunocytopoietic function of immune system organs to larger extent than LPV.

*Key words:* live plague vaccine, immunity, immunomodulators, immunocompetent organs.

Поступила 27.05.08.

УДК 616.988.21:576.8.097.3

**С.В.Генералов, Е.Г.Абрамова, А.К.Никифоров, Е.М.Храмкова, И.А.Шепелёв, Л.В.Савицкая, Л.Н.Минаева, М.В.Галкина, Т.А.Михеева, Н.Н.Кочкалова, М.Н.Киреев**

## ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТА F(ab')<sub>2</sub>-ФРАГМЕНТОВ АНТИРАБИЧЕСКОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИММОБИЛИЗОВАННОГО ПЕПСИНА

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

Разработана биотехнологическая схема получения F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов антирабического иммуноглобулина с помощью иммобилизованного пепсина. Определены оптимальные способы получения иммобилизованного пепсина, подобраны условия ферментативного гидролиза антирабического иммуноглобулина. Проведена оценка протективных свойств препарата F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов антирабического иммуноглобулина, полученного настоящим способом.

*Ключевые слова:* бешенство, антирабический иммуноглобулин, F(ab')<sub>2</sub>-фрагменты, иммобилизованный пепсин.

Среди мер, применяемых для профилактики и лечения ряда инфекционных болезней, большое значение придается иммуноглобулиновым препаратам. Для постэкспозиционной профилактики гидрофобии в медицинской практике широко используется гетерологичный антирабический иммуноглобулин. Согласно данным ВОЗ, в настоящее время препараты гетерологичного антирабического иммуноглобулина являются высокоочищенными и безопасными, однако у 1–2 % пациентов при его введении могут возникнуть побочные реакции [13].

Одним из направлений совершенствования антирабического иммуноглобулина представляется разработка способов дополнительной очистки с помощью ферментативного гидролиза иммуноглобулина с последующим хроматографическим фракционированием [8, 9]. В литературе описано применение различных ферментов для протеолиза иммуноглобулина. Таковыми являются пепсин, папаин, плазмин, химопапаин, фицин, бромелаин, ферменты микроорганизмов – *S. aureus* V8, грибов рода *Aspergillus* [1].

При воздействии пепсина на молекулу иммуноглобулина образуются один F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент и один Fc'-фрагмент. Способность связывать антиген сохраняется в F(ab')<sub>2</sub>-фрагментах, а связывание компонента и связывание ткани сохраняется во фрагменте Fc. Таким образом, удаление Fc-части иммуноглобулина, приводит к ликвидации нежелательных взаимодействий с Fc-рецепторами тканей и уменьшает частоту побочных реакций.

Для ферментативной обработки иммуноглобулина весьма приемлемо использование иммобилизованных протеаз. Работа с иммобилизованными ферментами обеспечивает возможность их многократного применения и быстрого извлечения из реакционной среды, а также позволяет исключить стадию удаления остаточного фермента.

### Материалы и методы

В работе использовали коммерческий препарат иммуноглобулина антирабического лошадиного производства РосНИПЧИ «Микроб». Для проведе-

ния реакций гидролиза применяли кристаллический пепсин (Merck). Имобилизацию пепсина осуществляли методами адсорбции на DEAE-целлюлозе (Merck) [6], сополимеризации фермента [11], осаждения гидроксидом титана (Merck) [5], ковалентным присоединением фермента к следующим носителям: природному силикату [10], полистирольному носителю Dowex AG 1X8 [11], аминогексилэгарозе (Sigma) [12]. Для активации носителей использовали следующие реактивы: аминопропилтриэтоксисилан (Sigma), глутаровый альдегид (Merck), N-циклогексил-N'-(2-морфолиноэтил)-карбодиимид мето-р-толуолсульфонат (Sigma).

Определение протеолитической активности ферментов осуществляли по методу Н.П.Пятницкого [2]. Для определения стабильности иммобилизованный фермент инкубировали в кислой среде (рН 4,5) в течение 18 ч при температуре 37 °С, а затем определяли его протеолитическую активность.

Детекцию продуктов ферментативного гидролиза иммуноглобулина осуществляли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с концентрацией геля 10 % в нередуцирующих условиях. Для хроматографии использовали гель SP-Sepharose-XL (Amersham Biosciences).

Показатели токсичности определяли в соответствии с методическими указаниями МУК 4.1/4.2.588-96 [4]. Специфическую активность определяли в реакции нейтрализации на белых мышках. Анализ результатов проводили по методу Reed и Muench [3].

## Результаты и обсуждение

### *Имобилизация пепсина*

Выбор метода иммобилизации фермента обусловлен решением следующих задач: фермент должен быть стабильным в условиях протекания реакции; процесс иммобилизации не должен вызывать существенную инактивацию фермента; иммобилизованный фермент должен обеспечивать проницаемость для крупной молекулы иммуноглобулина. На этапе конструирования иммобилизованного фермента применяли адсорбционный и ковалентные методы иммобилизации.

Для адсорбционной иммобилизации в качестве носителя использовали DEAE-целлюлозу. Пепсин, иммобилизованный методом адсорбции, оказался нестабильным. При его инкубации в условиях гидролиза активность снижалась с 5,0 до 3,2 ед./мл.

Метод сополимеризации фермента состоит в поперечном сшивании молекул пепсина. В качестве сшивающего агента был использован глутаровый альдегид. Особенностью метода является отсутствие использования носителей для иммобилизации. Пепсин, поперечно сшитый глутаровым альдегидом, обладал сравнительно высокой активностью (90 ед./г) и стабильностью. После инкубации в условиях ферментативного гидролиза иммуноглобулина активность

фермента повышалась до 138 ед./г. Следует отметить, что данный иммобилизованный фермент отличается низкой механической прочностью, при проведении гидролиза препарат частично растворяется в реакционной среде. Эти недостатки делают невозможным его дальнейшее применение.

Протеолитическая активность препарата иммобилизованного пепсина, полученного осаждением гидроксида титана, составила 9,4 ед./мл. Однако в условиях гидролиза иммуноглобулина активность фермента уменьшалась до 7,6 ед./мл. К недостаткам этого метода следует также отнести трудоёмкость отделения препарата от реакционной смеси: мелкие частицы иммобилизованного фермента полностью не осаждаются при центрифугировании и могут проходить через поры фильтра.

Присоединение пепсина к модифицированному природному силикату с помощью глутарового альдегида не дало стабильных положительных результатов. Однако при иммобилизации пепсина с помощью карбодиимида удалось получить иммобилизованный фермент, который практически полностью сохранял протеолитическую активность в условиях гидролиза иммуноглобулина. Активность фермента составила 4,0 ед./г.

Исследования показали, что пепсин, иммобилизованный на носителе Dowex AG 1X8 с помощью глутарового альдегида, обладал сравнительно высокой активностью (9,1 ед./г), однако препарат оказался недостаточно стабильным: при инкубации иммобилизованного фермента в условиях гидролиза, его активность резко уменьшилась до 6,5 ед./г. Пепсин, присоединенный к Dowex AG 1X8 с помощью карбодиимида, отличался более высокой стабильностью. Первоначальная активность иммобилизованного фермента составляла 11,7 ед./г, после инкубации в условиях гидролиза – 10,4 ед./г.

Пепсин, иммобилизованный на аминогексилэгарозе с помощью глутарового альдегида, проявлял высокую протеолитическую активность – 9,4 ед./мл. Препарат оказался стабильным в условиях гидролиза иммуноглобулина: его протеолитическая активность практически не изменилась после инкубации в соответствующих условиях.

В данном исследовании для получения F(ab')<sub>2</sub>-фрагментов выбирали фермент с активностью не менее 3–4 ед./мл, поскольку использование менее активных ферментов приводит к значительному увеличению объема твердой фазы в реакционной среде, что затрудняет перемешивание и способствует снижению скорости реакции. Следует отметить, что высокая стоимость носителей иммобилизованных ферментов также ограничивает их применение. Поэтому для проведения гидролиза был выбран пепсин, иммобилизованный на природном силикате с помощью карбодиимида, поскольку данный ферментный препарат достаточно активен, стабилен, а стоимость носителя, необходимого для его получения, минимальна.

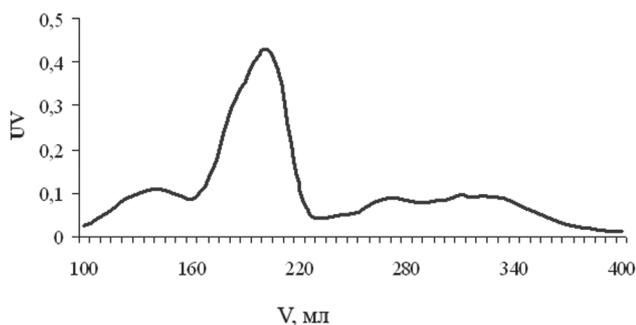


Рис. 1. Профиль элюции продуктов ферментативного гидролиза иммуноглобулина на SP-sepharose-XL

### Получение $F(ab')_2$ -фрагментов антирабического иммуноглобулина

Известно, что для получения  $F(ab')_2$ -фрагментов иммуноглобулина может быть использован раствор пепсина в соотношении 1:50 – 1:100 (по белку) [1]. Количество иммобилизованного фермента, необходимое для гидролиза иммуноглобулина, определяли по протеолитической активности. Для ферментативного гидролиза 1 г белка требовалось такое количество фермента, которое обеспечивало бы 150–200 единиц протеолитической активности.

Гидролиз проводили в условиях перемешивания иммобилизованного фермента с иммуноглобулином. Реакцию гидролиза проводили при 37 °С, затем останавливали извлечением иммобилизованного фермента из реакционной смеси. Было показано, что наиболее эффективно проведение ферментативного гидролиза в 0,1 М ацетатном буфере (рН 4,5) в течение 24 ч при температуре 37 °С. Оптимальная концентрация иммуноглобулина в реакционной смеси при этом должна составлять 20–30 мг/мл.

Для сепарации  $F(ab')_2$ -фрагментов были подобраны условия хроматографического фракционирования продуктов ферментативного гидролиза. Согласно данным литературы, для этих целей широко используется колоночная хроматография на сефадексе, DEAE-целлюлозе, КМ-целлюлозе [1, 7]. В нашей работе использовали колонку размером 5,0 × 30,0 см, заполненную гелем SP-Sepharose-XL. В качестве элюирующего раствора использовали 0,02 М Na-ацетатный буфер, рН 5,5; скорость элюции составляла 4 мл/мин. Такие условия позволяют разделить продукты ферментативного гидролиза на четыре фракции (рис. 1).  $F(ab')_2$ -фрагменты элюировали вторым пиком без примеси целых молекул иммуноглобулина или Fc-фрагментов, как было установлено последующим SDS-электрофорезом в полиакриламидном геле (рис. 2). Фракции, содержащие  $F(ab')_2$ -фрагменты, стерилизовали с помощью фильтров Minisart (диаметр пор 0,2 мкм) и лиофильно высушивали на установке LZ9C. В настоящей работе целью лиофильного высушивания являлось концентрирование препарата. Лيوфильно высушенный препарат в стерильных условиях растворяли в дистиллированной воде до содержания белка 4,2 %. Значение рН препарата со-

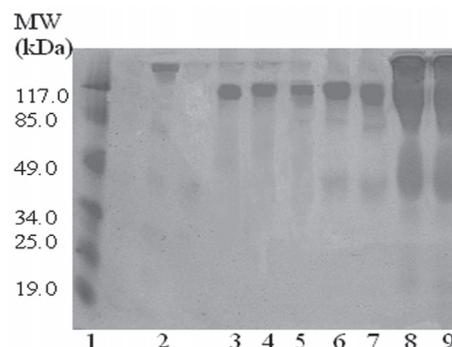


Рис. 2. SDS-ПААГ электрофорез продуктов ферментативного гидролиза антирабического иммуноглобулина:

1 – маркеры молекулярной массы; 2 – антирабический иммуноглобулин (фракция 1); 3–7 –  $F(ab')_2$  – фрагменты антирабического иммуноглобулина (фракция 2); 8–9 – гидролизат антирабического иммуноглобулина

ставил 6,7.

### Исследование токсичности и специфической активности препарата $F(ab')_2$ -фрагментов антирабического иммуноглобулина

На следующем этапе исследовали токсичность и специфическую активность препарата. Как было установлено при проведении тестов на белых мышцах, препарат  $F(ab')_2$ -фрагментов антирабического иммуноглобулина является нетоксичным.

При проведении сравнительного изучения активности исходного иммуноглобулина и препарата на основе  $F(ab')_2$ -фрагментов в биологической реакции нейтрализации на белых мышцах активность препарата  $F(ab')_2$ -фрагментов составила 283 МЕ/мл (значение титра специфических антител – 1:2460), в то время как активность исходного препарата нерасщепленного иммуноглобулина составила 359 МЕ/мл (значение титра специфических антител – 1:3119). Согласно фармакопейной статье предприятия, препарат обладает достаточными защитными свойствами, если его активность составляет не менее 150 МЕ/мл.

Таким образом, разработана технология получения препарата на основе  $F(ab')_2$ -фрагментов антирабического иммуноглобулина с использованием иммобилизованных ферментов, основными этапами которой являются иммобилизация пепсина, ферментативный гидролиз антирабического иммуноглобулина, хроматографическое отделение  $F(ab')_2$ -фрагментов от остатков Fc-части молекулы иммуноглобулина, концентрирование, стерилизующая фильтрация, контроль основных биологических и физико-химических свойств препарата.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алсынбаев М.М., Исрафилов А.Г., Баталова Т.А. и др. Избранные вопросы сывороточного производства. Актуальные вопросы разработки, производства и применения иммунобиологических и фармацевтических препаратов. Уфа; 2000. Ч. 1. С. 108–16.
2. Кушманова О.Д., Ивченко Г.М. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии. М.: Медицина; 1983. С. 175–6.
3. Каплан М.М., Копровски Н., редакторы. Методы лабораторных исследований по бешенству. Третье издание. Женева: ВОЗ; 1975. 360 с.

4. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям: Методические указания. М.: Информационно-издательский центр Минздрава России; 1998. 128 с.
5. Райхер Л.И., Райхер И.И., Фарцейгер Н.Л. и др., изобретатели. Способ получения иммобилизованного коммерческого пепсина. А.с. № 1730148 СССР, МКИ С12N11/14; 30.04.1992.
6. Chen L., Tsao G. Chemical procedures for enzyme immobilization on porous cellulose beads. *Biotechnol. Bioeng.* 1977; 19 :1463–1473.
7. Hong H., Rooijackers E., Ke N. et al. Methods for the purification of equine rabies immunoglobulin: effects on yield and biological activity. *Biologicals.* 1994; 22 :1–6.
8. Lang J., Atanath P., Quiambao B. et al. Evaluation of the safety, immunogenicity, and pharmacokinetic profile of a new, highly purified, heat-treated equine rabies immunoglobulin, administered either alone or in association with a purified, Vero-cell rabies vaccine. *Acta Trop.* 1998; 70:317–333.
9. Lu J., Guo Z., Han W. et al. Preparation and development of equine hyperimmune globulin F(ab')<sub>2</sub> against severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Acta Pharmacol. Sin.* 2005; 26 :1479–84.
10. Puvanakrishnan R., Bose S. Immobilization of pepsin on sand: preparation, characterization and application. *Indian J. Biochem. Biophys.* 1984; 21:323–326.
11. Sannier F., Piot J.M., Guillochon D. et al. Stabilization of pepsin on duolite for continuous hydrolysis of bovine haemoglobin at pH 2 and 40 °C. *Biotechnology techniques.* 1993; 7(1):25–30.
12. Tomono T., Suzuki T., Tokunaga E. Cleavage of human serum immunoglobulin G by immobilized pepsin preparation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1981; 660:186–192.
13. WHO Expert Consultation on Rabies: first report. Geneva; 2004. 121 p.
- S.V.Generalov, E.G.Abramova, A.K.Nikiforov, E.M.Hramkova, I.A.Shepelev, L.V.Savitskaya, L.N.Minaeva, M.V.Galkina, T.A.Miheeva, N.N.Kochkalova, M.N.Kireev

#### F(ab')<sub>2</sub>-Fragments of Antirabic Immunoglobulin Production Using Immobilized Pepsin

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Biotechnological scheme for F(ab')<sub>2</sub>-fragments of anti-rabies immunoglobulin production using immobilized pepsin was developed. Optimal ways for immobilized pepsin production were determined, conditions for fermentative hydrolysis of anti-rabies immunoglobulin were sorted out. Protective properties of F(ab')<sub>2</sub>-fragments of anti-rabies immunoglobulin produced by means of this method were assessed.

Key words: rabies, anti-rabies immunoglobulin, F(ab')<sub>2</sub>-fragments, immobilized pepsin.

Поступила 27.05.08.

УДК 616.981.452

**В.И.Дубровина, Е.П.Голубинский, С.А.Витязева, Е.Ю.Марков, В.Б.Николаев, Т.А.Иванова, Ж.А.Коновалова, Т.Т.Шкаруба**

### **ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНОГО АНТИГЕННОГО ПРЕПАРАТА *YERSINIA PESTIS* EV НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ФАГОЦИТАРНОЙ СИСТЕМЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

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

Представлены результаты изучения влияния антигенных комплексов *Y. pestis* EV на функциональную активность клеток фагоцитарной системы морских свинок и белых мышей. Показано, что препарат, приготовленный на основе F1-антигена, мембранной фракции *Y. pestis* EV и иммуномодулятора – арабиногалактана листовенницы сибирской (АГ), вызывает повышение функциональной активности клеток фагоцитарной системы экспериментальных животных (морских свинок), усиливает адгезивную и поглотительную способности перитонеальных макрофагов, интенсивность выработки активных форм кислорода и монооксида азота; оказывает стимулирующий эффект на активность миелопероксидазы и синтез неферментных катионных белков полиморфноядерных лейкоцитов. Антигенный комплекс, приготовленный на основе F1-антигена, мембранной фракции *Y. pestis* EV и АГ, обладает стимулирующим действием на цитокининдуцирующую функцию макрофагов белых мышей, что выражается в усилении продукции цитокинов ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО-α.

*Ключевые слова:* *Yersinia pestis*, антигены, фракция 1 (F1), клеточные оболочки, фагоцитоз, неспецифическая резистентность.

Известно, что многие существующие противочумные вакцины, состоящие из убитых или аттенуированных клеток чумного микроба, недостаточно эффективны и способны вызывать поствакцинальные осложнения [3, 5, 15], поэтому разработка высокоэффективных и слабо реактогенных химических вакцин для специфической профилактики чумы весьма актуальна [1]. В связи с возникшей в последнее время угрозой биотерроризма и высокой вероятностью использования чумного микроба в качестве биологического оружия эта проблема приобретает особую значимость [5, 12].

Ранее нами сообщалось о возможности получения за счет обработки живых клеток *Yersinia pestis* EV раствором бактерицидного детергента цетавло-

на комплексного препарата на основе F1-антигена и мембранной фракции, обладающего высокой протективной активностью и иммунобиологическими свойствами в опытах на мышах [7]. Поскольку в механизмах резистентности к чуме важная роль отводится клеточным факторам, большой интерес при формировании поствакцинального иммунитета представляют структурно-функциональные изменения в клетках системы мононуклеарных фагоцитов. В связи с этим цель работы – изучение влияния на функциональную активность фагоцитов экспериментальных животных комплексного антигенного препарата, приготовленного на основе F1-антигена и мембранной фракции клеток *Y. pestis* EV в сочетании с иммуномодулятором – арабиногалактаном (АГ).

## Материалы и методы

Для извлечения F1-антигена и мембранной фракции – клеточных оболочек (КО) – использовали штамм *Y. pestis* EV линии НИИЭГ. Культуру выращивали на агаре Хоттингера (рН 7,2) в течение 48 ч при 37 °С, смывали забуференным физиологическим раствором. К полученной бактериальной взвеси (100 млрд м.к./мл) добавляли равный объем 0,0625 % раствора катионного детергента цетавлона (cetyltrimethylammonium bromide, «Serva»). Через 72 ч инкубации проводили контроль специфической стерильности. Обеззараженную бактериальную суспензию центрифугировали при 6000 об./мин (центрифуга ОС-6М, Россия) в течение 20 мин при 10 °С, освобождаясь от неразрушенных клеток. Фракцию клеточных оболочек получали центрифугированием супернатанта при 16000 об./мин (центрифуга K25D, Janetzki, Германия) в течение 30 мин на холоде. Для снижения токсичности КО обрабатывали 0,1 % раствором дезоксихолата натрия (2 мг/мл) при комнатной температуре в течение 10 мин, несколько раз отмывали дистиллированной водой и лиофильно высушивали. Из супернатанта выделяли F1-антиген методом изоэлектрического осаждения. Антигенный комплекс (F1+КО) получали путем механического смешивания F1-антигена и мембранной фракции клеток *Y. pestis* EV в соотношении 1:1 (по сухому весу).

Установлено, что этот антигенный комплекс при определенных дозах (62,5–7,8 мкг на мышь) защищает до 100 % белых мышей от последующего заражения вирулентным штаммом *Y. pestis* 2683 в дозе 200 LD<sub>50</sub>. Показано, что протективная активность комплексного препарата может быть усилена за счет использования иммуномодуляторов искусственного (мурамилдипептид) и естественного происхождения (арабиногалактан и бактериальная ДНК) [6, 7].

В качестве иммуномодулятора использовали АГ лиственницы сибирской, любезно предоставленный сотрудниками института химии СО РАН им. А.Е.Фаворского (Иркутск) [8].

Экспериментальной моделью служили морские свинки (300–350 г) и белые мыши (18–20 г). Животных выводили из эксперимента воздушной эмболией сосудов сердца в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Для изучения активности фагоцитов в отношении *Y. pestis* EV использовали переживающую однослойную культуру перитонеальных макрофагов морских свинок интактных и получивших подкожно только *Y. pestis* EV НИИЭГ (живая чумная вакцина – ЖЧВ) в дозе 10<sup>8</sup> м.к. (контроль), либо F1+КО (контроль) или F1+КО в сочетании с АГ (2 мг/кг) [7]. Для воспроизведения фагоцитоза *in vitro* клетки *Y. pestis* EV соединяли с фагоцитами в соотношении 50:1. Эффективность фагоцитоза оценивали по проценту активных макрофагов, фагоцитарному индексу и индексу завершенности фагоцитоза (ИЗФ). Об ак-

тивности кислородзависимого метаболизма (КЗМ) в фагоцитах судили по числу формазанположительных клеток и по степени восстановления тетразолия в диформазан (НСТ-тест) [13]. Интенсивность синтеза монооксида азота (NO) и, следовательно, активность NO-синтазы измеряли через 3 ч контакта фагоцитов с микробами при 37 °С и выражали в мкМ/10<sup>7</sup> фагоцитов [11].

Активность миелопероксидазы (МПО) и содержание неферментных катионных белков (НКБ) фагоцитов определяли цитофотометрически [9] и выражали в условных единицах. Влияние на продукцию цитокинов исследуемых препаратов изучали *in vivo*. Белых мышей иммунизировали *Y. pestis* EV (10<sup>5</sup> м.к.), F1+КО (по 15,6 мкг на мышь) или F1+КО (в той же дозе) в сочетании с АГ (40 мкг на мышь). Для контроля исследовали макрофаги интактных и обработанных иммуномодулятором (АГ – 40 мкг на мышь) мышей. Пробы макрофагов от животных отбирали на 3, 7, 14-е и 21-е сутки после вакцинации. Супернатант, содержащий комплекс цитокинов, получали по методу И.И.Долгушина и соавт. [4]. Цитокины интерлейкин-1 (ИЛ-1), интерлейкин-6 (ИЛ-6), фактор некроза опухоли-α (ФНО-α) идентифицировали в иммуноферментном анализе с помощью моноклональных антител производства Caltag, Канада. Результаты реакции учитывали на приборе ELx808U при λ=490 нм (бланкирование проводили по суспензии макрофагов экспериментальных животных предварительно стимулированных АГ) и выражали в пг/10<sup>7</sup> клеток.

Статистическую обработку проводили общепринятыми методами, рассчитывая среднеарифметические величины, их средние ошибки, доверительный интервал [2].

## Результаты и обсуждение

При изучении влияния ЖЧВ, F1+КО, F1+КО+АГ на адгезивную способность перитонеальных макрофагов морской свинки показано, что все три препарата повышают адгезивную способность макрофагов по сравнению с интактными животными (рис. 1). На 14-е сутки наблюдения зарегистрирован рост индекса адгезии у макрофагов в группе животных, получивших F1+КО и F1+КО+АГ. По стимулирующему влиянию на адгезивную способность F1+КО и F1+КО+АГ достоверно (p≤0,05) превосходили ЖЧВ в этот срок наблюдения. Индекс адгезии у макрофагов животных, получивших F1+КО+АГ, был в 1,2 раза выше (p≤0,05) в сравнении с F1+КО. К 21-м суткам наблюдения значения индекса адгезии в обеих группах выравниваются, но остаются выше, чем у макрофагов иммунизированных ЖЧВ животных (рис. 1).

Как при сочетанном применении F1+КО с АГ, так и без него антигенные комплексы оказывают примерно равной выраженности стимулирующее действие (21-е сутки после введения препаратов) на поглотительную активность фагоцитов.

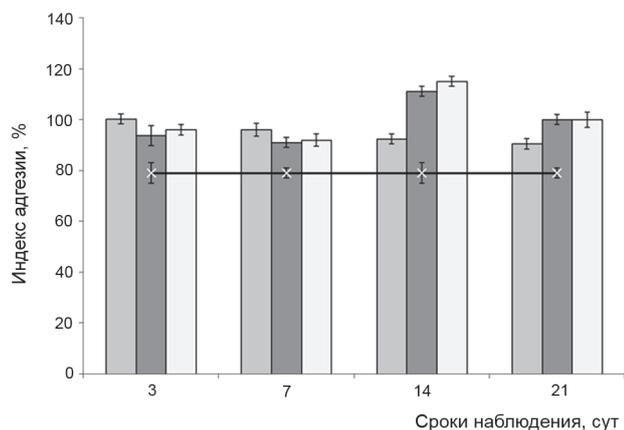


Рис. 1 Влияние живой чумной вакцины; F1+КО; F1+КО+АГ на адгезивную способность перитонеальных макрофагов морской свинки при фагоцитозе *Y. pestis* EV:  
 ■ – ЖЧВ, ■ – КО+F1, □ – КО+F1+АГ, × – АГ

Установлено повышение ИЗФ, свидетельствующего о качественном сдвиге (с  $-87,4 \pm 3,7$  до  $-32,7 \pm 3,2$  в случае F1+КО с АГ и  $-58,7 \pm 6,6$  – F1+КО) в процессе, определяющем судьбу чумного микроба в макроорганизме. Показатели цитопатического действия чумного микроба на макрофаги морских свинок, иммунизированных F1+КО в сочетании с АГ, были значительно ниже ( $4,2 \pm 0,1$  %), чем в других группах животных (F1+КО –  $15,5 \pm 0,2$  % и  $18,2 \pm 0,6$  % в случае живой чумной вакцины).

Судя по увеличению показателей НСТ-теста, антигенные комплексы усиливают выработку активных форм кислорода (АФК) на 14-е – 21-е сутки наблюдения (рис. 2).

Показано, что АГ в сочетании с антигенным комплексом стимулирует повышение выработки АФК перитонеальными макрофагами морской свинки в большей степени, чем при введении F1+КО, что способствует усилению кислородзависимого бактерицидного эффекта фагоцитов в отношении чумного микроба.

Антигенный комплекс, состоящий из F1+КО+АГ,

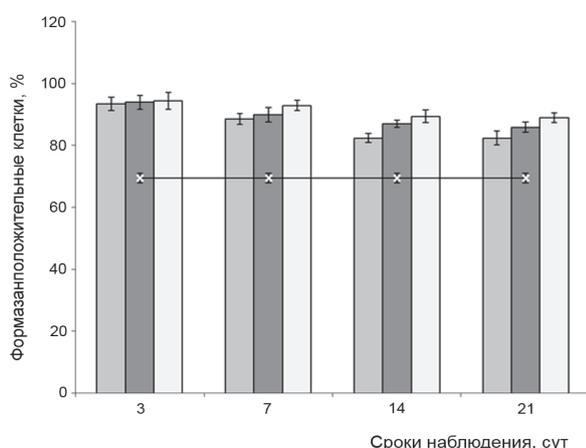


Рис. 2 Влияние живой чумной вакцины и антигенных комплексов на показатели НСТ-теста у нефагоцитирующих макрофагов морских свинок в динамике иммуногенеза ( $M \pm m$ , 30 мин):  
 ■ – ЖЧВ, ■ – КО+F1, □ – КО+F1+АГ, × – АГ

по интенсивности влияния на продукцию NO несколько превосходит F1+КО во все сроки наблюдения (3, 7, 14-е и 21-е сутки). Заметный прирост содержания NO наблюдается уже на 3-и сутки после иммунизации животных и сохраняется в последующие сроки ( $18,0 \pm 1,5$  мкМ/ $10^7$  фагоцитов, при  $p \leq 0,05$ ). При фагоцитозе чумного микроба значительного ингибирования синтеза монооксида азота перитонеальными макрофагами иммунизированных животных (F1+КО –  $12,6 \pm 1,4$  и F1+КО+АГ –  $15,2 \pm 1,6$  мкМ/ $10^7$  фагоцитов) в отличие от показателей у макрофагов интактных морских свинок ( $5,2 \pm 0,4$  мкМ/ $10^7$  фагоцитов, при  $p \leq 0,05$ ) не наблюдается.

ЖЧВ, F1+КО и F1+КО+АГ оказывают стимулирующее воздействие на активность МПО в нефагоцитирующих и фагоцитирующих чумной микроб полиморфно-ядерных лейкоцитах (ПЯЛ) в сравнении с интактными животными во все сроки наблюдения ( $p \leq 0,05$ ).

Отмечено, что ЖЧВ ( $57,0 \pm 0,4$ ) и F1+КО+АГ ( $59,8 \pm 0,6$ ) обладают большим стимулирующим воздействием на активность МПО в нефагоцитирующих ПЯЛ по сравнению с F1+КО ( $55,0 \pm 0,1$ ) на 3-и сутки иммуногенеза ( $p \leq 0,05$ ). Активность фермента в ПЯЛ морских свинок, получивших F1+КО, возрастает с 7-х суток, достигая своего максимума на 14-е сутки ( $59,5 \pm 0,2$ ) с последующим снижением на 21-е сутки после введения антигенного комплекса.

Наибольшим стимулирующим воздействием на активность фермента обладает комплекс F1+КО+АГ, что выражается в высоких по сравнению с остальными антигенами показателях активности МПО в нефагоцитирующих ПЯЛ на 3, 7-е и 21-е сутки иммуногенеза ( $p \leq 0,01$ ). На 14-е сутки после введения экспериментальным животным F1+КО, F1+КО+АГ показатели активности МПО в гранулах нефагоцитирующих лейкоцитов практически не отличались, но были значительно выше, чем в контроле (ЖЧВ). Активность МПО у фагоцитирующих *Y. pestis* EV лейкоцитов животных, получивших F1+КО, F1+КО+АГ, а также интактных была ниже, чем у нефагоцитирующих ( $p \leq 0,01$ ). В случае с ЖЧВ активность фермента как у нефагоцитирующих, так и у фагоцитирующих ПЯЛ не менялась.

Установлено, что ЖЧВ оказывает наиболее стимулирующее воздействие на накопление неферментных катионных белков в гранулах нефагоцитирующих лейкоцитов перитонеального экссудата в сравнении с F1+КО и F1+КО+АГ на 3, 7-е и 14-е сутки иммуногенеза. F1+КО+АГ и F1+КО по уровню содержания НКБ полиморфно-ядерные лейкоциты как фагоцитирующие *Y. pestis* EV, так и нефагоцитирующие клетки достигают максимальные значения (F1+КО+АГ –  $61,2 \pm 0,1$ , F1+КО –  $52,1 \pm 0,1$ ), превышающие контрольные (ЖЧВ –  $50,8 \pm 0,4$ ) к 21-м суткам наблюдения, что свидетельствует о положительном влиянии исследованных антигенных комплексов на кислороднезависимые бактерицидные системы фагоцитов. Вместе с тем в ПЯЛ иммунизированных

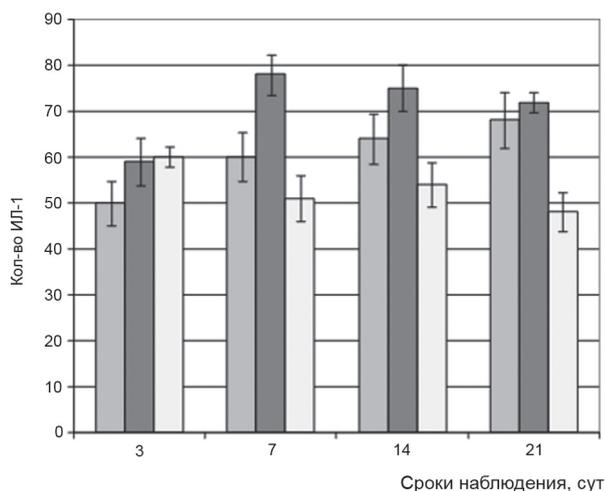


Рис. 3. Продукция интерлейкина-1 макрофагами белых мышей, иммунизированных живой чумной вакциной и антигенными комплексами:

□ – KO+F1, ■ – KO+F1+AG, □ – ЖЧВ

морских свинок экзоцитоз неферментных катионных белков при поглощении чумного микроба происходит более активно, чем в лейкоцитах интактных животных.

В опытах *in vivo* показано, что ЖЧВ активирует синтез перитонеальными макрофагами белых мышей ИЛ-1, ИЛ-6 и ФНО- $\alpha$ . Характер воздействия на продукцию макрофагами ИЛ-1 антигенных комплексов при их введении животным представлен на рисунке (рис. 3).

Наиболее выраженный стимулирующий эффект как F1+КО, так и F1+КО+АГ в отношении ИЛ-1 отмечен на 7–21-е сутки ( $p \leq 0,01$ ) после иммунизации, причем F1+КО+АГ по степени активации продукции ИЛ-1 заметно превосходил F1+КО ( $p \leq 0,05$ ).

Стимулирующее действие исследованных антигенных комплексов на продукцию ИЛ-6 отмечено главным образом на 3-и сутки после иммунизации животных ( $p \leq 0,01$ ), к 7-м суткам оно заметно снижалось, а в последующие сроки было сопоставимым с контрольными значениями или даже уступало последним.

В отношении ФНО- $\alpha$  безусловным активирующим лидером является F1+КО+АГ, стимулирующая роль которого отмечалась во все сроки наблюдения. F1+КО по стимулирующей эффективности был сопоставим с F1+КО+АГ только в ранние (3 сут) сроки наблюдения.

Известно, что фагоцитоз играет ведущую роль в патогенезе чумы [5, 6, 14]. Основными факторами, лимитирующими эффективность фагоцитоза *Y. pestis*, являются ингибирующее влияние микроба на процесс слияния лизосом с фагосомами, процесс нормального высвобождения ФНО- $\alpha$  (и других цитокинов), инициация апоптоза макрофагов, дисбаланс окислительного метаболизма фагоцитов, устойчивость бактерий к лизосомальным ферментам фагоцитов и их способность после эндоцитоза покидать

фагосому, избегая губительного действия микробцидных факторов фагоцита [5, 6, 10]. Отсюда становится ясным, что для повышения эффективности иммунного ответа следует целенаправленно воздействовать на те звенья процесса, которые подвергаются наибольшему супрессивному давлению, т. е. на клеточное звено иммунитета [5, 6]. Поскольку специфические факторы, влияющие на резистентность макроорганизма, не всегда достаточно эффективны при чуме, определенные надежды возлагаются на использование искусственных антигенных комплексов, содержащих в своем составе неспецифические иммуностимуляторы фагоцитоза. Для этой цели перспективными в настоящее время признаны растительные арабиногалактаны. Особое внимание в этой связи привлекает АГ лиственницы сибирской, структура, физико-химические, фармакологические и иммуностимулирующие свойства которого достаточно подробно изучены [6, 8].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что иммунизация экспериментальных животных различными антигенными препаратами в сочетании с АГ лиственницы сопровождается стимуляцией реакций фагоцитов, ответственных за внутриклеточную инактивацию чумного микроба. Это нашло выражение в том, что комплексный препарат, приготовленный на основе F1-антигена, клеточных оболочек *Y. pestis* EV и АГ, повышает функциональную активность фагоцитов экспериментальных животных (морских свинок): усиливает адгезивную и поглощательную способности перитонеальных макрофагов, усиливает интенсивность выработки АФК и NO, оказывает стимулирующий эффект на активность миелопероксидазы и синтез неферментных катионных белков ПЯЛ.

Установлено, что в отношении макрофагов иммунизированных морских свинок цитопатический эффект чумного микроба выражен в меньшей мере, чем макрофагов интактных животных. Получены данные, свидетельствующие об активирующем действии антигенного комплекса на цитокининдуцирующую функцию перитонеальных макрофагов белых мышей, что выражалось в усилении продукции цитокинов ИЛ-1, -6, ФНО- $\alpha$ .

Таким образом, на основании результатов собственных исследований патогенетически обоснованы возможные механизмы биологического действия антигенного комплекса на основе субклеточных фракций *Y. pestis* EV, состоящего из F1-антигена и мембранной фракции чумного микроба как при изолированном применении, так и в сочетании с АГ на иммунокомпетентные клетки при их взаимодействии с чумным микробом.

Установленные в ходе экспериментов данные указывают на перспективность использования новых антигенных комплексов в качестве препаратов, повышающих неспецифическую резистентность против бактериальных патогенов. Это, учитывая ранее обнаруженную высокую протективную активность и

иммунобиологические свойства [7], свидетельствует о возможности их использования для конструирования высокоэффективных средств иммунопрофилактики чумы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева Н.Ю. Конструирование вакцин нового поколения против сальмонеллез и чумы. Иммунология. 1997; 5:14–8.
2. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Изд-во мед. л-ра; 1962. 180 с.
3. Дальвадянц С.М., Дятлов И.А., Еремин С.А., Кутырев В.В. Исследования по иммунизации против чумы. Сообщение 1. Интегральные показатели противочумного иммунитета у белых мышей, привитых живой, инактивированной или химической вакциной. Пробл. особо опасных инф. 2003; 85:127–35.
4. Долгушин И.И., Зурочка А.В., Власов А.В. Секреторные продукты нейтрофилов и иммунный ответ. Иммунология. 1990; 3:35–7.
5. Домарадский И.В. Чума. М.: Наука; 1998. 148 с.
6. Дубровина В.И. Механизмы фагоцитоза и его роль при формировании резистентности организма к возбудителям чумы, псевдотуберкулеза и туляремии (экспериментальное исследование) [дис. ... д-ра биол. наук]. Иркутск; 2004. 261 с.
7. Марков Е.Ю., Николаев В.Б., Загоскина Т.Ю. и др. Протективная активность субклеточных фракций *Yersinia pestis* при экспериментальной чуме у белых мышей. Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. Иркутск, 2004; 2(1):123–7.
8. Медведева С.А., Александрова Г.П., Тюкавкина И.А. и др., изобретатели. Средство, обладающее противоанемической и иммуномодуляторной активностью. Патент РФ № 2208440 РФ, МПК А61 К 31/715, 33/26. Опубл. 20.07.03. Бюлл. № 20.
9. Пигаревский В.Е., Мазинг Ю.А. К методике применения лизосомально-катионного теста в лабораторно-диагностической практике. Лаб. дело. 1981; 10:579–82.
10. Cornelis G.R., Boland A., Boyd A.F. et al. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihist genome. Microbiol. Molec. Biol. Rev. 1998; 62(4):1315–52.
11. Green L.C., Wagner D.A., Glogowski J. et al. Analysis of

nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] in biological fluids. Anal. Biochem. 1982; 126(1):131–8.

12. O'Brien K.K., Higdon M.L., Halverson J.J. Recognition and management of bioterrorism infections. Am. Fam. Physician. 2003; 67(9):1927–34.
13. Park B.H., Firkig S.M., Smithwick E.M. Infection and nitro-blue tetrazolium reduction by neutrophils: a diagnostic aid. Lancet. 1968; 2(7567):532–4.
14. Perry R.D., Fetherston J.D. *Yersinia pestis* – etiologic agent of plague. Clin. Microbiol. Rev. 1997; 10(1):35–66.
15. Williamson E.D., Flick-Smith H.C., Lebutt C. et al. Human immune response to a plague vaccine comprising recombinant F1 and V antigens. Infect. Immun. 2005; 73(6):3598–3608.

V.I.Dubrovina, E.P.Golubinsky, S.A.Vityazeva, E.Yu.Markov, V.B.Nikolayev, T.A.Ivanova, Zh.A.Kononova, T.T.Shkaruba

#### Influence of the Complex *Yersinia pestis* EV Antigenic Preparation Upon the Functional Activity of the Phagocytic System Cells Under Experimental Conditions

Anti-Plague Research Institute for Siberia and the Far East, Irkutsk

Effects of *Y. pestis* EV antigenic complexes upon the functional activity of the phagocytic cells of guinea pig and white mice were assayed to demonstrate that the preparation constructed on the basis of the F1 antigen, *Y. pestis* EV membrane fraction and the Siberian larch arabinogalactane (AG) used as an immunomodulator, was able to increase the functional activities of the phagocytic system in test animals (guinea pigs), enhancing the adhesive and absorptive activity of the peritoneal macrophages and the intensity of active oxygen and nitrate monoxide production, as well as stimulating the activity of myeloperoxidase and the synthesis of non-enzyme cationic polymorphonuclear leucocytes. The antigenic complex prepared on the basis of the F1 antigen, *Y. pestis* EV membrane fraction and AG, was also shown to exert a stimulating effect on cytokine-inducing function of white-mouse macrophages expressed in the increased production of IL-1, IL-6 and FNO- $\alpha$  cytokines.

**Key words:** *Yersinia pestis*, antigens, Fraction 1 (F1), cell walls, phagocytosis, non-specific resistance.

Поступила 12.12.07.

## ДИАГНОСТИКА

УДК 616-073

Н.П.Коннов<sup>1</sup>, Ю.П.Волков<sup>2</sup>, М.Н.Киреев<sup>1</sup>, О.С.Кузнецов<sup>1</sup>

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЕЙВЛЕТ-АНАЛИЗА ДЛЯ ФИЛЬТРАЦИИ ИЗОБРАЖЕНИЙ В ЭЛЕКТРОННОЙ И ЗОНДОВОЙ МИКРОСКОПИИ

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

<sup>2</sup>Саратовский государственный технический университет

Представлены результаты применения программ дискретного и стационарного вейвлет-анализа с целью фильтрации изображения объекта от шумов и повышения его разрешающей способности в электронной и зондовой микроскопии.

**Ключевые слова:** вейвлет-анализ, электронная и зондовая микроскопия.

Большую роль в расшифровке и визуализации фундаментальных механизмов организации и функционирования живой клетки призвана сыграть электронная и зондовая микроскопия.

При исследовании биологических объектов одним из основных условий является повышенное требование к получению максимально возможного разрешения на микрофотографиях. Однако специфика самих объектов способствует созданию нежелательных помех, вызванных наличием загрязнений раз-

личной природы (остатки питательной среды, конгломераты вещества – контрастера, красок, дефекты подложки, различного рода шумов аппаратуры и др.), присутствующих в исследуемом материале и ухудшающих воспроизведение исследуемых субмикроскопических структур.

Для устранения указанных помех используются различные математические методы обработки изображений, в частности, аппроксимация кривыми 1 и 2-го порядков, преобразования Фурье, а для уда-

ления шума – метод медианной фильтрации и различного рода морфологические фильтры [1]. Однако аппроксимирующие кривые не всегда точно повторяют форму дефекта, что приводит к дополнительным искажениям наноструктуры. Преобразование Фурье позволяет аппроксимировать любую форму дефекта, но вносит мелкомасштабные искажения, которые зачастую ухудшают изображение. Поэтому любое существенное усовершенствование методики, повышающей разрешение исследуемого объекта, заслуживает пристального внимания.

Наиболее многообещающим методом увеличения разрешения изображения в настоящее время считается дискретный вейвлет-анализ, способствующий уменьшению шумов, удалению мелких дефектов, повышению контрастности, сжатию и масштабированию [2]. Дискретный вейвлет-анализ позволяет проводить обработку изображений за счет разделения их на высоко- и низкочастотные составляющие, что делает возможным подавление искажений, не затрагивая при этом исследуемой структуры.

Рассмотрим некоторые особенности вейвлет-анализа для обработки микроскопических изображений объектов.

Основы сигналов вейвлет-анализа [2,3] можно представить как функцию  $s(t)$  на заданном уровне разрешения –  $m'$  в виде суммы ее усредненных значений:

$$s(t) = \sum_{k=-\infty}^{\infty} c_{m',k} \varphi_{m',k}(t) + \sum_{m=m}^{\infty} \sum_{k=-\infty}^{\infty} d_{m,k} \psi_{m,k}(t), \quad (1)$$

где  $\varphi_{m',k} = 2^{-m'/2} \varphi(2^{-m'} t - k)$ ,  $\psi_{m,k} = 2^{-m/2} \psi(2^{-m} t - k)$ .

По мере возрастания значения  $m$  увеличивается уровень детализации (разрешения) функции  $s(t)$ .

Таким образом, выражение (1) показывает возможность аппроксимации любой произвольной функции  $s(t)$  набором простых локальных функций  $\varphi_{m,k}(t)$  и  $\psi_{m,k}(t)$ . Первая сумма выражения (1), сумма скейлинг-функций, дает «сглаженные средние» значения функции  $s(t)$  на разных масштабных уровнях, вторая сумма вейвлетных функций добавляет к «грубой» аппроксимации сигнала все более подробные детали.

Для дальнейшего проведения анализа необходимо вычислить коэффициенты  $c_{m',k}$  и  $d_{m,k}$  для чего используется форма быстрых итерационных вычислений (алгоритм Мала [3]):

$$c_{m+1,k} = \sum_n h_n c_{m,2k+n}, \quad (2)$$

$$d_{m+1,k} = \sum_n g_n c_{m,2k+n}, \quad (3)$$

При этом явный вид вейвлета при самом преобразовании не используется, а применяются только значения коэффициентов  $h_n$  и  $g_n$  (приводимые в таблицах [3]). В качестве начальных значений  $c_{0,k}$  обычно принимаются исходные данные  $c_{0,k} = s(t)$ .

Алгоритм обработки изображений состоит в

вейвлет-разложении исходного изображения до заданного уровня и изменения детализирующих коэффициентов (уменьшение – для фильтрации шума и увеличение – для подчеркивания границ), после чего производится обратная операция вейвлет-синтеза изображения. Обратное быстрое вейвлет-преобразование представляет собой последовательную сборку сигнала от больших  $m$  к меньшим:

$$c_{m-1} = \sum_{n \in I} c_{m,n} h_{k-2n} + \sum_{n \in I} d_{m,n} g_{k-2n}, \quad (4)$$

и обеспечивает реконструкцию функции по значениям ее вейвлет-коэффициентов с любого уровня разрешения.

Для обработки микроскопических изображений с учетом особенностей выявления наноразмерных структур применяют различные типы вейвлет-анализа. В данной работе приведены результаты применения ортогональных и стационарных вейвлетов на основе вейвлетов Добеши [2, 3]. Для этого нами были написаны программы в среде Matlab [1, 2] (тексты программ приведены ниже), которые способствовали проведению фильтрации шумов и повышению контрастности электронно- и зондово-микроскопических изображений.

**%Программы дискретного вейвлет-анализа для фильтрации изображения объекта от шумов и повышения его контраста с использованием вейвлетов Добеши.**

**%Программа ортогонального вейвлет-анализа**

%В программе %вместо xxx необходимо вставить %название файла с исходным изображением (формат изображения может быть jpg, %bmp, tif). Желательно, чтобы размер файла %изображения был равен 2 в целой %степенени.

%Параметр Deep- задает глубину фильтрации изображения. Обычно Deep- целое %число больше 1 %и меньше уровня вейвлет-разложения- N.

%Параметр coeff- задает величину преобразования данных вейвлет-анализа.

%При coeff <1 происходит уменьшение данных вейвлет-анализа (снижение шумов и %сглаживание резких перепадов% в изображении), при coeff > 1 происходит %обратный процесс, способствующий повышению контраста изображения. %При coeff=1 данные не изменяются (изображение остается прежним)

X=imread('xxx'); %Загрузка обрабатываемого

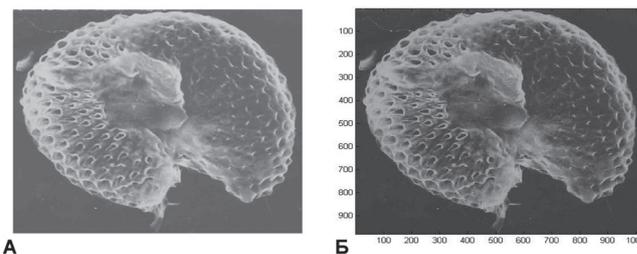


Рис. 1. Преджелудок блохи *Leptopsylla segnis*: А – до обработки, Б – после обработки программой ортогонального вейвлет-анализа.  $\times 500$

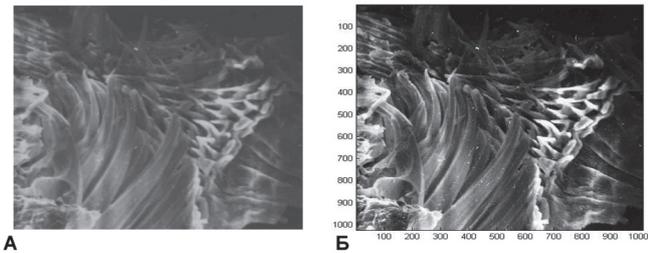


Рис. 2. Аканты разорванного желудка блохи *Leptopsylla segnis*:  
 А – до обработки, Б – после обработки программой стационарного вейвлет-анализа.  $\times 500$

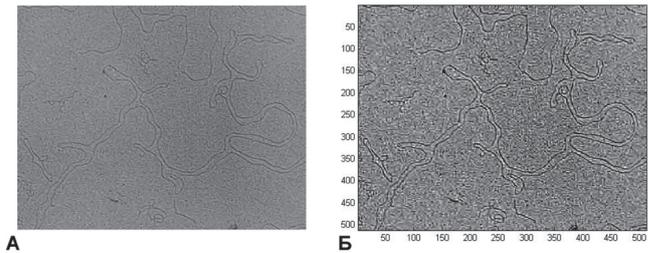


Рис. 3. Молекулы ДНК:  
 А – до обработки, Б – после обработки программой стационарного вейвлет-анализа.  $\times 9000$

```

изображения
dwtmode('per'); % Задание режима продолжения
изображения, необходимого для %корректной ра-
боты программы
N=4;%Уровень разложения
wavename='db3'; %Тип вейвлета ( в данном слу-
чае вейвлет Добеши третьего %порядка)
[C1,S]=wavedec2(X,N,wavename);%Разложение
изображения на заданную глубину N с %исполь-
зование вейвлета wavename
A=S(1,1)*S(1,2);%
Deep=2; %Задание глубины фильтрации
N1=N-Deep;
for i = 2: N1
    A=A+ (S(i,1)*S(i,2))*3;%Расчет положения
коэффициентов вейвлет-разложения
end;
B=A+(S((N1+1),1)*S((N1+1),2))*3;%Расчет по-
ложения коэффициентов вейвлет-%разложения
B1=B+(S((N1+2),1)*S((N1+2),2))*3;%Расчет по-
ложения коэффициентов вейвлет-%разложения
%коэф=0;%Коэффициент обработки (при
0<=коэф<1 происходит удаление шумов; %при
коэф>1- повышение контраста)
C1((A+1):B1)=C1((A+1):B1)*коэф;%Фильтрация
коэффициентов вейвлет-разложения %на заданную
глубину
X1=waverec2(C1,S,wavename);%Восстановление
изображения
colormap(gray(256)); % Задание цветовой пали-
тры (в данном случае изображение в %градациях
серого цвета)
figure(1); image(wcodemat(X1,256));%Вывод
изображения на экран
    
```

**%Программа стационарного вейвлет-анализа**

%В программе %место xxx необходимо вставить %название файла с исходным изображением (фор- мат изображения может быть jpg, %bmp, tif).

```

Размер файла изображения должен быть равен 2
в целой степени.
%Параметр Deep- задает глубину фильтрации
изображения. Обычно Deep- целое %число больше
1 %и меньше уровня вейвлет-разложения- N.
%Параметр коэф- задает величину преобразова-
ния данных вейвлет-анализа.
%При коэф <1 происходит уменьшение данных
вейвлет-анализа (снижение шумов и %сглажи-
вание резких перепадов% в изображении), при
коэф > 1 происходит %обратный процесс, спо-
собствующий повышению контраста изображения.
%При коэф=1 %данные не изменяются (изображе-
ние остается прежним)
X=imread('xxx'); %загрузка изображения
dwtmode('per');% задание моды преобразования
N=5;%Уровень разложения
wavename='sym2'; %Тип вейвлета
[ca,chd,cvd,cdd]=swt2(X,N,wavename);% вейвлет
разложение
Deep=3; % задание глубины преобразования ко-
эффициентов (N1 должно быть не %больше N)
коэф=3; % задание коэффициента преобразова-
ния (коэф>1- усиление контраста, %коэф<1-
сглаживание изображения)
for k=1:Deep % выполнение преобразования ко-
эффициентов на заданную глубину N1
    ca(:,:,k)=ca(:,:,k);
    chd(:,:,k)=chd(:,:,k)*коэф;
    cvd(:,:,k)=cvd(:,:,k)*коэф;
    cdd(:,:,k)=cdd(:,:,k)*коэф;
end;
X=iswt2(ca,chd,cvd,cdd,wavename); %обратное
вейвлет преобразование
colormap(gray(256)); % задание цветовой гаммы
изображения (в данном случае- %градации серо-
го)
figure(1); image(X); %вывод преобразованного
изображения
    
```

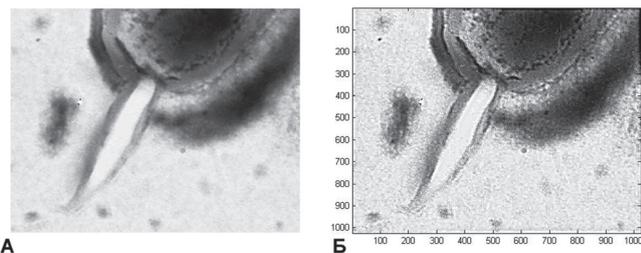


Рис. 4. Жгутик холерного вибриона:  
 А – до обработки, Б – после обработки программой стационарного вейвлет-анализа.  $\times 90000$

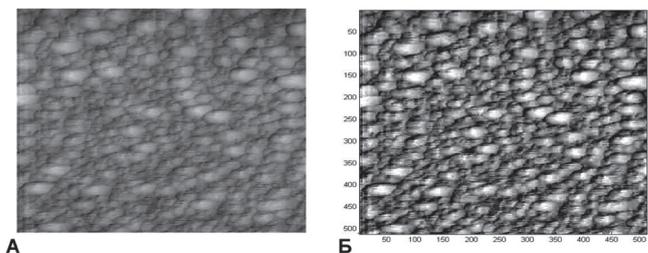


Рис. 5. Изображение кластеров алюминиевой пленки на поверхности полированного кремния, полученное методом зондовой микроскопии, после обработки программой стационарного вейвлет-анализа:  
 А – до обработки, Б – после обработки (размер скана  $6 \times 6$  мкм)

Итак, на примере применения вейвлет-анализа показаны некоторые возможности этого математического аппарата, позволяющего выявить и наглядно показать улучшение разрешающей способности изображения наноструктур при электронной и зондовой микроскопии.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гонсалес Р., Вудс Р., Эддинс С. Цифровая обработка изображений в среде MATLAB. М.: Техносфера; 2006. 616 с.
2. Смоленцев Н.К. Основы теории вейвлетов. Вейвлеты в MATLAB. М.: ДМК Пресс; 2005. 304 с.
3. Добеши И. Десять лекций по вейвлетам. Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика»; 2001. 464 с.

УДК 616.982.27+616.982.27-039:616-07

Д.А.Чухланцев, И.В.Маракулин, И.В.Дармов

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И МЕЖВИДОВОГО ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ САПА И МЕЛИОИДОЗА

ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России», Киров

Проведена оценка возможности идентификации и дифференцирования возбудителей сапа и мелиоидоза методом ПЦР с использованием различных нуклеотидных последовательностей патогенных буркхолдерий. Выбраны праймеры, перспективные для включения в состав тест-системы, предназначенной для выявления ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза в пробах из окружающей среды и в биологических материалах.

*Ключевые слова:* сап, мелиоидоз, выявление, дифференциация, ПЦР.

Несмотря на успехи практической медицины в борьбе с инфекционными заболеваниями, в природе сохраняются резервуары сапной и мелиоидозной инфекций, а значит и вероятность заражения людей в эндемичных районах.

Симптоматика этих заболеваний, особенно на начальных стадиях болезни, весьма разнообразна и не имеет характерных признаков [4, 5]. В связи с этим клиническая диагностика сапа и мелиоидоза значительно затруднена и должна подтверждаться результатами лабораторных исследований.

Методы лабораторной диагностики сапа и мелиоидоза, основанные на бактериологическом и иммунологических методах исследования, позволяют с высокой достоверностью выявлять возбудителей сапа и мелиоидоза, однако занимают длительное время, либо недостаточно специфичны.

Использование полимеразной цепной реакции позволяет упростить проведение диагностических исследований, а главное, значительно сократить время анализа проб.

Публикации, посвященные разработке тест-систем для выявления возбудителей сапа и мелиоидоза методом ПЦР, появились давно, однако возможности исследователей значительно ограничивала недостаточность информации об организации генома этих возбудителей и близкородственных им микроорганизмов.

В последние годы интерес исследователей к возбудителям сапа и мелиоидоза значительно вырос.

N.P.Konnov, Yu.P.Volkov, M.N.Kireev,  
O.S.Kuznetsov

**APPLICATION OF WAVELET-ANALYSIS FOR IMAGE FILTRATION IN ELECTRONIC AND PROBE MICROSCOPY**

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

The review presents the results of application of the programs of discrete and stationary wavelet-analysis for filtration of object image from noise and for the increase of its resolution capability in electronic and probe microscopy.

*Key words:* wavelet-analysis, electronic and probe microscopy.

Поступила 03.11.07.

Это нашло отражение и в увеличении числа работ по секвенированию геномов этих микроорганизмов и установлению связи отдельных генов с факторами патогенности этих возбудителей. Накопление данных об организации генома микроорганизмов рода *Burkholderia* позволило также ближе подойти к решению вопроса дифференцирования возбудителей сапа и мелиоидоза методом ПЦР.

Достоверные результаты по дифференцированию возбудителей сапа и мелиоидоза могут быть получены при использовании риботипирования, ПЦР с произвольными праймерами, определения полиморфизма длины рестрикционных фрагментов, метода мультилокусного сиквенс-типирования [2, 3, 4, 5]. Тем не менее, сложность и трудоемкость этих исследований не позволяют применять их в обычных диагностических лабораториях.

Дифференциация возбудителей сапа и мелиоидоза методом ПЦР – достаточно сложная задача. Анализ литературных данных показывает, что их генетическое сходство очень велико. Высказывается даже предположение о том, что возбудители сапа и мелиоидоза являются разными штаммами одного вида, а не отдельными видами микроорганизмов [2]. Однако, выявленные к настоящему времени различия в организации генома возбудителей сапа и мелиоидоза позволяют предположить, что решение вопроса дифференцирования патогенных буркхолдерий методом ПЦР возможно [8].

Целью данной работы являлась оценка эффек-

тивности выявления возбудителей сапа и мелиоидоза с помощью выбранных специалистами ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России» олигонуклеотидных праймеров, а также оценка возможности дифференциации этих возбудителей на основе описанных в литературе различий в последовательностях генов системы «quorum sensing» и 16S-rПНК [6, 9].

### Материалы и методы

Для идентификации патогенных буркхолдерий использованы выбранные специалистами ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России» олигонуклеотидные праймеры, предназначенные для выявления различных генетических детерминант возбудителей сапа и мелиоидоза.

Оценку возможности дифференциации возбудителей сапа и мелиоидоза проводили с использованием праймеров, описанных в работе P.Ouston и соавт. [6], а также с помощью олигонуклеотидных затравок, выбранных нами на основе различий в последовательностях генов системы «quorum sensing» *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* и 16S-rПНК. Праймеры синтезированы специалистами ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России» фосфоамидитным методом с последующей очисткой их методом ВЭЖХ.

Для оценки праймеров в ПЦР использовали препараты ДНК *B. mallei* штаммов Ц-5, 5584, Иванович, Будапешт, *B. pseudomallei* штаммов С-141, Duc-V, Dalat а также 9 штаммов *Burkholderia cepacia*, выделенных от больных людей и 9 штаммов разных видов, принадлежащих к роду *Pseudomonas* (*P. bovisepiticum*, *P. aeruginosa*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. allicola*, *P. testosteroni*, *P. stutzeri*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. marginata*).

Обеззараживание исследуемых проб осуществляли в соответствии с требованиями санитарных правил (СП 1.3.1285-03). Подготовку проб для анализа методом ПЦР осуществляли с использованием «Набора для подготовки проб к исследованиям методом ПЦР» производства ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России».

### Результаты и обсуждение

При выборе генетических детерминант, предназначенных для выявления возбудителей инфекционных заболеваний, общепринятым является использование консервативных нуклеотидных последовательностей, а также генов, обеспечивающих проявление микроорганизмами патогенных свойств.

В работах по идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза использовали последовательности генов, кодирующих 16S-rПНК и 23S-rПНК, которые, по данным литературы, являются наиболее консервативными участками генома различных микроорганизмов, а также последовательности генов капсулярного полисахарида 1 типа, вклад которого в виру-

лентность возбудителей сап и мелиоидоза показан в ряде научных публикаций [1, 7].

В ходе исследований было установлено, что использование в ПЦР праймеров, выбранных на основе последовательности генов, кодирующих 16S-rПНК и генов капсулярного полисахарида 1 типа, обеспечивает выявление в анализируемой пробе ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза в концентрации, соответствующей  $10^2$  м.к. в 1 мл пробы, при отсутствии ложноположительных реакций с ДНК близкородственных видов микроорганизмов. Аналогичные результаты были получены и при использовании праймеров, выбранных на основе последовательности гена, кодирующего 23S-rПНК. Однако ПЦР с использованием этих праймеров обеспечивала выявление в анализируемой пробе ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза в концентрации, соответствующей  $10^3$  м.к. в 1 мл пробы, что согласуется с литературными данными.

Эффективность выявления ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза с использованием выбранных праймеров была также подтверждена при исследовании биопроб, взятых от лабораторных животных, зараженных возбудителями сапа. При исследовании в ПЦР проб тканей легких, печени и селезенки инфицированных животных (обезьян *Papio hamadryas*), во всех случаях были получены положительные результаты.

Исследования генетической организации 16S-rПНК различных штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза, проведенные зарубежными исследователями, позволили выявить различия в нуклеотидных последовательностях *B. mallei* и *B. pseudomallei* [2]. Выявленные различия незначительны, тем не менее авторы предложили использовать их для дифференцирования *B. mallei* и *B. pseudomallei*.

Выбранные с учетом этих различий праймеры В16-1, 2 не позволяли дифференцировать *B. mallei* и *B. pseudomallei*. Образование специфического амплификата наблюдали при проведении ПЦР с ДНК как возбудителя сапа, так и возбудителя мелиоидоза.

Большой, по нашему мнению, интерес представляет одна из последних работ F.M.Thibault и соавт., посвященная изучению генетической организации системы «quorum sensing» возбудителей сапа и мелиоидоза [8]. Авторами показано, что организация этой части генома сапного микроба в значительной мере отлична от системы «quorum sensing» возбудителя мелиоидоза. Главное отличие заключается в отсутствии у возбудителя сапа генов bpmI2 и bpmR2, присутствующих в геноме возбудителя мелиоидоза [8].

Для оценки возможности использования указанных различий в структуре геномов возбудителей сапа и мелиоидоза для дифференциации этих видов микроорганизмов нами были выбраны и синтезированы праймеры, комплементарные последовательностям генов bpmI2 и bpmR2, а также 16S-rПНК. Результаты исследований, проведенных с использованием синтезированных праймеров, представлены в таблице,

Оценка специфичности праймеров с использованием препаратов ДНК, выделенных из различных видов микроорганизмов

Штаммы	Наличие амплификата при проведении ПЦР с праймерами ...					
	B16-1 B16-2	Bpm12-11 Bpm12-12	Bpm12-21 Bpm12-22	Bpm12-31 Bpm12-32	Bpm12-f Bpm12-r	BpmR2-f BpmR2-r
<i>B. mallei</i> Ц-5	+	-	-	-	-	-
<i>B. mallei</i> 5584	+	+	+	+	+	+
<i>B. mallei</i> Иванович	+	+	+	+	+	+
<i>B. mallei</i> Будапешт	+	-	-	-	-	-
<i>B. pseudomallei</i> C-141	+	+	+	+	+	+
<i>B. pseudomallei</i> Duc-V	+	+	+	+	+	+
<i>B. pseudomallei</i> Dalat	+	+	+	+	+	+
<i>B. cepacia</i> Б-306	-	-	-	-	-	-
<i>B. cepacia</i> Б-506	-	-	-	-	-	-
<i>B. cepacia</i> Б-402	-	-	-	-	-	-
<i>B. cepacia</i> Б-0499	-	-	-	-	-	-
<i>B. cepacia</i> L-14	-	-	-	-	-	-
<i>B. cepacia</i> L-98	-	-	-	-	-	-
<i>B. cepacia</i> L-95	-	-	-	-	-	-
<i>B. cepacia</i> L-97	-	-	-	-	-	-
<i>B. cepacia</i> L-89	-	-	-	-	-	-
<i>P. bovisepiticum</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. pseudoalcaligenes</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. allicola</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. marginata</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. testosteroni</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. stutzeri</i>	-	-	-	-	-	-
<i>P. putida</i> 1	-	-	-	-	-	-
<i>P. putida</i> 2	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 803	-	-	-	-	-	-

из которой видно, что праймеры, комплементарные последовательностям генов *brmI2* и *brmR2* не позволяют достоверно дифференцировать возбудителей сапа и мелиоидоза, поскольку специфический амплификат образуется не только при использовании ДНК возбудителя мелиоидоза, но и ДНК штаммов возбудителя сапа. Однако использованные праймеры позволяют дифференцировать отдельные штаммы возбудителя сапа, в том числе и высоковирулентный штамм Ц-5 *B. mallei*, который широко используется при проведении экспериментальных исследований. При анализе проб ДНК близкородственных и гетерологичных видов микроорганизмов образования специфических амплификатов не наблюдали, а чувствительность ПЦР с использованием данных праймеров составляла 10<sup>2</sup> м.к. в 1 мл исследуемой пробы.

Дифференцировать *B. mallei* и *B. pseudomallei* на основе описанных в литературе различий в последовательностях генов 16S-rРНК и системы «quorum sensing» нам не удалось. Данные о специфичности праймеров, выбранных на основе нуклеотидных последовательностей системы бактериального кворума генов *B. mallei* и *B. pseudomallei* указывают на значительные отличия в организации системы бактериаль-

ного кворума у разных штаммов *B. mallei*.

В результате выполненных исследований была показана возможность использования для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза нуклеотидных последовательностей генов 16S-rРНК и генов, кодирующих капсулярный полисахарид 1 типа *B. mallei* и *B. pseudomallei*. Чувствительность ПЦР-анализа с выбранными праймерами составляет 10<sup>2</sup> м.к. в 1 мл исследуемой пробы. Выбранные праймеры перспективны для включения в состав тест-системы, предназначенной для выявления ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза в пробах из окружающей среды и в биологических материалах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мелиоидоз. Сб. науч. тр. под ред. акад. Н.Г. Тихонова. Волгоград: Ниж.-Волж. кн. изд-во; 1995. 224 с.
2. 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; 41:2068–79.
3. Haase A., Melder A., Smith-Vaughan H., Kemp D., Currie B. RAPD analysis of isolates of *Burkholderia pseudomallei* from patients with recurrent melioidosis. Epidemiol. Infect. 1995; 115(1):115–21
4. Inglis T.J., O'Reilly L., Foster N., Clair A., Sampson J. Comparison of rapid, automated ribotyping and DNA macrorestriction analysis of *Burkholderia pseudomallei*. J. Clin. Microbiol. 2002;

40(9):3198–203.

5. Leelayuwat C., Romphruk A., Lulitanond A., Trakulsomboon S., Thamlikitkul V. Genotype analysis of *Burkholderia pseudomallei* using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD): indicative of genetic differences amongst environmental and clinical isolates. Acta Trop. 2000; 77(2):229–37.

6. Oyston P., Ulrich R., Jeddalon J. Пат. No. 60/396 WO2004006857. Glanders/Melioidosis Vaccines. США.

7. Reckseidler S.L., DeShazer D., Sokol P.A., Woods D.E. Detection of Bacterial Virulence Genes by Subtractive Hybridization: Identification of Capsular Polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* as a Major Virulence Determinant. Infect. Immun. 2001; 69(1):34–4.

8. Thibault F.M., Valade E., Vidal D.R. Identification and discrimination of *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, and *B. thailandensis* by real-time PCR targeting type III secretion system genes. J. Clin. Microbiol. 2004 Dec; 42(12):5871–4.

9. Tyler S.D., Strathdee C.A., Rozee K.R., Johnson W.M. Oligonucleotide primers designed to differentiate pathogenic pseudomonads on the basis of the sequencing of genes coding for 16S-23S rRNA internal transcribed spacers. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 1995; 2(4):448–53.

D.A.Chuhlantsev, I.V.Marakulin,  
I.V.Darmov

**Application of PCR  
for Identification and Interspecific Differentiation  
of Glanders and Melioidosis Etiological Agents**

The 48<sup>th</sup> Central Scientific Research Institute of the RF Ministry of Defens,  
Kirov

Assessed were possibilities of identification and differentiation of glanders and melioidosis etiological agents by means of PCR method using different nucleotide sequences of the pathogenic *Burkholderia*.

Primers perspective for inclusion in the test-system assigned for detection of glanders and melioidosis etiological agents DNA in environmental samples and biological materials were selected.

*Key words:* glanders, melioidosis, detection, differentiation, PCR.

Поступила 26.02.08.

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 616.981.452

Л.В.Самойлова

### СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РАЗВИТИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ФОРМ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧУМЫ ПРИ АЭРОГЕННОМ И ПОДКОЖНОМ ЗАРАЖЕНИИ ВИРУЛЕНТНЫМИ ШТАММАМИ *Y. PESTIS* И ИХ ИЗОГЕННЫМИ ВАРИАНТАМИ С РАЗЛИЧНЫМ ПЛАЗМИДНЫМ ПРОФИЛЕМ

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

Представлены обобщенные результаты сравнительных исследований по развитию экспериментальной чумы у лабораторных животных после аэрогенного и подкожного заражения вирулентными штаммами *Y. pestis* (pFra<sup>+</sup>, pCad<sup>+</sup>, pPst<sup>+</sup>, pgm<sup>+</sup>) и их изогенными вариантами с утратой pFra и/или pPst. В зависимости от пути передачи инфекции и дозы возбудителя один и тот же штамм и его изогенные варианты вызывает как легочную, так и бубонно-септическую форму чумы у лабораторных животных. Показано, что у лабораторных животных, зараженных аэрогенно и подкожно изогенными вариантами *Y. pestis*, лишенными плазмид pPst или pPst/pFra, выращенными при 28 °С на агаре Хоттингера, развивается затяжной инфекционный процесс.

*Ключевые слова:* чумной микроб, штамм, изогенный вариант, аэрогенное заражение, легочная чума.

В связи с успехами в области молекулярной биологии, расшифровкой генома возбудителя чумы, характеристикой вирулентности в зависимости от генотипа возбудителя стал возникать вопрос, особенно в последние два десятилетия, о роли генотипа возбудителя чумы в развитии той или иной клинической формы болезни. Однако к настоящему времени влияние детерминант вирулентности *Y. pestis* на развитие легочной формы чумы не установлено.

В связи с этим проведено обобщение результатов исследований по определению роли генотипа чумного микроба в развитии легочной формы чумы. Для этого были получены изогенные варианты вирулентных штаммов возбудителя с различными наборами двух собственных плазмид чумного микроба (pFra и pPst) при сохранении всеми вариантами плазмиды pCad.

*Штаммы.* Использовали три вирулентных штамма *Y. pestis* 231, 358, 629М и изогенные варианты штаммов 358 и 629М, утратившие собственные

плазмиды pFra и/или pPst. Изогенные варианты получали путем направленного конструирования в отделе генетики РосНИПЧИ «Микроб». Штаммы выращивали при 28 °С на агаре Хоттингера, рН 7,2±0,2.

Аэрогенно заражали морских свинок весом 300–350 г и беспородных белых мышей весом от 20 до 25 г в аэродинамической камере и рассчитывали аспирационную дозу по методике Л.В. Самойловой и Н.И. Николаева [1, 3]. Подкожное заражение проводили общепринятым методом. После заражения вели наблюдение в течение 14 дней и подсчитывали LD<sub>50</sub> и СТ<sub>50</sub> (50 % летальная доза для аэрогенного заражения) штаммов по формуле Кербера. Бактериологическое, морфологическое и гистологическое исследования проводили общепринятыми методами. Все исследования проводили в соответствии с Инструкцией по режиму работы с аэрозолями возбудителей особо опасных инфекций (1976) и СП 1.3.12.85-03 «Безопасность работы с микроорганизмами».

низмами I–II групп патогенности (опасности)».

Многочисленными опытами, проведенными нами, установлено, что для аэрогенного заражения морских свинок и белых мышей требуется доза, намного превышающая дозу подкожного заражения. LD<sub>50</sub> для подкожного заражения вирулентными штаммами чумного микроба как морских свинок, так и белых мышей находилась в пределах 5–25 КОЕ.

Для аэрогенного заражения вирулентными штаммами СТ<sub>50</sub> для морских свинок составляет 500 КОЕ, а для белых мышей – 2000–2230 (1580–3140) КОЕ. Различия в величине показателей можно объяснить более извилистыми верхними дыхательными путями у белых мышей, чем у морских свинок и некоторыми особенностями защитных механизмов верхнего дыхательного тракта этих животных [3].

В экспериментах по заражению морских свинок изогенными вариантами *Y. pestis* 358 (контроль – полноценный штамм) показано, что все изогенные варианты *Y. pestis* вызывали при аэрогенном заражении летальный инфекционный процесс, характеризующийся как первичная легочная чума морских свинок. Значительных, статистически достоверных различий по величине СТ<sub>50</sub> и срокам жизни морских свинок, у штаммов чумного микроба, лишенных pFra и pPst, не было, наблюдалось лишь некоторое увеличение СТ<sub>50</sub>. Проведенное подкожное заражение этими же штаммами позволяет отметить статистически достоверную тенденцию к увеличению сроков жизни у морских свинок, зараженных вариантами штаммов, у которых отсутствуют в геноме две плазмиды pFra и pPst.

Штаммы чумного микроба, полноценные по плазмидному профилю (*Y. pestis* 231, 358, 629M), а также лишенные pFra (*Y. pestis* 358/12), были вирулентными для белых мышей при аэрогенном и подкожном заражении. У всех павших от чумы белых мышей бактериологически и морфологически наблюдалась первичная легочная чума.

Штамм *Y. pestis* 629M (pPst<sup>-</sup>) вызывал затяжной инфекционный процесс. Для этого изогенного варианта СТ<sub>50</sub> составляла >4·10<sup>4</sup> КОЕ, т.е. на порядок выше цифр СТ<sub>50</sub> исходного штамма. У другого изогенного варианта *Y. pestis* 358/12 (pFra<sup>-</sup>, pPst<sup>-</sup>) отмечено еще более медленное развитие инфекции и уменьшение обсемененности органов и тканей мышей бактериями чумы. Эти опыты подтвердили результаты, полученные в экспериментах на морских свинках, где также были отмечены затяжные формы и медленное течение инфекции при заражении штаммами, лишенными плазмид pFra, pPst или pPst.

Проведенное морфологическое и бактериологическое исследование органов и тканей аэрогенно зараженных белых мышей показало, что первичная аэрогенная пневмония («первичный аффект») при заражении исходными (полноценными) штаммами и штаммами, лишенными плазмид, характеризовалась обширными, множественными, быстро прогрессирующими воспалительными очагами с некрозами,

накоплением микробов, гибелью фагоцитов и отсутствием признаков пролиферации.

Для всех «дефектных» штаммов характерны более мелкие и медленно развивающиеся, не склонные к слиянию пневмонические очаги. В большинстве случаев эти штаммы вызывали изменения, которые включали гранулемы и инкапсулированные абсцессы, т.е. имели признаки перехода к подострому процессу и локализованной форме чумы.\*

Таким образом показано, что все изогенные варианты от *Y. pestis* 358 и 629M вызывают у морских свинок и белых мышей при аэрогенном заражении первичную легочную чуму. Однако изогенные варианты штаммов, лишенные pFra, pPst или pPst, вызывали более затяжной инфекционный процесс (удлинение жизни). Кроме того, величины СТ<sub>50</sub> и LD<sub>50</sub> превышали таковые для полноценного штамма.

Таким образом, проведенные исследования в данных условиях опытов показали, что для развития легочной чумы в эксперименте играет роль только вирулентность штамма, путь передачи и восприимчивость к инфекции, что подтверждает мнение Д.И.Заболотского и Wu Lien The, высказанное во время эпидемии чумы в начале XX века [2, 4]. Варианты изогенных штаммов *Y. pestis* вызывают легочную чуму при аэрогенном заражении и бубонно-септическую при подкожном заражении. Отмечена более затяжная форма чумной инфекции у лабораторных животных при аэрогенном и подкожном заражении их штаммами *Y. pestis*, лишенными плазмид pPst pFra или только pPst, выращенных при 28 °C на агаре Хоттингера.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимов П.И., Наумов А.В., Белобородов Р.А. и др. Общие сведения о чуме. Рук-во по профилактике чумы. Наумов А.В., Самойлова Л.В., редакторы. Саратов; 1992. 276 с.
2. Заболотный Д.К. Легочная чума в Манчжурии в 1910–1911 гг. Отчет русской научной экспедиции. Пг.; 1915. Т. 1, 2.
3. Храмов В.Н. Некоторые особенности клинко-лабораторного обследования на чуму [автореф. ... канд. мед. наук]. Саратов, 1994.
4. Wu Lien The, Chun, Pollitzer, Wu. Plague. A. Manuel for Medical and Public Health Workers, 1936.

L.V.Samoilova

#### **A Comparative Study of the Development of Clinical Forms of Experimental Plague after Aerogenic or Subcutaneous Challenge with Virulent *Y. pestis* Strains and their Isogenic Variants Containing Different Plasmid Combinations**

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

Reviewed in the work are the results of comparative studies of experimental plague infection development in test animals after their aerogenic or subcutaneous challenge with virulent *Y. pestis* strains (pFra<sup>+</sup>, pCad<sup>+</sup>, pPst<sup>+</sup>, pgm<sup>+</sup>) and their isogenic variants, lacking pFra and/or pPst. Any virulent strain and its isogenic variants were shown to produce both pulmonary and bubonic-septicemic forms of plague depending on the infection transmission route and the dose of the pathogen. The test animals infected via aerogenic and subcutaneous routes with isogenic *Y. pestis* deprived of their pPst or pPst/pFra plasmids and grown in Hottinger agar at 28 °C developed a lingering infection.

*Key words:* the plague pathogen, strain, isogenic variant, aerogenic infection, pulmonary plague.

Поступила 13.06.08.

\*Морфологические исследования проведены Р.А.Белобородовым.

Т.А.Чурбанова

## ПРИРОДНЫЕ ОЧАГИ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ С ПОЧЕЧНЫМ СИНДРОМОМ В РЕСПУБЛИКЕ МОРДОВИЯ

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

Проведено ландшафтно-экологическое районирование природных очагов ГЛПС, выделено 3 зоны и 13 природных очагов на территории РМ. Определены места заражения людей и показатели коллективного иммунитета к ГЛПС в ряде природных очагов. Проведено эпизоотологическое обследование, инфицированы хантавирусом 4,1 % грызунов. Постоянный мониторинг за природными очагами ГЛПС необходим для проведения своевременной заблаговременной профилактики этого заболевания.

*Ключевые слова:* ГЛПС, природные очаги, ландшафтно-экологическое районирование, эпизоотологическое обследование.

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) наиболее распространенное природно-очаговое заболевание вирусной этиологии в Республике Мордовия (РМ). Интенсивный показатель заболеваемости на 100 тыс. населения (ИП) в РМ с 2001 по 2006 год колебался от 10,5 до 18,0, а среднеемноголетний за этот период составил  $14,4 \pm 1,1$  и превышал аналогичную величину в Российской Федерации в 2,8 раза. При проведении ландшафтно-экологического районирования территории РМ выделены три зоны: Западная, Центральная и Восточная. Во всех зонах заражения ГЛПС преобладали на территориях широколиственных лесов и сельскохозяйственных угодий. Наиболее активные природные очаги ГЛПС расположены в Восточной и Центральной зонах.

На территории РМ с 1999 г. выявлено 13 природных очагов ГЛПС: Сабаевский, Рузаевский, Чамзинский, Большеберезниковский, Симкинский, Старошайговский, Большеигнатовский, Мельцанский, Берсеневский, Атемарский, Елховский, Лямбирский, Кочкуровский.

Заболевания ГЛПС в РМ регистрируются с 1964 г. По наблюдению с 1999 г. прослеживается двухлетняя цикличность с подъемом заболеваемости по нечетным годам. В Рузаевском природном очаге ИП составлял в 1999 г. 53,1; в 2001 г. – 29,0; в 2003 г. – 77,3; в 2000, 2002, 2004 и 2006 гг. – 9,6, 19,3, 29,0, 36,8 соответственно. Аналогичная тенденция прослеживается в Чамзинском, Большеберезниковском, Симкинском, Большеигнатовском, Мельцанском, Берсеневском, Атемарском, Елховском, Кочкуровском природных очагах.

В Старошайговском очаге наблюдаются подъемы заболеваемости через два – три года, в основном в четные годы, в 2002, 2004, 2006 гг. ИП равнялся 17,0, 11,4, 22,7 соответственно (при отсутствии больных в 2003 и 2005 гг.). В Лямбирском очаге подъемы заболеваемости также выявляются через два – три года, в 2000, 2003, 2006 гг. ИП равнялся 21,9, 16,9, 21,9 соответственно. В Сабаевском очаге выявлена тенденция к росту заболеваемости ГЛПС с 1999 по 2006 год в 4,5 раза.

Максимум заражений ГЛПС приходится на период года с июня по декабрь. Заражения людей происходят по месту жительства, при посещении родствен-

ников в сельской местности, при работе на дачах, огородах, при посещении леса, при отдыхе на турбазах, домах отдыха, летних оздоровительных учреждениях, на рыбалке. Встречаются случаи профессионального заражения. Городские жители болеют чаще.

Наибольшее число больных ГЛПС приходится на восточные районы республики: г. Саранск, Рузаевский, Лямбирский, Чамзинский, Кочкуровский, Большеберезниковский, Старошайговский, Ромодановский

При слежении за показателями коллективного иммунитета к ГЛПС выявлено 7,1 % положительных результатов в Кочкуровском районе; 5,9 % – в Zubovo-Полянском; 10,0 % – в Торбеевском; 2,7 % – в Темниковском.

На территории РМ обитает 7 видов мелких млекопитающих: рыжая, обыкновенная полевка, полевая, лесная, желтогорлая, домовая мыши, бурозубка. С 1999 г. доминантом в отловах выступает рыжая полевка.

В 2007 г. отработано 2086 ловушко/суток, отловлено 59 грызунов. В лесокустарниковых станциях доминантом является рыжая полевка (44,6 %), субдоминантом – лесная мышь (20,1 %). В ометах доминирует лесная мышь (60,0 %), а в околородных станциях в летне-осенний период – бурозубка (67,0 %). В лугополевых станциях в летне-осенний период выступает рыжая полевка (63,0 %), субдоминантом – полевая мышь (25,0 %). Средний процент попадания грызунов в 2007 г. составил 3,7 %. Инфицированность мышевидных грызунов хантавирусом составляет 4,1 %, в том числе обыкновенной полевки – 21,4 %, рыжей полевки – 3,4 %, домовой мыши – 2,6 %, при их численности 6,3, 13,2 и 35,0 % соответственно.

Кроме того, на территории РМ отмечается инфицированность полевой, лесной мышей и объектов внешней среды (талая вода, погадки хищных птиц) возбудителем туляремии.

На территории РМ возможны сочетанные природные очаги ГЛПС, лептоспирозов и туляремии. Задачей зоологической группы является продолжение изучения эпизоотологической обстановки по определению зон природно-очаговых инфекционных заболеваний для своевременного проведения профилактических мероприятий.

Т.А.Churbanova

**HFRS Natural Foci in the Republic of Mordovia***Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Mordovia, Saransk*

The landscape-ecologic zoning of HFRS natural foci was carried out. Three zones and 13 natural foci were ear-marked in the territory of the Republic of Mordovia. Places where people can be infected and the indices of HFRS immunity of the community in some natural foci were determined. As

a result of epizootiologic investigation it was stated that 4.1 % of rodents were infected by Hantavirus. Continuous monitoring of HFRS natural foci is necessary to carry out modern preliminary prophylactics of this disease.

*Key words:* HFRS, natural foci, landscape-ecologic zoning, epizootiologic investigation

Поступила 07.05.08.

**ЮБИЛЕИ****К 70-ЛЕТИЮ ВИКТОРА НИКОЛАЕВИЧА МЕТЛИНА**

16 июня 2008 года исполнилось 70 лет Виктору Николаевичу Метлину, старшему научному сотруднику Волгоградского научно-исследовательского противочумного института. Из них 47 лет он посвятил научно-практической и педагогической работе в противочумной системе.

Окончив с отличием лечебный факультет

Саратовского государственного медицинского института, он поступил на работу в лабораторию эпидемиологии Всесоюзного научно-исследовательского противочумного института «Микроб», где в течение трех лет работал под руководством известного эпидемиолога А.К.Акиева.

С 1964 по 1967 год В.Н.Метлин обучался в аспирантуре у доктора медицинских наук, профессора В.В.Акимовича, талантливого ученого – иммунолога и микробиолога и под его руководством защитил кандидатскую диссертацию, посвященную изучению роли «мышьиного» токсина в вирулентности и иммуногенности возбудителя чумы. В.Н.Метлиным впервые была разработана технология получения чумной видоспецифической антитоксической сыворотки.

В 1970–1972 гг. он участвовал в организации и проведении противохолерных мероприятий на вспышках холеры в Астрахани, Одессе и Волгограде, проявив себя талантливым организатором и специалистом по холере.

В 1973 г. В.Н.Метлин был приглашен на работу в Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт, где ему удалось в короткий срок организовать новую лабораторию иммунологии, которую он возглавлял 8 лет.

С 1980 по 1995 год работая в лабораториях индикации, иммунодиагностики, В.Н.Метлин решал актуальные научно-практические вопросы специфической индикации, лабораторной диагностики и профилактики особо опасных инфекций, проводил обучение врачей-бактериологов по вопросам специфической

индикации возбудителей особо опасных инфекций. В течение 14 лет являлся заместителем Председателя Волгоградского отделения Всероссийского общества микробиологов, эпидемиологов и паразитологов.

В.Н.Метлин внес большой вклад в организацию и четкую работу отдела подготовки специалистов. Под его руководством было разработано 5 учебных программ и учебных планов, налажена четкая работа на курсах специализации врачей-бактериологов, биологов и лаборантов по особо опасным инфекциям и на курсах повышения квалификации врачей-бактериологов и эпидемиологов по вопросам противодействия биотерроризму. В.Н.Метлин является автором 131 научной работы, 4 авторских свидетельств на изобретения Российской Федерации, 15 инструктивно-методических документов.

За последние 5 лет с его участием были разработаны учебное пособие «Опасные инфекционные заболевания», практическое пособие и руководство по вопросам противодействия биотерроризму и специфической индикации патогенных биологических агентов.

За высокие профессиональные качества, научные достижения и внедрение результатов научных исследований в практику, а также большой личный вклад в обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации В.Н.Метлин награжден медалью «Ветеран Труда», нагрудным знаком «Отличник здравоохранения», Почетными грамотами ФГУЗ «ВолгоградНИПЧИ» Роспотребнадзора. Виктор Николаевич – один из ведущих специалистов института в области микробиологии и специфической индикации возбудителей особо опасных инфекций. Его научная эрудиция, профессионализм, высокая работоспособность, доброжелательное и уважительное отношение к коллегам по работе, организаторский и педагогический талант вызывают заслуженное уважение сотрудников Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, противочумных и других учреждений здравоохранения.

Редакционная коллегия журнала и коллектив Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» желают В.Н.Метлину крепкого здоровья, семейного благополучия, дальнейших успехов в науке и практической деятельности.

## 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.

4. В начале статьи указываются: инициалы и фамилия авторов, название работы, названия учреждений – мест работы всех авторов статьи и их почтовые адреса с указанием индекса, адрес электронной почты автора, с которым следует вести переписку. 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. 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.

14. Статьи, отклоненные по рецензии, авторам не возвращаются (посылается только сообщение о решении редколлегии).

15. При невыполнении настоящих правил статьи не принимаются и отсылаются авторам на дооформление.

16. **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.

**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](mailto:microbe@san.ru)