

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 96

2 · 2008

САРАТОВ

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

Зав. редакцией Л.С.Пронина
Тел. (845-2) 51-82-22

Редактор *Л.С.Пронина*

Технический редактор
Т.К.Меркулова

Перевод на английский
Е.В.Самойловой,
Н.А.Савиновой

Подписано в печать 30.06.08.
Формат 60×88 1/8.
Бумага офсетная.
Печать офсетная.
Гарнитура Таймс.
Усл. печ. л. 7,5.
Заказ 601.

Подписной индекс – 24687

ISSN 0370-1069. Пробл. особо
опасных инф. 2008. Вып. 96. 1–52.

ISSN 0370-1069



9 770370 106008 >

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

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

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

В.В.Алексеев (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

Львов Д.К. Новые и возвращающиеся инфекции – дремлющий вулкан

5

Эпидемиология и биобезопасность

Безсмертный В.Е., Горшенко В.В., Попов В.П. К оценке эпидемической и эпизоотической ситуации по туляремии в Российской Федерации

8

Водяницкая С.Ю., Москвитина Э.А., Пичурина Н.Л., Забашта А.В., Орехов И.В., Мишанькин Б.Н., Водопьянов С.О., Сучков И.Ю. Крымская геморрагическая лихорадка: эколого-эпизоотологическое значение врановых

12

Ежов И.Н., Яшечкин Ю.И., Ляпин М.Н., Дроздов И.Г. Разработка системы моделирования и оценки опасности работ на объектах медико-биологического профиля

15

Орлова Т.Н., Василенко Н.Ф., Афанасьев Е.Н., Чумакова И.В., Санникова И.В., Куличенко А.Н. Изучение циркуляции возбудителя Лайм-боррелиоза в Ставропольском крае

20

Топорков В.П., Величко Л.Н. Динамика заболеваемости лептоспирозами в федеральных округах Российской Федерации

22

Микробиология

Бывалов А.А., Черныдьев А.В., Маракулин И.В., Гаврилов К.Е. Влияние носительства fra-оперона *Yersinia pestis* на морфологические особенности клеток реципиентного штамма *Yersinia pseudotuberculosis*

26

Видяева Н.А., Гаева А.В., Куклева Л.М., Одинокоев Г.Н., Кутырев В.В. Сравнительная характеристика антиокислительных ферментов штаммов *Yersinia pestis* различных подвигов и *Yersinia pseudotuberculosis*

29

Калинкина Е.В., Агеева Н.П., Меринова О.А., Лобойко Д.А., Виктор Д.В., Меринова Л.К. Фенотипические свойства мутантов патогенных *Burkholderia*, резистентных к фторхинолонам и цефалоспорином

32

Щуковская Т.Н., Клусова С.Н., Кравцов А.Л., Волох О.А., Алешина Ю.А., Кутырев В.В. Влияние биогенного амина серотонина на рост и профиль белков чумного микроба в условиях культивирования на плотных питательных средах

35

Review

L'vov D.K. Emerging and Re-Emerging Infections – a Dozing Volcano

Epidemiology and Biosafety

Bezsmertny V.E., Gorshenko V.V., Popov V.P. On the Assessment of Tularemia Epidemic and Epizootic Situation in the Russian Federation

Vodyanitskaya S.Yu., Moskvitina E.A., Pichurina N.L., Zabashta A.V., Orekhov I.V., Mishan'kin B.N., Vodopyanov S.O., Suchkov I.Yu. Crimean Hemorrhagic Fever: Ecologic and Epizootic Role of the Corvidae Family

Yezhov I.N., Yashechkin Yu.I., Lyapin M.N., Drozdov I.G. Development a System for Modeling and Assessing the Hazard of the Works in Medical and Biological Facilities

Orlova T.N., Vasilenko N.F., Afanasiev E.N., Chumakova I.V., Sannikova I.V., Kulichenko A.N. Studying the Circulation of Etiological Agent of Lyme Borreliosis in Stavropol Region

Toporkov V.P., Velichko L.N. Dynamics of Leptospiroses Morbidity in the Federal Districts of the Russian Federation

Microbiology

Byvalov A.A., Chernyadiev A.V., Marakulin I.V., Gavrilov K.E. Effects of *Yersinia pestis* Fra-Operon Carriage on the Cellular Morphologic Features of the Recipient *Yersinia pseudotuberculosis* Strain

Vidyaeva N.A., Gaeva A.V., Koukleva L.M., Odiokov G.N., Kutyrev V.V. Comparative Characteristics of Antioxidative Enzymes of *Yersinia pestis* Strains of Different Subspecies and *Yersinia pseudotuberculosis* Strains

Kalinkina E.V., Ageeva N.P., Merinova O.A., Loboiko D.A., Viktorov D.V., Merinova L.K. Phenotypic Peculiarities of Pathogenic *Burkholderia* Mutants Resistant to Fluoroquinolones and Cephalosporins

Schukovskaya T.N., Klueva S.N., Kravtsov A.L., Volokh O.A., Aleoshina Yu.A., Kutyrev V.V. Influence of Serotonin Biogenic Amine on Plague Microbe Growth and Profile of its Proteins in Conditions of Cultivation on Solid Mediums

Иммунология, биотехнология, диагностика

Долматов В.Ю., Дробкова А.В., Лютов А.Г., Мальцева О.В., Шевцов А.Н., Боровской Д.В., Елагин Г.Д., Карпова М.В., Вершинина О.А., Блинова Е.А., Шарыгин С.Л. Возможность получения противосибиреязвенного иммуноглобулина человека для внутривенного введения.....

39

Киреев М.Н., Полунина Т.А., Гусева Н.П., Подборонова Н.А., Краснов Я.М., Тараненко Т.М. Изучение иммуногенных свойств антигена Ф1 чумного микроба, конъюгированного с наночастицами коллоидного золота и серебра

43

Ярков С.П., Шиленко И.В., Скопинская С.Н., Злобин В.Н. Комплект для выявления возбудителей особо опасных заболеваний и токсинов люминесцентным иммунохроматографическим анализом.....

46

Краткие сообщения

Кондратенко Т.А., Дузь Л.Ф., Тютюнькова Н.Г., Пономарева Ю.А. Состояние и тенденции общей заболеваемости населения, проживающего в городах Ростовской области

50

Правила для авторов

52

Immunology, Biotechnology, Diagnostics

Dolmatov V.Yu., Drobkova A.V., Lyutov A.G., Mal'tseva O.V., Shevtsov A.N., Borovskoy D.V., Yelagin G.D., Karpova M.V., Vershinina O.A., Blinova E.A., Sharygin S.L. Possibility to Obtain Anti-Athrax Human Immunoglobulin for Intravenous Injection

Kireev M.N., Polunina T.A., Guseva N.P., Podboronova N.A., Krasnov Ya.M., Taranenko T.M. Studying the Immunogenic Properties of Plague Microbe Capsule Antigen F1 Conjugated with Nanoparticles of Colloid Gold and Silver

Yarkov S.P., Shilenko I.V., Skopinskay S.N., Zlobina V.N. The Set for Detection of Etiological Agents of Particularly Dangerous Infectious Diseases and Toxins by Means of Luminescent Immunochromatographic Analysis

Brief Communication

Kondratenko T.A., Duz' L.F., Tyutyun'kova N.G., Ponomareva Yu.A. State and Tendencies of General Disease Incidence of the Population Living in the Cities of Rostov Region

Instruction to Authors

Д.К.Львов

НОВЫЕ И ВОЗВРАЩАЮЩИЕСЯ ИНФЕКЦИИ – ДРЕМЛЮЩИЙ ВУЛКАН

ГУ НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН, Москва

В статье рассматриваются вопросы, связанные с проблемой новых и возвращающихся инфекций, в частности, натуральной оспы и гриппа птиц, вызванного высоковирулентным штаммом H5N1. Приведенные данные свидетельствуют о реальной угрозе общественному здравоохранению со стороны новых и возвращающихся инфекций и необходимости проведения фундаментальных исследований в этом направлении на международном и национальном уровнях.

Ключевые слова: новые и возвращающиеся инфекции, вирус натуральной оспы, вирус гриппа птиц H5N1, эволюция и экология вирусов.

Новые и возвращающиеся инфекции в результате природных катаклизмов или криминальных действий способны вызывать чрезвычайные эпидемические ситуации с угрозой национальной безопасности [1, 2, 3, 13, 14].

50 лет назад на 11-й сессии Генеральной Ассамблеи Всемирной организации здравоохранения (1958 г.) глава делегации СССР, директор Института вирусологии им. Д.И.Ивановского, академик АМН В.М.Жданов предложил принять Программу ликвидации оспы в мире; правомерность такой постановки вопроса на тот момент основывалась на наличии эффективной вакцины и отсутствии сведений о природных очагах вируса или генетически близких вирусов. 30 лет назад программа ВОЗ под руководством американского эпидемиолога Дональда Гендерсона, включавшая массовую вакцинацию, мониторинг, сдерживание вспышек, привела к блестящим результатам: 26 октября 1977 г. зарегистрирован последний в мире случай заболевания в Сомали [25, 27]. Около 25 лет назад 8 мая 1980 г. ВОЗ на 33-й сессии Генеральной Ассамблеи провозгласила победу над оспой и рекомендовала прекратить производство вакцины и вакцинацию населения [20]. В 1993–1999 гг. велась дискуссия на различных уровнях о необходимости для дальнейших научных и прикладных исследований сохранения коллекции живых штаммов вируса [35, 36]. 5 лет назад в 2003 г. под руководством Генерального директора НПО «Вектор» академика Л.П.Сандахчиева разработана комплексная Программа (2003–2007 гг.) исследований, включая работу с живым вирусом, направленная на рецензирование в ВОЗ; подробный ответ от исполнительного директора отдела инфекционных заболеваний д-ра Дэвида Хеймана был отослан 18 января 2003 г. В дальнейшем программа была переутверждена на 2006–2007 гг. специалистами Сотрудничающего центра ВОЗ по диагностике ортопоксвирусных инфекций и музея штаммов и ДНК вируса оспы на базе ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Семейство *Poxviridae* включает два подсемейства: *Chordopoxvirinae* и *Entomopoxvirinae*. Первое подсемейство состоит из 8, второе – из 3 родов.

Подсемейство *Chordopoxvirinae* включает в себя вирусы позвоночных животных. Представители одного и того же рода этого подсемейства относятся к одному серотипу, нейтрализующие антитела родоспецифичны. Гемагглютинирующая активность характерна только для ортопоксвирусов, а для остальных родов не является правилом. Вирус натуральной оспы относится к роду *Orthopoxvirus* (таблица) [16, 19].

В случае заражения людей одним из этих вирусов, а также некоторыми неоспенными вирусами, например, вирусом ветряной оспы (*Herpesviridae*, *Herpesvirinae*, вирус герпеса 3-го типа), дифференциальная видоспецифичная диагностика требует использования комплекса лабораторных методов детекции вирусной ДНК (ПЦР, ПЦР в реальном времени, биочипов и др.) и вирусных белков (ИФА на антиген) [34].

Известные вирусы рода *Orthopoxvirus* (*Poxviridae*, *Chordopoxvirinae*) [19]

Вирус	Известный круг хозяев
Африканских гололапчатых песчанок – Taterapox (TPV)	Татеры (грызуны)
Вакцины – Vaccinia (VACV)	Грызуны, коровы, люди
Натуральной оспы – Variola (VARV)	Люди
Оспы верблюдов – Camelopox (CMLPV)	Верблюды
Оспы енотов – Raccoonpox (RCNPV)	Еноты
Оспы коров – Cowpox (CPXV)	Коровы, грызуны (крысы, песчанки, полевки и др.), кошки, люди
Оспы обезьян – Monkeypox (MPXV)	Грызуны, обезьяны, люди
Оспы полевок – Volepox (VPXV)	Полевки
Оспы скунсов – Skunkpox (SKPXV)	Скунсы
Uasin Gishu болезнь – Uasin Gishu disease (UGEDV)	Лошади
Эктромелии – Ectromelia (ECTV)	Мыши

Полученные в последнее время данные существенно меняют наши представления об экологии ортопоксвирусов:

1. Существование связанных с грызунами природных очагов, по крайней мере 6 из известных 11 вирусов, входящих в род *Orhtopoxvirus* (*Poxviridae*, *Chordopoxvirinae*) [12, 19, 23], в пределах экваториального, тропического, субтропического, умеренного, субарктического климатических поясов [5, 6, 7, 11, 12, 15].

2. Нарастающее обострение эпидемической ситуации по оспе обезьян в экваториальной Африке [21] и в США [18, 22] с увеличением смертности среди людей (в среднем 9,8 %), возможностью от 2 до 8 пассажей среди людей у 30–70 % пациентов [24, 28, 33]. Природным резервуаром вируса являются африканские грызуны, прежде всего белки, у которых установлено клиническое и бессимптомное течение болезни с длительным носительством вируса. В 2003 г. появилось сообщение о десятках случаев заболевания людей в США. Большинство заболевших имели прямой контакт с грызунами *Synomys ludovicianus*, которых содержат в качестве домашних животных [18, 22]. Они, в свою очередь, заразились от импортируемых из Африки грызунов и циветт; выявлено широкое распространение вирусов коровьей оспы среди лабораторных и диких грызунов. Природные очаги расположены от среднеазиатских пустынь и дождевых экваториальных лесов до Ловозерской тундры на Кольском полуострове. Мы полагаем, что грызуны являются основными хозяевами и других ортопоксвирусов. Эти данные указывают на возможность, по крайней мере теоретическую, возникновения эпидемической re-emerging ситуации в связи с природными факторами. Природа может быть самым беспощадным террористом.

3. Возможность сохранения вируса в трупах людей, захороненных в вечной мерзлоте Еразии и Америки.

4. Угроза биотерроризма за счет неучтенных запасов вируса, сохранившихся где-либо и у кого-либо [31].

5. Отсутствие у населения поствакцинального иммунитета после прекращения 30 лет назад вакцинации и производства вакцины по рекомендации ВОЗ [20, 26].

Все это делает риск обострения эпидемической ситуации в результате природных процессов или криминальных действий с катастрофическими последствиями в настоящее время и в обозримом будущем даже выше, чем 20–30 лет назад. В то же время научное сообщество и органы здравоохранения не располагают методами для экспресс-диагностики в полевых условиях видоспецифичной идентификации вируса натуральной оспы [34], адаптированными для массового применения профилактическими (низкореактивными, эффективными, доступными для массового производства, вакцинами) и лечебными (нетоксичными, приемлемыми для массового произ-

водства, недорогими, эффективными при оральном применении) препаратами [17, 29, 30, 32].

Для решения этих прикладных вопросов необходимы фундаментальные исследования биоразнообразия, функциональных свойств вирусных ДНК и белков, патогенеза, эволюции. Для исследований, имеющих научное и прикладное значение на определенных и особенно на заключительных этапах, необходимо использование живого вируса натуральной оспы в двух депозитариях: CDC (США) и ФГУН Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор», являющимся также сотрудничающим центром ВОЗ по диагностике ортопоксвирусных инфекций и музеем штаммов и ДНК вируса оспы (РФ) [4], где разработан вариант предложенной ранее программы на 2006–2010 гг. по использованию вируса натуральной оспы.

Изучение в 2007 г. эволюции вируса птичьего гриппа H5N1 (*Orthomyxoviridae*, *Orthomyxovirus*, *Influenza virus A*), попавшего в 2005 г. в популяции диких птиц экосистем Северной Евразии, установило сохранение панзоотического и пандемического потенциала.

Возникшая в феврале 2007 г. эпизоотия в Подмоскowie имела рукотворное происхождение. Все выделенные штаммы во всех 9 районах Московской и Калужской областей мы депонировали в Государственную коллекцию вирусов. По данным полного секвенирования генома, вирус отнесен к Ирано-Дагестан-Краснодарскому варианту, но имеет, вероятно, Северо-Кавказское рукотворное происхождение [9]. В сентябре 2007 г. эпизоотия среди сначала диких и затем домашних птиц возникла в Краснодарском крае на северо-восточном побережье Азовского моря в начале осенней миграции птиц. Контакты домашних птиц с дикими очевидны – птицефабрика расположена на берегу лимана. Это значит, что эволюция вируса, попавшего в популяцию диких птиц, продолжается. Выделенные штаммы в отличие от февральской Московской эпизоотии имеют наибольшее родство с Сибирско-Тувинским вариантом, что указывает на продолжение циркуляции вируса в природных экосистемах [8]. В начале декабря на юго-востоке Ростовской области возникли эпизоотии с высокой смертностью домашних птиц. Штаммы выделены от домашних птиц, а также от грачей, голубей, полевого воробья, скворца. Причем вирусная РНК обнаружена у голубей и грачей в 60 %, у скворцов и полевых воробьев – в 10 % [10]. Массовое заражение вирусом диких синантропных птиц, прилетевших на зимовку в огромном количестве из более северных районов страны, создает угрозу заражения сопредельных территорий и его заноса в центральные районы во время весенней миграции. Полный сиквенс выявил генетическую близость вируса к московскому варианту февраля 2007 г. Возможно, обе вспышки имеют единый регион заноса. Итак, в одном случае (Москва, февраль 2007 г.) произошло заражение домашних птиц, по-видимому, из руко-

творного источника Ирано-Краснодарским вариантом вируса, в другом (Краснодарский край, сентябрь 2007 г.) – Сибирско-Тувинским вариантом вируса от диких птиц во время миграции, в третьем (декабрь 2007 г.) – от неустановленного источника Ирано-Краснодарским вариантом вируса с последующим массовым заражением диких синантропных птиц.

Приведенные данные свидетельствуют о реальной угрозе, за счет новых и возвращающихся инфекций, биобезопасности и необходимости проведения фундаментальных исследований на национальном и международном уровнях.

Учитывая существенные популяционные связи разных видов птиц на путях перелетов и в местах зимовок реально ожидать в ближайшем будущем дальнейшего вовлечения в процесс диких, а за ними и домашних птиц и дальнейшего развития панзоотии на всех континентах. А когда высоковирулентные штаммы, циркулирующие сейчас среди диких птиц, вернутся к низковирулентным, сколько времени займет этот процесс предсказать невозможно – месяцы или годы. Изучение эволюции, скорости изменения генома высоковирулентных вариантов, проникших в природные экосистемы Северной Евразии, является предметом приоритетного изучения. От этого зависит развитие событий в обозримом будущем. Что касается пандемического вируса, то он может возникнуть и у нас через одновременное заражение свиней вирусами человека и птиц. Но скорее этот вирус попадет к нам из Китая, где возможности формирования реассортанта особенно велики, учитывая активность эпизоотического процесса и огромный восприимчивый контингент среди населения. Появление у нас пандемического вируса может произойти в любой момент – завтра, сегодня, а может быть, вчера. Гадать об этом бессмысленно. Что, с нашей точки зрения, следовало бы делать – сформулировано четыре года назад: мониторинг с изучением эволюции высокопатогенного вируса, проникшего в природные популяции диких птиц, – это наша задача. Оперативные задачи: вакцинация на частных подворьях домашних птиц вакцинами из адекватных штаммов, максимальная защита птицефабрик, поголовная вакцинация обычными вакцинами персонала птицеводческих и свиноводческих хозяйств, экспертная диагностика, производство противовирусных препаратов, готовность к производству вакцин и приему в палаты интенсивной терапии тысяч пациентов. Важно иметь в виду, учитывая международный опыт борьбы с «испанкой», что никакие карантинные меры не окажут существенного влияния на распространение пандемического вируса гриппа.

Нужно помнить о невозможности воздействия на эволюционные процессы, идущие в природных экосистемах. Нельзя предотвратить там развитие панзоотий и пандемий. Это стихийное бедствие, как ураган или землетрясение. Но можно и нужно снижать последствия чрезвычайных ситуаций путем прогнозов и заблаговременной подготовки. А это

возможно лишь при проведении комплексных фундаментальных исследований и практических организационных мероприятий. Время не ждет.

Центр экологии и эпидемиологии гриппа, работающий на базе Института вирусологии им. Д.И.Ивановского, помимо приведенных выше исследований, проводит совместно с опорными базами на Дальнем Востоке, в Сибири и в Европейской части мониторинг среди населения. В эпидсезоны 2007–2008 гг. получены следующие результаты:

- выделены эпидемические вирусы (на востоке преимущественно H3N2 и В, на западе – H1N1), особенно активная циркуляция вирусов выявлена во Владивостоке, где изолировано свыше 70 штаммов;

- определена резистентность циркулирующих штаммов H1N1 к ремантадину (в РФ – до 40 %, в США – более 90 %), озелтамивиру (в РФ – единичные, в США – 9 %, Европе – 5–66 %);

- определена антигенная структура выделенных штаммов (H1N1 – А/Соломоновы острова/3/2006 и дрейф-варианты, H3N2-А/Висконсин/67/05 и дрейф-варианты, В – В/Ямагата/16/88 и дрейф-варианты), штаммы вирусов H1N1 и H3N2 в основном совпали с вакцинными (2007–2008), а вируса В – нет.

Следует отметить резко возросший за последние 2 года потенциал региональных опорных баз, особенно во Владивостоке, а также Биробиджане, Томске, Оренбурге, Пензе, Владимире, Ярославле, Липецке.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кутырев В.В., Федоров Ю. М., Топорков А.В. и др. Укрепление глобальной сети по предупреждению и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций: модернизация специализированных противэпидемических бригад (СПЭБ) противочумных учреждений. Пробл. особо опасных инф. 2006; 92(2):10–4.
2. Львов Д.К. Проблема нерегистрируемых и непредсказуемых инфекций. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1997; 5:104–9.
3. Львов Д.К. Значение вновь возвращающихся инфекций в биобезопасности. Вопр. вирусол. 2002; 5:4–7.
4. Львов Д.К., Зверев В.В., Гинцбург А.Л., Пальцев М.А. Натуральная оспа – дремлющий вулкан. Вопр. вирусол. 2008; 4 (в печати).
5. Львов Д.К., Колобухина Л.В. Натуральная оспа. В кн.: Львов Д.К., редактор. Медицинская вирусология. Москва: МИА; 2008. С. 466–9.
6. Львов Д.К., Колобухина Л.В. Оспа коров. В кн.: Львов Д.К., редактор. Медицинская вирусология. Москва: МИА; 2008. С. 469–70.
7. Львов Д.К., Колобухина Л.В. Оспа обезьян. В кн.: Львов Д.К., редактор. Медицинская вирусология. Москва: МИА; 2008. С. 470–1.
8. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г. Эпизоотия среди диких и домашних птиц, вызванная высоковирулентным вирусом гриппа А/H5N1 генотипа 2.2 (Цинхай – Сибирский на пути осенней миграции северо-восточной части бассейна Азовского моря (Краснодарский край). Вопр. вирусол. 2008; 3 (в печати).
9. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Прилипов А.Г. и др. Молекулярно-генетическая характеристика штамма A/chicken/Moscow/2/2007 (H5N1) из очага эпизоотии высокопатогенного гриппа А среди сельскохозяйственных птиц в Подмосковье (февраль 2007 г.). Вопр. вирусол. 2007; 6:40–7.
10. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Прилипов А.Г. и др. Расшифровка эпизоотической вспышки среди диких и домашних птиц на юге Европейской части России в декабре 2007 г. Вопр. вирусол. 2008; 4 (в печати).
11. Львов С.Д., Громашевский В.Л., Маренникова С.С. и др. Изоляция поксвируса (*Poxviridae*, *Poxvirus*, комплекс оспы коров) от полевки-экономки *Microtus* (М.) *oeconomus* Pall. 1778 в лесотундре Кольского полуострова. Вопр. вирусол. – 1978; 1:92–4.
12. Маренникова С.С., Щелкунов С.Н. Патогенные для человека ортопоксвирусы. КМК Sci.press Ltd. Москва; 1998.

13. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Кривуля С.Д., Федоров Ю.М., Топорков В.П. Стратегия борьбы с инфекционными болезнями и санитарная охрана территорий в современных условиях. Пробл. особо опасных инф. 2006; 92(2):5–9.
14. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В. Актуальные задачи обеспечения биологической безопасности Российской Федерации. В кн.: Матер. VI Международной науч.-практ. конф. Санитарная охрана территорий государств-участников Сотрудничества независимых государств; 2005, Волгоград, Россия. Волгоград; 2005. С.7–11.
15. Цанава Ш.А., Маренникова С.С., Сакварелидзе М.А. и др. Выделение вируса оспы коров от краснохвостой песчанки. Вopr. вирусол. 1989; 1:95–7.
16. Щелкунов С.Н. Ортопоксвирусный геном (обзор). Мол. биол. 1996; 30:5–32.
17. Baker R.O., Bray M., Huggins J.W. Potential antiviral therapeutics for smallpox, monkeypox and other orthopoxvirus infection. Antiviral Research. 2003; 7:13–23.
18. Bernard S.M., Anderson S.A. Qualitative assessment of risk for Monkeypox associated with domestic trade in certain animal species, United States. Emerg. Infect. Dis. 2006; 12:1827–33.
19. Buller R.M., Arif B.M., Black D.N., et al. Family Poxviridae. In: C.M.Fauquet, M.A.Mayo, J.Maniloff, U.Desselberger, L.A.Ball, editors. Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press; 2005. p.117–133.
20. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Notice to readers: smallpox vaccine no longer available for civilians – United States. MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep. 1983; 32(29):387.
21. Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). Human monkeypox – Kasai Oriental, Zaire, 1996–1997. MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep. 1997; 46:304–7.
22. Centers for Diseases Control and Prevention (CDC). Update: multistate outbreak of monkeypox – Illinois, Indiana, Kansas, Missouri, Ohio, and Wisconsin, 2003. MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep. 2003; 52:642–6.
23. Chantrey J., Meyer H., Baxby D., et al. Cowpox: reservoir hosts and geographic range. Epidemiol. Infect. 1999; 122:455–60.
24. Di Guilio D.B., Eckburg P.B. Human monkeypox. Lancet Infect. Dis. 2004; 4:199.
25. Fenner F., Henderson D.A., Arita I., et al. Smallpox and its eradication. Geneva: WHO; 1980.
26. Hammarland E., Lewis M.W., Hansen S.G., et al. Duration of antiviral immunology after smallpox vaccination. Nat. Med. 2003; 9:1131–37.
27. Henderson D.A. Historical Background. Paper prepared for the Work-shop of the IOM Committee on Assessment of Future Scientific Needs for Live Variola Virus, 20 November, Washington, D.C. 1998.
28. Huhn G.D., Bauer A.M., Yorita K., et al. Clinical characteristics of human monkeypox and risk factors for severe disease. Clin. Infect. Dis. 2005; 41:1742–51.
29. McFadden G. DNA viruses that affect cytokine networks. In: B.B. Aggarwal and R.K. Puri, editors. Human Cytokines: Their Role in Disease and Therapy. Cambridge, Mass.: Blackwell Press; 1995.
30. Meadows K.P., Tyring S.K., Pavia A.T., Rallis T.M. Resolution of recalcitrant molluscum contagiosum virus lesions in human immunodeficiency virus-infected patients treated with cidofovir. Arch. Dermatol. 1997; 133:987–90.
31. Meltzer M.I., Damon L., Le Duc J.W., Millar J.D. Modeling potential responses to smallpox as a bioterrorist weapon. Emerg. Infect. Dis. 2001; 7:959–69.
32. Neyts J., De Clercq E. Therapy and short-term prophylaxis of poxvirus infections: historical background and perspectives. Antiviral Res. 2003; 5:25–33.
33. Rimoin A.W., Kitalu N., Kebela-Ilunga B., et al. Endemic human monkeypox, Democratic Republic of Congo, 2001–2004. Emerg. Infect. Dis. 2007; 13:934–7.
34. Ropp S.L., Jin Q., Knight J.C., et al. PCR strategy for identification of smallpox and other orthopoxviruses. J. Clin. Microbiol. 1995; 33:2069–76.
35. WHO Report of the Meeting of the Ad Hoc Committee on Orthopox virus Infections. Geneva: World Health Organization; 1994.
36. WHO. Destruction of the smallpox virus. Weekly Epidemiological Report. 1999;74(4):27–8.

D.K.L'vov

Emerging and Re-Emerging Infections – a Dozing Volcano

D.I.Ivanovsky Research Institute of Virology, Moscow

Questions discussed in this work concern the problem of emerging and re-emerging infections, in particular smallpox and avian flu caused by highly virulent strain H5N1. Data presented evidence the real threat that emerging and re-emerging infections pose to public health and the necessity to carry out fundamental investigations in this direction at national and international levels.

Key words: emerging and re-emerging infections, smallpox virus, avian flu virus H5N1, evolution and ecology of viruses.

Поступила 21.03.08.

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И БИОБЕЗОПАСНОСТЬ

УДК 616.981.455:616-036.2(471)

В.Е.Безсмертный, В.В.Горшенко, В.П.Попов

К ОЦЕНКЕ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ И ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО ТУЛЯРЕМИИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФГУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора, Москва

Представлены результаты анализа эпизоотической и эпидемической ситуации по туляремии в Российской Федерации за 15 лет (1992–2006 гг.) по имеющимся в Противочумном центре материалам. Отдельно представлен краткий анализ эпидемической ситуации в 2005 г.

Ключевые слова: природные очаги туляремии, эпизоотологические обзоры, эпидкарты, эпизоотическая активность, заболеваемость людей, клинические формы.

ФГУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора (ПЧЦ) в течение многих лет ежегодно анализирует эпидемическую и эпизоотическую ситуацию по туляремии, состояние ее профилактики в целом по

стране. При этом используются материалы эпизоотологических обзоров по природно-очаговым инфекциям, составляемые учреждениями госсанэпидслужбы субъектов Российской Федерации, обзоров, представ-

ляемых в ПЧЦ противочумными станциями (ПЧС), официальные данные о заболеваемости людей туляремией в разрезе субъектов Федерации, предоставляемые ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора. За период с 1999 г. приводятся суммарные данные бактериологических исследований объектов внешней среды (число культур *F. tularensis*), проведенных лабораториями особо опасных инфекций учреждений госсанэпидслужбы в субъектах РФ и противочумных станций, а также результаты анализа копий карт эпидемиологического обследования случаев заболевания людей туляремией, направляемых в ПЧЦ в соответствии с приказом Минздрава России от 14.04.99 № 125 «Об усилении мероприятий по профилактике туляремией».

Природные очаги туляремии широко распространены на территории Российской Федерации, они отличаются стойкостью, длительностью существования и способностью проявлять активность через много лет эпизоотического и, соответственно, эпидемического спокойствия. Особенностью эпидемиологии туляремии является разнообразие источников, носителей, переносчиков, факторов передачи возбудителя, механизмов заражения, входных ворот инфекции [5, 6]. Возбудитель туляремии включен в высшую категорию А как потенциальный агент биологического оружия и биотерроризма [3].

Благодаря проведению в стране с начала 50-х годов прошлого века плановой иммунизации населения высокоэффективной вакциной, созданной в 40-х годах Н.А.Гайским и Б.Я.Эльбертом [6], заболеваемость туляремией не отличается высокими цифрами [3], и болеют в основном непривитые лица, однако проведение противотулярийных мероприятий, включая противозооотические, по-прежнему актуально.

За период с 1992 г. в стране в среднем ежегодно регистрировались от 50 до 150 больных туляремией, без учета заболеваемости в 2005 г., когда впервые за предыдущие 40 лет зарегистрирован 881 больной.

Удельный вес городских жителей составлял 60–65 %, что связано с активным посещением немунными горожанами лесов, речек, дач и т.п., находящихся на территориях природных очагов туляремии. Заболевания людей возникали круглогодично, более 45 % приходилось на летние месяцы. Больных регистрировали во всех возрастных категориях (от 1 г. 2 мес. до 76 лет), но большую часть составляли активные, трудоспособные люди.

Заражение людей происходило во время купания, при посещении леса, во время работы на садово-огородных участках, при питье сырой воды, употреблении инфицированных грызунами продуктов, раздаче кормов животным, во время ремонтных работ в старых и ветхих домах, на рыбалке, охоте, при разделывании тушек ондатр, зайцев. Были задействованы различные механизмы передачи инфекции – контактный, алиментарный, аспирационный, трансмиссивный [1, 2].

В основном заболеваемость людей можно охарактеризовать как спорадическую, с регистрацией в отдельные годы групповых заболеваний, так называемых «вспышек», с довольно большим числом заболевших: в 1995 г. – водная в Смоленской области (90 больных) и молочная в Москве (23 больных); трансмиссивные вспышки – в Ярославской обл. в 1995 г. (50 больных), в Республике Дагестан в 1999 г. заболело 64 человека [1].

Заболеваемость людей туляремией связана с активизацией природных очагов инфекции, в связи с чем для эффективной организации профилактических мероприятий необходимо проведение постоянного эпизоотологического надзора за природными очагами туляремии, как это определено действующими нормативными документами Роспотребнадзора [4, 7].

Многолетний анализ деятельности территориальных учреждений госсанэпидслужбы, проводимый совместно Противочумным центром и Федеральным центром гигиены и эпидемиологии, показывает сокращение обследовательских работ в природных очагах туляремии как по обследуемым площадям, так и по отбору материала для лабораторного исследования (млекопитающих, кровососущих членистоногих, объектов внешней среды). Не являются исключениями случаи, когда о тулярийных эпизоотиях в природных очагах становится известно только после установления диагноза туляремии у людей, т. е. люди становятся индикаторами эпизоотического неблагополучия местности [1, 5].

Вместе с тем, даже при сокращении объемов эпизоотологического обследования природных очагов, баклабораториями особо опасных инфекций областных центров гигиены и эпидемиологии и противочумных станций с 1999 г. изолировано из проб материала от животных и объектов внешней среды 718 культур тулярийного микроба, не считая положительных результатов серологических исследований.

Наибольший удельный вес изолированных культур за описываемый период (таблица) приходился на пробы воды открытых водоемов – 34,1 %. Удельный вес культур от мелких млекопитающих, ондатр, зайцев составил более 27 %, а в отдельные годы – более 56 % (2000 г.) и 40 % (2004 г.). При исследовании материала от кровососущих членистоногих, куда также вошли и эктопаразиты грызунов, изолировано более 26 % культур (в 2003 г. – около 71 % от числа изолированных за год). Почти 7 % культур тулярийного микроба получено при исследовании подснежных гнезд и экскрементов грызунов; более 5,3 % изолировано из проб речного ила.

Из 488 культур, выделенных с 1999 по 2006 год лабораториями особо опасных инфекций областных центров гигиены и эпидемиологии, 328 культур (67,2 %) изолировано в Центральном федеральном округе. Из них 148 (30,3 %) изолировано в Тульской области, что, по нашему мнению, в определенной

Выделение культур *F. tularensis* на территории Российской Федерации за период с 1999 по 2006 год по исследованным объектам внешней среды

Год	Млекопитающие	Кровососущие членистоногие*	Подснежные гнезда грызунов	Экскременты грызунов	Вода	Речной ил	Всего
1999	16	34	2	3	75	5	135
2000	72	2	2	12	21	18	127
2001	7	13	-	-	42	11	73
2002	28	22	6	-	35	-	91
2003	4	39	-	-	10	2	55
2004	41	24	4	5	27	-	101
2005	6	14	-	-	23	1	44
2006	25	41	-	13	12	1	92
Итого	199	189	14	33	245	38	718
% от 718	27,7	26,3	2	4,6	34,1	5,3	

* От иксодовых и гамазовых клещей, слепней и эктопаразитов грызунов (блох, вшей).

степени связано с более тщательным отбором материала для бактериологического исследования на туляремию, когда, помимо стандартного комплекса (млекопитающие, вода, иксодовые клещи), исследуется также гнездово-норовый субстрат, эктопаразиты и экскременты грызунов и др. Такой подход позволяет своевременно выявлять эпизоотическую активность природных очагов туляремии и эффективно проводить соответствующие профилактические мероприятия. Так, за этот период в Тульской области на фоне выявленных активных эпизоотий туляремии зарегистрировано 15 больных, или менее 2 % от числа больных, зарегистрированных по Центральному федеральному округу (768).

Бактериологическими лабораториями противочумных учреждений с 1999 по 2006 год изолировано 232 культуры (32,3 %) – в основном Алтайской, Причерноморской, Северо-Западной, Хабаровской ПЧС.

Дагестанской ПЧС в 1999 г. при проведении диагностического обследования людей во время вспышки заболеваний туляремией в Тарумовском районе Республики Дагестан от больных изолировано 2 культуры тулярийного микроба.

С участием противочумных учреждений выявлялись ранее неизвестные или забытые природные очаги туляремии – Причерноморской ПЧС при проведении эпидемиологического обследования случая заболевания туляремией был выявлен природный очаг в Анапском районе Краснодарского края, эпизоотическая активность которого в дальнейшем неоднократно подтверждалась; Противочумным центром выявлены участки очаговости в Молжаниновском районе Северного административного округа Москвы и в Национальном парке «Лосиный остров».

С 1999 по 2006 год в стране зарегистрировано 1427 случаев заболевания туляремией, из них в Противочумный центр поступили копии карт эпизоотолого-эпидемиологического обследования очага заболевания туляремией (эпидкарт) по 683 больным (47,9 %).

Материалы 683 эпидкарт анализировались по разным параметрам: характер энзоотичности территорий, где произошло заражение людей, пути и факторы передачи возбудителя инфекции, эпизоотологическое обследование очагов заболеваний, привитость больных против туляремии, сроки обращения и сроки установления диагноза туляремии (подозрения на нее), формы и тяжесть клинического проявления болезни и др. [1, 2].

Изучение сведений, имеющихся в эпидкартах, показало, что:

- менее 50 % больных заразилось на энзоотичных территориях, остальные – на территориях, считавшихся не энзоотичными, или характер энзоотичности которых в эпидкартах не указан;

- часть больных заразилась в природных очагах пойменно-болотного типа, однако в большинстве эпидкарт типы природных очагов не указаны;

- в большей части случаев заболеваний людей туляремией не проводилось эпизоотологическое обследование по эпидпоказаниям и, следовательно, не проводились лабораторные исследования на туляремию объектов внешней среды, в связи с чем источники, пути и факторы передачи возбудителя инфекции устанавливались лишь предположительно по данным эпиданамнеза; в редких случаях были четко определены источники заражения людей – ондатры и зайцы, заражение от которых происходило при снятии шкур и разделке тушек;

- заболевали, как правило, лица, не привитые против туляремии, преимущественно городские жители; имели место случаи заражения привитых людей, в т.ч. привитых в оптимальные сроки (5 лет и менее до заболевания);

- из клинических форм болезни преобладали glandулярная (бубонная) и ульцерогlandулярная (язвенно-бубонная) формы (70 %), на ангинозно-glandулярную (ангинозно-бубонную) форму приходилось более 19 %, на легочную (торакальную) – 7,5 %; диагностировались также генерализованная (септическая), желудочно-кишечная (абдоминаль-

ная) формы болезни;

- более чем у 70 % больных туляремией было среднетяжелое течение заболевания;

- большинство больных обращалось за медицинской помощью на 2–4-й день заболевания; средние сроки установления диагноза туляремии или подозрения на нее составляли более 2 недель со времени обращения больных в лечебное учреждение, нередко случаи установления диагноза в течение месяца и позднее.

Как отмечено выше, 2005 г. был годом наибольшего подъема заболеваемости туляремией за предшествующий 40-летний период. Среднегодовой показатель заболеваемости за этот период был превышен в 2005 г. почти в 7 раз. Серьезному эпидосложнению в 2005 г. предшествовал подъем заболеваемости в 2004 г., когда было зарегистрировано 132 больных против 49 в предыдущем, 2003 г.

В 2005 г. зарегистрировано 88,1 % больных в 7 субъектах Российской Федерации, в т.ч. 237 – в Москве, 166 – в Московской, 135 – в Рязанской, 130 – в Нижегородской, 40 – во Владимирской, 35 – в Воронежской, 33 – в Свердловской областях. Рост заболеваемости отмечен и в Северо-Западном федеральном округе – в 7 субъектах округа зарегистрировано 34 больных, из них 17 – в Вологодской области.

При изучении данных 420 эпидкарт за 2005 г., поступивших в Противочумный центр, выявлены различия по некоторым показателям заболеваемости этого года в сравнении с предыдущими годами:

- в 2005 г. 82 % больных были городскими жителями, причем заражения людей происходили также и в очагах, находящихся в черте города;

- в летние месяцы 2005 г. зарегистрировано почти 86 % больных;

- согласно данным эпиданамнеза переносчиками инфекции явились преимущественно кровососущие членистоногие – 77 % больных отмечали укусы насекомых, в т.ч. почти 20 % – укусы слепней и оводов; удельный вес язвенно-бубонной формы туляремии составил 48 %, при 16–19 % в предыдущие годы, это также может подтвердить преимущественную роль трансмиссивного механизма заражения;

- в 2005 г. у больных заболевание туляремией нередко сопровождалось сыпью на теле, конечностях, на лице; сыпь была папулезная, пятнистая, полиморфная, обильная; высыпания отмечались в основном у больных, в анамнезе которых были укусы комаров, слепней, оводов.

На фоне высокой заболеваемости туляремией в 2005 г. осталась не выясненной эпизоотическая ситуация в большинстве субъектов Российской Федерации, где регистрировались заболевания людей. По данным эпидкарт, при 100 % эпидемиологическом обследовании случаев заболеваний людей, более чем в 80 % очагов заболеваний не проведено эпизоотологическое обследование по эпидпоказаниям. В очагах, обследованных зоологами по эпидпоказаниям, при ла-

бораторном исследовании материала от грызунов получены положительные результаты серологических реакций в невысоких титрах (Воронежская, Омская, Рязанская, Смоленская области), выявлен туляремийный антиген при исследовании слепней и овода (Воронежская область), сена (Свердловская область), 1 культура *F. tularensis* и положительные биопробы при исследовании воды (Свердловская область), 1 культура изолирована от клещей (Республика Алтай, Алтайская ПЧС). Имели место также отрицательные результаты лабораторных исследований.

При плановых эпизоотологических обследованиях природных очагов в 2005 г. изолировано 42 культуры туляремийного микроба, в т.ч. в Республиках Алтай, Коми, Марий Эл, в Хабаровском крае, в Брянской, Ивановской, Новгородской, Свердловской областях, в пригородах Санкт-Петербурга и прилегающих районах Ленинградской области, в окрестностях Южно-Сахалинска.

Изучение материалов, имеющихся в распоряжении Противочумного центра, позволяет сделать следующие выводы:

1. Несмотря на невысокую заболеваемость людей туляремией в стране, остается актуальным постоянное проведение комплекса противотуляремийных мероприятий, регламентированных действующими нормативными и методическими документами, включая эпизоотологический мониторинг природных очагов инфекции.

2. При ослаблении внимания к туляремии, эта инфекция может вызывать серьезные эпидемические осложнения, подтверждением чему служит резкий подъем заболеваемости людей в 2005 г.

3. Недостатки в проведении мониторинга природных очагов туляремии и эпизоотологического обследования по эпидпоказаниям случаев заболеваний людей в значительной степени связаны с отсутствием специалистов-зоологов в штатах многих центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора в субъектах Российской Федерации.

4. Позднее (не ранее 2–3 недель от времени обращения больного) установление диагноза туляремии при достаточно выраженных клинических проявлениях болезни указывает на слабое знание врачами лечебно-профилактических учреждений данной инфекции и не позволяет своевременно проводить эпидемиологическое и эпизоотологическое обследование заболевания туляремией.

5. Существует проблема незащищенности (неиммунности) городского населения, подвергающегося риску заражения туляремией при выезде в природные очаги инфекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горшенко В.В., Мещерякова И.С., Кюрегян А.А. Анализ заболеваемости туляремией в Российской Федерации в 1999–2000 годы с использованием данных эпидкарт обследования очагов туляремии. В кн.: Материалы науч.-практ. конф. Природно-очаговые особо опасные инфекции на юге России, их профилактика, лабораторная диагностика. Астрахань; 2001.
2. Демидова Т.Н., Горшенко В.В., Попов В.П., Мещерякова

И.С. Анализ заболеваемости туляремии на территории Российской Федерации в 2001–2004 гг. Сб. науч. тр. кафедры эпидемиологии РМАПО. 2006; 8:265–73

3. Мецеракова И.С., Демидова Т.Н., Горшенко В.В. Актуальные аспекты эпидемиологии и профилактики туляремии. В кн.: Матер. IX съезда ВОЭМП. М.; 2007. Т. 3. С. 204–205.

4. МУ 3.1.2007-05. Минздрав России. Эпидемиологический надзор за туляремией. М.; 2005.

5. Новиков Н.Л., Попов В.П., Жуков В.И., Горшенко В.В., Мецеракова И.С. Проблемы эпизоотологического надзора за природными очагами туляремии. В кн.: Матер. IX съезда ВОЭМП. М.; 2007. Т. 3. С. 210–211.

6. Олсуфьев Н.Г., Руднев Г.П. и др. Туляремия. М.: Медгиз; 1960.

7. Приказ Минздрава России от 14.04.99 № 125 «Об усилении мероприятий по профилактике туляремии». М.; 1999.

V.E.Bezsmertny, V.V.Gorshenko,
V.P.Popov

On the Assessment of Tularemia Epidemic and Epizootic Situation in the Russian Federation

Plague-Control Center of Rospotrebnadzor, Moscow

Represented are the results of analysis of epizootic and epidemic situation with tularemia in the Russian Federation for 15 years (1992–2006) based on the data of Plague-Control Center. Brief analysis of epidemic situation in 2005 is presented separately.

Key words: natural tularemia foci, epizootologic reviews, epidemiologic maps, epizootic activity, human morbidity, clinical forms.

Поступила 20.03.08.

УДК 616.988.26:577.4

С.Ю.Водяницкая, Э.А.Москвитина, Н.Л.Пичурина, А.В.Забашта,
И.В.Орехов, Б.Н.Мишанькин, С.О.Водопьянов, И.Ю.Сучков

КРЫМСКАЯ ГЕМОРРАГИЧЕСКАЯ ЛИХОРАДКА: ЭКОЛОГО-ЭПИЗОТОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ВРАНОВЫХ

ФГУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт»

В работе представлены данные по изучению роли птиц в циркуляции вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ). При исследовании 758 проб птиц антиген вируса ККГЛ обнаружен в 19 (2,51 % ± 0,57) пробах грачей. Установлено, что врановые – полноценный сочлен природных очагов Крымской геморрагической лихорадки (КГЛ) на территории Ростовской области. Эпидемиологическое значение этого семейства заключается в рассейвании вируса ККГЛ, расширении уже имеющихся природных очагов КГЛ и формировании новых. Эколого-эпизоотологическое значение врановых необходимо учитывать при эпидемиологическом надзоре за природными очагами КГЛ.

Ключевые слова: Крымская геморрагическая лихорадка, вирус ККГЛ, врановые, грач, антиген, природный очаг.

Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ) в современный период является актуальной проблемой для здравоохранения ряда стран, где зарегистрированы вспышки и спорадические случаи этой болезни. В Российской Федерации функционирование природных очагов КГЛ отмечено в Ростовской, Астраханской и Волгоградской областях, Ставропольском крае, республиках Калмыкия и Дагестан [4, 5, 7, 8, 9].

В нашей стране достигнуты значительные успехи в изучении природной очаговости КГЛ: охарактеризован этиологический агент; доказана роль иксодовых клещей из родов *Hyalomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* как основных переносчиков и хранителей вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ) в природных очагах; установлены основные виды животных – прокормителей клещей; выявлено паразитирование преимагинальных фаз клеща *Hyalomma marginatum marginatum* на птицах семейства Врановых, однако значение последних в схеме циркуляции вируса ККГЛ окончательно не выяснено.

Еще в 1944 г. возник вопрос о возможной роли некоторых видов птиц в циркуляции вируса ККГЛ. Птицы, по выражению С.П.Пионтковской [10], «по техническим причинам» не исследовались. Именно

поэтому, по мнению Н.Б.Бируля [3], заяц-русак оказался единственным массовым носителем преимагинальных фаз *H. marginatum marginatum* в условиях вспышки в Крыму.

Следует отметить, что при исследовании сывороток крови птиц на наличие антител к вирусу ККГЛ многочисленными авторами получены отрицательные результаты в эндемичных районах России, Таджикистана, Туркменистана, Болгарии, Армении и Сенегала [1, 2]. В то же время выявлены преципитирующие антитела у домашней птицы и сороки [12]. На этот факт обратили внимание С.П.Чунихин и соавт. [13], отметившие, что при обследовании птиц антитела к одним арбовирусам у некоторых из них не обнаруживаются, а к другим – встречаются чаще, чем у млекопитающих.

В настоящее время известны сообщения о возможности участия отдельных африканских видов птиц в распространении вируса ККГЛ в очагах этой инфекции [15]. Описан случай заболевания КГЛ у рабочего страусиной фермы в ЮАР после разделки туш страусов. Диагноз поставлен на основании выделения вируса из крови заболевшего и последующего определения специфических антител. При исследовании сывороток крови страусов обнаружены антитела к вирусу ККГЛ у 22 из 92 обследованных

птиц, в том числе и среди птиц на ферме, где произошло заражение человека. Вспышка заболевания КГЛ среди рабочих страусиной фермы в ЮАР повторилась в 1996 г. и способствовала проведению экспериментального заражения молодых страусов вирусом ККГЛ с целью определения у них вирусемии, подобно той, которую определяли у других прокормителей клещей рода *Hyalomma*. R. Swanepoel и соавт. [14] удалось определить вирус в крови птиц в титре до $4,0 \lg \text{ЛД}_{50}/0,01 \text{ мл}$ в течение 4 сут после заражения. Вирус также обнаружен в печени, селезенке и почках зараженных птиц.

Следует отметить положительные результаты исследования на антиген вируса ККГЛ, полученные в ИФА от грачей в республике Калмыкия [11].

Лабораторная диагностика КГЛ базируется на использовании классических методов, заключающихся в выделении вируса из биологического материала с последующей его идентификацией. Длительность выделения вируса на новорожденных белых мышках и (или) культуре клеток диктует необходимость внедрения в практику диагностических тестов, служащих целям экспресс-диагностики для своевременного проведения профилактических мероприятий. В рамках эпидемиологического надзора все чаще используются молекулярно-генетические методы исследования, являющиеся арбитражным тестом при диагностике арбовирусных болезней.

Цель работы – определение эколого-эпидемиологического значения птиц в циркуляции вируса ККГЛ на территории Ростовской области с использованием серологических и молекулярно-генетических методов.

Материалы и методы

Исследование птиц проводили на территории Ростовской области в период с 2000 по 2006 год. Птицы добывались методами отстрела и капканным. Исследовано 977 экз. (758 проб) птиц 29 видов, входящих в 6 отрядов и 17 семейств (врановые, скворцовые, трясогузковые, крапивниковые, дроздовые, синицевые, воробьиные, вьюрковые, овсянковые, завирушковые, голубиные, авдотковые, чайковые, фазановые, цаплевые, ибисовые, поганковые), в том числе врановых (грачи) – 719 экз. В силу особенностей формирования противовирусного иммунитета у птиц исследовали не сыворотки крови на наличие антител, а головной мозг и сгустки крови на наличие антигена вируса ККГЛ.

Время сбора материала было круглогодичным, чтобы, с одной стороны, оценить зараженность перелетных птиц на территории гнездового ареала сразу после возвращения с мест зимовок (начало мая), с другой – обследовать «местные» виды.

Для обнаружения антигена вируса ККГЛ в 10 % суспензиях головного мозга и сгустков крови грачей использован прямой вариант иммуноферментного анализа (ИФА) в «сэндвич»-модификации с тест-

системой производства института вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН и фирмы «Вектор-Бест» (Новосибирск). Постановку реакции осуществляли в соответствии с прилагаемыми к тест-системам инструкциями, учет результатов – с помощью спектрофотометра Titertec Multiscan Plus MK II с учетом оптической плотности при длине волны 450 нм и визуально.

Выявление специфической РНК вируса ККГЛ проведено методом ОТ-ПЦР с использованием набора «Векто Крым РНК ампли-100» производства фирмы «Вектор-Бест» и препарата обратной транскриптазы M-MuLV RT («Медиген», Новосибирск, Россия).

Результаты и обсуждение

При исследовании 758 проб птиц антиген вируса ККГЛ обнаружен в 19 ($2,51 \% \pm 0,57$) пробах грачей. Несмотря на повсеместное распространение врановых в Ростовской области, положительные находки обнаружены в четырех районах. В 2001 г. антиген вируса ККГЛ выделен от грачей, доставленных из Цимлянского (головной мозг – 1 проба) и Обливского районов (головной мозг – 2, сгусток крови – 1). В 2002–2004 и 2006 гг. положительными были пробы головного мозга грачей, добытых на территории Аксайского района, прилегающего к Ростову-на-Дону: в 2002 г. – одна проба, 2003 – шесть, 2004 – пять, 2006 – две. В 2005 г. антиген вируса ККГЛ обнаружен в одной пробе мозга грача, добытого в Мясниковском районе. Обнаружение антигена подтверждено детекцией специфической РНК в ОТ-ПЦР.

В указанных районах установлено обитание клещей *H. marginatum marginatum*, *D. marginatus*, *Rh. rossicus* – основных переносчиков вируса ККГЛ, кроме Мясниковского района, где клещ *H. marginatum marginatum* в сборах не обнаружен. Зараженные вирусом клещи выявлены в Цимлянском (*H. marginatum marginatum*, *D. marginatus*, *Rh. rossicus*), Обливском (*H. marginatum marginatum*) и Мясниковском (*Rh. rossicus*) районе. По данным Т.В.Мазрухо и др. [6], из клещей *H. marginatum marginatum* в Цимлянском районе изолирован вирус ККГЛ.

Одним из критериев, подтверждающих ареал вируса, явилось выявление иммунной прослойки среди обследованных выборочных групп населения (доноры и другие контингенты из групп риска) в Цимлянском и Обливском районах. Указанные районы выделяются по наибольшему проявлению активности эпизоотического и эпидемического процессов при определении ареала вируса ККГЛ. Выявление антигена в ИФА и РНК вируса ККГЛ в ОТ-ПЦР в головном мозге грачей не только подтвердило ареал вируса в Цимлянском, Обливском и Мясниковском районах, но и расширило наши представления о распространении вируса за счет обнаружения в Аксайском районе.

Сезон обнаружения антигена вируса ККГЛ у грачей при ежемесячном обследовании варьировал с мая (2002, 2006 гг., Аксайский район) по август (2001 г., Обливский район), а в 2005 г. антиген вируса ККГЛ обнаружен в ноябре (Мясниковский район). Полученные данные позволяют пересмотреть роль птиц только как транспортеров и прокормителей преимаго клещей и свидетельствуют об их участии в циркуляции вируса ККГЛ.

Определяя значение птиц в циркуляции вируса ККГЛ, мы пришли к выводу, что, во-первых, применяемые в современный период серологические (ИФА) и молекулярно-генетические (ОТ-ПЦР) реакции адекватны для исследования птиц на наличие антигена и РНК вируса. Во-вторых, учитывая, что птицы условно подразделяются на три экологические группы (перелетные, кочующие, оседлые), мы пришли к выводу, что врановые на территории Ростовской области являются оседло-кочующим видом. Так, Н.Б.Бируля и соавт. [3] указывают, что суточные перемещения грачей от мест ночевки до мест кормежки в июле–августе, в сезон массового паразитирования клещей, составляет 15–25 км в один конец.

Суточные перемещения грачей способствуют обмену возбудителями между мигрирующими и местными видами, которые могут включаться в циркуляцию возбудителей, совершенно несвойственных данной местности. Значение в круговороте вируса грачей в период их оседлой жизни соизмеримо со значением всех остальных позвоночных хозяев и зависит от специфических взаимоотношений с вирусом и кровососущими эктопаразитами. С другой стороны, врановые – типичные синантропы, контактирующие с человеком посредством переносчиков (клещей, мокрецов и др.), что создает предпосылки для заноса возбудителей в синантропные биоценозы и развития эпизоотий, а затем и эпидемических вспышек КГЛ.

Обнаружение антигена вируса ККГЛ в сгустках крови грачей свидетельствует, по нашему мнению, об инфекционном процессе, протекающем в инapparантной форме. Персистенция вируса в форме носительства или латентной хронической инфекции сводится к длительному поддержанию инфекционного процесса в чувствительных к данному вирусу клетках и может способствовать заражению кровососущих преимаго переносчиков, определяя роль врановых как доноров вируса ККГЛ. Подтверждением этому является длительность обнаружения антигена вируса ККГЛ в мозге грачей (май–ноябрь).

Обнаружение антигена вируса ККГЛ в мозге объясняется нейротропностью вируса, также имеет значение присасывание инфицированных вирусом клещей вокруг глаз птицы, что, по нашему мнению, подобно «прямому внутримозговому заражению в естественных условиях».

Следовательно, перенос вирусов птицами может осуществляться двумя способами: первый – транс-

портировка зараженных переносчиков, второй – перенос вируса, циркулирующего в крови. Особи, имеющие вирус в крови, могут быть источником инфекционного агента для кровососущих переносчиков и тем самым способствовать интродукции возбудителя в местах гнездований птиц.

Таким образом, грачи – полноценный сочлен природных очагов КГЛ, выполняющий несколько функций. На территории Ростовской области врановые являются оседло-кочующим синантропным видом. Суточные миграции птиц и высокая по сравнению с другими животными подвижность, частота паразитарных контактов, транспортировка вирусосодержащих клещей и самого инфекционного агента весьма существенны для обмена возбудителями между очагами и заноса в соседние, в том числе синантропные биоценозы, с развитием эпизоотий и затем эпидемических вспышек. Значение этого семейства в генезе эпидемических проявлений заключается в рассеивании вируса, расширении уже имеющихся природных очагов КГЛ и формировании новых, что необходимо учитывать при проведении эпидемиологического надзора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аристова В.А., Колобухина Л.В., Щелканов М.Ю. и др. Экология вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки и особенности ее клиники на территории России и сопредельных стран. *Вопр. вирусол.* 2001; 4:7–15.
2. Березин В.В., Чумаков М.П., Столбов Д.Н. и др. *Труды ИПВЭ АМН СССР.* 1971; XIX:210–7.
3. Бируля Н.Б., Залуцкая Л.И., Перелатов В.Д. *Труды ИПВЭ АМН СССР.* 1971; XIX:180–6.
4. Василенко Н.Ф., Афанасьев Е.Н., Санникова И.В. и др. Крымская-Конго геморрагическая лихорадка в Ставропольском крае в 2002 г.: лабораторная диагностика. *Пробл. особо опасных инф.* 2003; 86(2):139–48.
5. Грижебовский Г.М., Брюханова Г.Д., Чумакова И.В. и др. О природной очаговости Крымской геморрагической лихорадки в Ставропольском крае в современных условиях. В кн.: *Матер. конф., посв. 70-летию Противочумн. центра. М.; 2004.* С. 173–177.
6. Мазрухо Т.В., Громашевский В.Л., Говорухина М.Ю. и др. Зараженность клещей *Hyalomma marginatum* Koch. 1844 вирусом Крымской-Конго геморрагической лихорадки в Ростовской области в эпидемический сезон 2000 г. *Вопр. вирусол.* 2001; 4:20–1.
7. Москвитина Э.А., Водяницкая С.Ю., Ломов Ю.М. и др. Крымская геморрагическая лихорадка в Ростовской области: эпидемиологическое районирование и активность природного очага. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2002; 6:26–30.
8. Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Ломов Ю.М. и др. Крымская-Конго геморрагическая лихорадка в Ростовской области: эпидемиологические особенности вспышки 1999 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2000; 80:3–13.
9. Онищенко Г.Г. Об эпидемиологической обстановке по особо опасным, природно-очаговым и другим инфекциям на территории Южного Федерального округа. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2004; 3:23–30.
10. Пионтовская С.П. В кн.: *Крымская геморрагическая лихорадка. Симферополь; 1945.* С. 100–105.
11. Подсвилов А.В., Яикулов К.Б., Обраткин В.В. и др. К вопросу об эпизоотической и эпидемиологической активности природного очага Крымской-Конго геморрагической лихорадки на территории Республики Калмыкия в 2000–2001 гг. В кн.: *Акт. пробл. эпидемиол. безопасности. Ставрополь; 2002.* С. 203–207.
12. Чумаков М.П. Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ). В кн.: *Вирусные геморрагические лихорадки. М.; 1979.* С. 10–33.
13. Чунихин С.П., Чумаков М.П., Бутенко А.М. и др. В кн.: *Матер. XVI научной сессии ИПВЭ АМН СССР. М.; 1969.* Вып. 2. С. 158–160.
14. Swanepoel R., Leman P.A., Burt F.I. *J. Epidemiol. Infect.* 1998; 121(2):427–32.
15. Zeller H.G., Cornet J.P., Camicas J.L. *Res. Virol.* 1994; 145(2):105–9.

S.Yu. Vodyanitskaya, E.A. Moskvitina, N.L. Pichurina,
A.V. Zabashta, I.V. Orekhov, B.N. Mishan'kin, S.O. Vodopyanov,
I.Yu. Suchkov

Crimean Hemorrhagic Fever: Ecologic and Epizootic Role of the *Corvidae* Family

Rostov Anti-Plague Research Institute

The role of birds in the circulation of the virus of Congo-Crimean hemorrhagic fever (CCHF) is described in the paper. Investigation of 758 samples of birds revealed the virus CCHF antigen to be present in 19 (2.51 % $\pm$ 0.57)

rooks' samples. *Corvidae* were shown to be a full-fledged co-member of the Crimean hemorrhagic fever (CHL) natural foci in the territory of Rostov Region. Epidemiologic significance of this bird family consists in dissemination of the CCHF virus, expansion of the existing natural CHL foci, and thereby supporting the formation of new ones. Ecologic and epizootologic role of *Corvidae* should be taken into consideration while conducting epidemiologic surveillance in HCL natural foci.

Key words: Crimean hemorrhagic fever, CCHF virus, *Corvidae* family, rook, antigen, natural focus.

Поступила 09.10.07.

УДК 61+57:331.821

И.Н.Ежов¹, Ю.И.Яшечкин¹, М.Н.Ляпин¹, И.Г.Дроздов²

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ И ОЦЕНКИ ОПАСНОСТИ РАБОТ НА ОБЪЕКТАХ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОФИЛЯ

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

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

В рамках аналитического исследования представлены современные подходы, разработка которых важна для рационального управления безопасностью на объектах медико-биологического профиля. Анализируются особенности формирования и пути объективизации способов оценки биоопасности. Обсуждается место и роль биобезопасности как научного направления в связи с вопросами перспективности практического использования элементов «теории рисков» для подготовки управляющих решений на основе комплексных аргументированных оценок. Формулируется архитектура системы моделирования и оценки потенциальной опасности работ с патогенными биологическими агентами.

Ключевые слова: безопасность, биобезопасность, риск, патогенные биологические агенты, объекты медико-биологического профиля.

Формирование концептуальной основы устойчивого развития системы человек – общество – природа сегодня требует научного обоснования реальных путей комплексного решения вопросов безопасности [20, 25, 29, 35]. Понятие безопасность (Б) пора не только по новому осмыслить, но и придать ему то созидательное значение, которое способно внести качественно улучшающие изменения во все области нашей жизни, то есть вывести безопасность на уровень универсальной научной категории, отражающей прогрессивные тенденции развития современного общества.

Рассматривая биологическую безопасность (ББ) как важное направление молодой науки – безопасность жизнедеятельности и как составную часть активно формирующихся современных доктрин в области охраны здоровья, жизни и эпидемического благополучия населения, следует констатировать, что в данной и смежных областях знаний назрела необходимость перехода к более универсальным методологическим подходам, позволяющим формировать аналитическую понятийную и методическую базы на комплексной научной основе, с максимальным использованием возможностей и достижений смежных дисциплин.

Несмотря на существование подходов, позволяющих оценивать эффективность решений в чисто технических областях безопасности [3–6, 9], в арсенале биобезопасности пока отсутствуют достаточно надежные и универсальные способы комплексной

оценки опасности и риска, прогнозирования и моделирования чрезвычайных происшествий и ситуаций (ЧП и ЧС) [7], а также стандартизированный с другими видами безопасности понятийный аппарат.

Из перечисленного, наиболее неотложной и актуальной сегодня выглядит необходимость совершенствования и объективизации методов оценки биогенных опасностей, что следует рассматривать в качестве базовой научно-практической задачи биобезопасности, в рамках которой особое место должны занимать вопросы определения потенциальной опасности работ, связанных с патогенными биологическими агентами (ПБА). В данной области пока не разработан специальный аппарат индексации и шкалирования факторов опасности и критерии их сравнения, а также система, позволяющая моделировать условия деятельности с ПБА и объективно оценивать степень их потенциальной опасности.

Ранее нами было показано, что существующую проблему следует решать с позиций теории общей рискологии и современной методологии безопасности [7].

Целью настоящей работы была разработка системы моделирования и оценки потенциальной опасности работ с ПБА на объектах медико-биологического профиля по результатам аналитического исследования в области теории рискологии.

Задачи исследования предусматривали: определение степени применимости различных аналитических и оценочных методов общей рискологии в

области биобезопасности; выбор «метода» и создание с его помощью базовой модели, принципиально пригодной для анализа и последующей оценки биогенных опасностей; разработку архитектуры и управляющих алгоритмов компьютерной системы моделирования потенциальной опасности.

Принятый еще в 1997 г. закон «О промышленной безопасности опасных производственных объектов» [10] предусматривает, что предприятие (учреждение) – источник повышенной опасности обязано обеспечить меры по защите населения и окружающей среды от опасных воздействий. Однако в вышеупомянутом документе вопросам рационализации обеспечения биологической безопасности вообще не отведено самостоятельного значения. Положительную динамику в процесс формирования системы управления ББ способен внести вступивший в силу в июле 2003 г. федеральный закон «О техническом регулировании», в котором впервые законодательно закреплена необходимость комплексной разработки и регламентирования требований, обеспечивающих наряду с различными видами Б и биологическую безопасность [11]. В соответствии с данным документом понятие безопасность рассматривается как состояние при котором отсутствует недопустимый риск, связанный с причинением вреда, а риск рассматривается как вероятность причинения вреда. Из этого следует, что риск должен выступать ведущим критерием оценки опасности, а управление риском – центральным звеном системы обеспечения безопасности (в том числе и ББ). Вместе с тем, несмотря на активную разработку общетеоретических аспектов рискологии [4, 17], в методическом арсенале биобезопасности до сих пор отсутствуют способы моделирования и комплексной оценки потенциальной опасности работ с ПБА, имеющие реальное прикладное значение.

Значительных улучшений в существующее положение не внесено и Требованиями по предупреждению ЧС на потенциально опасных объектах и объектах жизнеобеспечения, утвержденных приказом министра по делам ГО и ЧС № 115 от 28.02.03 г. В данном документе лишь декларируется, что к потенциально опасным следует относить объекты, на которых используются, производятся, перерабатываются, хранятся и транспортируются опасные биологические вещества, а также дана чрезвычайно общая классификация степени опасности объектов в зависимости от масштабов возможных ЧС. Очевидно, что этой декларации недостаточно для достоверной оценки объектов медико-биологического профиля, т.к. сегодня достаточно сложно определять вероятность и прогнозировать последствия биологических аварий. Это связано с тем, что биологические аварии имеют ряд особенностей, которые необходимо отдельно квалифицировать и учитывать на этапах оценки риска возникновения и прогноза последствий негативных событий такого рода. Главными особенностями являются способности микроорганизмов к

самовоспроизводству и реализации эволюционно выработанного механизма передачи возбудителя инфекции.

Изложенное предопределило необходимость исследования возможности использования современных рискологических разработок для целей биобезопасности.

Известно, что абсолютной надежностью и безопасностью могут обладать только системы (технологии), полностью лишенные энергетического потенциала, а также активных биологических или других компонентов. Это идеальное и практически недостижимое состояние, поэтому во всех видах деятельности риск происшествий и аварий не может быть равен нулю. В этом суть концепции ненулевого риска, согласно которой следует стремиться к снижению риска до бесконечно малых величин за счет наращивания ступеней защиты, повышения надежности, эффективного контроля и своевременного выполнения регламентных работ [9, 17, 32].

По мнению специалистов, для оценки потенциальной опасности различных технологий необходимо комплексно рассматривать и анализировать структурные элементы многоуровневой системы человек – машина – окружающая среда (ЧМС) [1, 22–24]. Это в самом общем виде справедливо и с позиций ББ, однако для моделирования биоопасности рассматриваемую систему в каждом конкретном случае следует уточнять, максимально учитывая особенности биомедицинской деятельности с ПБА.

Взаимодействие компонентов, входящих в систему ЧМС, может быть штатным и не штатным. Не штатное выражается в виде инцидентов или происшествий – нежелательных, незапланированных, непреднамеренных событий, нарушающих обычный ход вещей и происходящих в относительно короткий отрезок времени [24]. Отсюда, понятия авария, ЧС, катастрофа следует рассматривать как варианты развития предшествующих им инцидентов и происшествий по неблагоприятному сценарию. В ББ авария трактуется как не штатная ситуация, при которой создается реальная или потенциальная возможность выделения ПБА в воздух производственной зоны, среду обитания и заражения человека, а биологическая опасность как потенциальная опасность неблагоприятного воздействия ПБА на человека и среду обитания [26]. Изложенное наглядно иллюстрирует особенность трактовки базовых понятий Б с позиций ББ и дает основание расценивать моделирование и оценку потенциальной опасности как обязательный этап анализа биомедицинской деятельности с использованием ПБА. Причем особое место при исследовании потенциальной опасности принадлежит моделированию явлений и процессов, связанных с возникновением происшествий. Это обусловлено неприемлемостью по этическим и экономическим соображениям экспериментального изучения тех аспектов, которые касаются жизни, здоровья людей и загрязнения окружающей среды. В данных усло-

виях только путем моделирования можно заблаговременно пополнить представления о причинах и закономерностях возникновения, стратегии и тактике предупреждения происшествий, компенсировать дефицит статистических данных (что особенно актуально для ББ).

Анализируя современные рискологические подходы к моделированию и оценке опасности, следует выделять:

Методы качественной оценки – предварительного анализа опасностей, позволяющие проводить поиск причин ЧС, ЧП и аварий [3, 5]. Это инструмент чисто описательный, он трудоемок, требует наличия специальной статистики, не предусматривает формализацию данных. В биобезопасности его использование возможно только после глубокой целевой переработки, которая не выполнима из-за отсутствия в нашем распоряжении специальных статистических данных. Следует отметить, что проблема информационного обеспечения сегодня имеет общий характер. Специалисты в различных областях безопасности сходятся во мнении, что специализированную интегративную базу данных по указанным направлениям в России создать затруднительно из-за закрытости широкой информации по большинству интересующих вопросов, за редким исключением (например, радиационная безопасность) [3, 17]. Это создает определенные трудности в использовании современных способов оценки и упреждающего управления опасностью и риском, затрудняет возможность опираться на аналогичные разработки в смежных областях Б.

Методы прямой количественной оценки, позволяющие определять вероятность возникновения событий, а также оценивать риск и ущерб с экономической точки зрения в системе затраты – выгода [3, 9, 17]. Точность этих методов при оценке опасности биомедицинских технологий нельзя считать приемлемой, так как, учитывая фактор многопричинности, сегодня вероятность биологических аварий невозможно достоверно рассчитать без предварительного проведения анализа причинно-следственной связи событий. Для этого используют методы граф состояний (т.н. деревья событий, причин, отказов, последствий, разработанные на основе «теории древесных графов») – логико-вероятностный подход, способный наглядно представить всю совокупность событий и их сочетаний, имеющих возможность вызвать тот или иной исход. Данный прием позволяет моделировать любые (в том числе потенциально опасные) технологии и ситуации, сочетая в себе элементы формализации данных и «теории надежности» [6, 17, 18, 24, 28]. Разработка таким способом алгоритмов оценки опасности и риска в лабораториях, ведущих работы с ПБА, перспективна, однако на сегодня крайне затруднена из-за отсутствия базовых вероятностных характеристик надежности различных биомедицинских методических приемов и технологических линий.

Методы индексирования – качественно-количественный подход, который используют для определения потенциальной опасности, если требуется оценить риск интегрально, не вдаваясь в мелкие детали процессов. Его основная идея – оценить некоторым числовым значением (индексом) степень опасности рассматриваемой системы [22, 23, 33]. Эти методы применимы для целей биобезопасности, однако требуют предварительной разработки специального аппарата индексации и шкалирования.

Следует констатировать, что изложенная в обзоре теоретическая база еще не нашла должного воплощения в области биобезопасности. Это, в первую очередь, определяется биологической составляющей опасностей, коренным образом отличающей ББ от других отраслей безопасности жизнедеятельности человека. Поэтому попытка оценивать сложные дискретные биологические системы с чисто технических позиций неминуемо вызывает дополнительные неопределенности и связанное с ними снижение достоверности получаемых результатов, а прямой перенос ранее разработанных алгоритмов оценки опасности и риска из других областей на биологические объекты сегодня выглядит малоэффективным.

Вместе с тем из результатов анализа очевидно, что биомедицинские технологии поддаются формализации, т.е. описанию системами уравнений, логическими и математическими моделями, позволяющими получать качественно-количественные характеристики степени их потенциальной опасности. Это позволило провести выбор оптимальных методических подходов к проектированию системы моделирования и оценки биологической опасности.

Для определения степени опасности работ с ПБА использовали методологические принципы построения интеллектуальных имитационных моделей сложных дискретных систем [14, 19], энтропийную концепцию о природе происшествий [15, 31], которые рассматривали с позиций системного анализа [8, 12, 21, 27] и технического регулирования [11].

Исходя из данных принципов, построена типовая модель технологического процесса, учитывающая характер и особенности деятельности, условия хранения и использования опасных компонентов. Так как реализация большинства способов оценки опасности и риска в рамках биобезопасности на сегодня затруднена из-за недостатка фактического материала, пригодного для прямого статистического анализа и математического моделирования, нами был применен подход индексирования.

В качестве прототипа взят проверенный в практике обеспечения пожаро-взрывобезопасности метод вычисления индекса Дау (Dow Fire and Explosion Index) [33]. Используя его в качестве прототипа, нами разработан способ вычисления интегративного показателя биологической опасности (ИПБО), отличительной особенностью которого является система индексирования технологических и биологических характеристик.

Определение индексов потенциальной опасности базовых характеристик процесса построено на ранжировании их по степени важности в соответствии с предпочтениями эксперта путем решения многокритериальной задачи оценки и проверки на согласованность.

Числовое значение ИПБО формируется как произведение двух интегральных показателей: материального (M) и узлового (F) – $ИПБО = M \cdot F$.

В качестве материального выступает индексированный показатель потенциальной опасности микроорганизма, с которым проводится работа. Он вычисляется исходя из оценки ПБА по нескольким ранжированным по значимости критериям, таким как летальность, заражающая доза, контагиозность и другим. Кроме этого, величина его зависит от шкалированного показателя, отражающего усредненную количественную характеристику ПБА, находящегося в рассматриваемой системе, с которым возможен контакт оператора на каждом из основных технологических этапов работы.

$$M = v \cdot n,$$

где: v – индексированное количество ПБА; n – индекс потенциальной опасности ПБА.

Узловой показатель (F) отражает потенцирующую опасность условий и характера работы и качества работника. Он состоит из двух групповых факторов: общих опасностей – различные характеристики рабочей зоны и специфических опасностей – характеристики технологического процесса, исполнителя, манипуляций, методов.

$$F = f1 \cdot f2,$$

где: $f1$ – фактор общих опасностей; $f2$ – фактор специфических опасностей.

Особенность применения метода индексной оценки в сфере ББ состоит в том, что используемые показатели не имеют параметрических значений, и их оценка основывается на мнении эксперта о степени превосходства одного параметра над другим. Таким образом, ключевым моментом применения данного метода оценки является разработка алгоритма индексирования показателей и оценочных критериев. За основу была взята методология определения уровня важности критериев при решении многокритериальных задач в теории принятия решений [19].

В основе метода лежит следующее положение. Переход от вербальных сравнений критериев лица, принимающего решения (эксперта), к числам должен происходить на основе некоторых предположений о поведении человека при сравнительных измерениях. Известный в психофизике закон Вебера–Фехнера [30, 34] утверждает, что субъективное расстояние между двумя стимулами пропорционально величине стимула. Таким образом,

$$C_j = (1+k) C_{j-1} = (1+k)^j C_{min},$$

где: C_j, C_{j-1}, C_{min} – субъективные восприятия, k – постоянная.

Отсюда мы имеем шкалу с геометрической прогрессией, где фактор прогрессии равен $(1+k)$.

Итак, индексирование, основанное на данной предпосылке, включает в себя следующие этапы: первичное измерение и сравнение критериев и показателей с помощью словесной шкалы по степени превосходства, перевод результатов в количественный вид с помощью геометрической шкалы.

Исходя из этого, оценочные критерии и показатели индексируют, а все множество возможных значений ИПБО по геометрической шкале разделяют на пять основных степеней опасности. Такая шкала позволяет каждому конкретному объекту (процессу, методу) присваивать степень потенциальной опасности с определенным уровнем достоверности и правдоподобия. В дальнейшем, по мере накопления фактического материала, шкалу предполагается модернизировать в сторону соотнесения показателей ИПБО с вероятностными реперными величинами риска возникновения инцидента, происшествия, аварии.

Алгоритм моделирования биологической опасности реализован в компьютерной программе. Архитектура программы предусматривает наличие пользовательского и экспертного блоков, а также интегрированных с ними базой данных и банком знаний. Это придает программе широкие возможности моделирования в различных системах индексации, что позволяет увеличивать ее прикладные функции и оптимизировать точность оценок в процессе использования и накопления фактических данных.

Программа спроектирована по принципу многооконного интерфейса – MDI (multiple document interface), что позволяет неограниченно развивать ее в будущем, интегрируя дополнительные алгоритмы анализа, оценки и прогнозирования опасности, риска и ущерба.

В первичном варианте проектирования в компьютерной программе предполагается реализовать возможности, позволяющие выполнять виртуальное моделирование, имитирующее условия проведения разнообразных манипуляций с ПБА; оценивать потенциальную опасность различных методических приемов работы с разными видами и количествами ПБА; сравнивать рабочие места, помещения, лабораторные блоки и другие объекты по интегративному показателю биологической опасности; подбирать оптимальные варианты обеспечения работ, направленные на снижение уровня их опасности; обеспечивать поддержку управляющих решений; накапливать, хранить и анализировать информацию в развернутом и формализованном виде; отображать результаты тестирования в графической форме.

Таким образом, биомедицинские технологии, как и другие физические процессы, поддаются формализации, но надежность оценок зависит от полноты, точности и квалифицированной интерпретации сведений.

Методологию ББ на потенциально опасных объектах необходимо формировать с позиций технического регулирования [11], что предусматривает декларируемое обеспечение безопасности потенциально опасных

биологических объектов, а также разработку общих и частных регламентов проведения потенциально опасной деятельности на основе рискологических подходов.

Дальнейшее совершенствование методов моделирования и оценки риска в области биобезопасности актуально и необходимо. Это даст возможность комплексно оценивать опасности различного происхождения в сочетании с биогенными и повысить стандартность оценок и надежность прогнозов.

Практическое использование спроектированной системы в рамках ББ, по мере накопления фактического материала (в этом состоит следующий этап нашей работы), будет способствовать повышению эффективности использования нормативной базы биобезопасности и облегчит лицам, принимающим решения, выбор оптимальных и экономически обоснованных вариантов управления.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Базовский И. Надежность. Теория и практика. М.: Мир; 1965.
2. Белов П.Г. Теоретические основы системной инженерии безопасности. М.: ГНТП Безопасность, МИБ СТС; 1996.
3. Белов С.В., редактор. Безопасность жизнедеятельности М.: Высшая школа; 2001.
4. Буянов В.П., Курсанов К.А., Михайлов Л.А. Управление рисками (рискология). М.: Экзамен; 2002.
5. Воробьев Ю.Л. Основные направления государственной стратегии снижения рисков и смягчения последствий ЧС в Российской Федерации на период до 2010 года. Пробл. безопасности при ЧС. М.: ВИНТИ; 1997:4.
6. Герцах И.Б., Кордонский Х.Б. Модели отказов. М.: Советское радио; 1966.
7. Ежов О.Н., Ежов И.Н. Науч. пробл. нац. безопасности России: Межвуз. сб. Саратов: Юл; 2003. С. 184–191.
8. Емельянов В.В., Ясиновский С.И. Введение в интеллектуальное моделирование сложных дискретных систем и процессов. Язык РДО. М.: АНВИК; 1998.
9. Забегаев А.В. Безопасность жизнедеятельности. М.: Изд-во АСВ; 2001.
10. Закон Российской Федерации «О промышленной безопасности опасных производственных объектов» от 21.07.97 N 116-ФЗ.
11. Закон Российской Федерации «О техническом регулировании» от 27.12.02 N 184-ФЗ.
12. Клар Дж. Системология. Автоматизация решения системных задач. М.: Радио и связь; 1990.
13. Концепция перехода Российской Федерации к устойчивому развитию, утв. Указом Президента Российской Федерации от 1 апреля 1996 г. № 440.
14. Коптюг В.А. Конференция ООН по окружающей среде и развитию (Рио-де-Жанейро). Инф. обзор. Новосибирск; 1992.
15. Котик М.А., Емельянов А.М. Природа ошибок человека-оператора. М.: Транспорт; 1993.
16. Котляревский В.А., Забегаев А.В., редакторы. Аварии и катастрофы: Предупреждение и ликвидация последствий. Книга 4. М.: АСВ; 1998.
17. Котляревский В.А., Забегаев А.В., редакторы. Аварии и катастрофы: Предупреждение и ликвидация последствий. Книга 5. М.: АСВ; 2001.
18. Кочетков К.Е., Котляревский В.А., Забегаев А.В., редакторы. Аварии и катастрофы: Предупреждение и ликвидация последствий. Книга 2. М.: АСВ; 1996.
19. Ларищев О.И. Теория и методы принятия решений. М.: Логос; 2002. С. 122–124.
20. Лось В.А., Урсул А.Д. Устойчивое развитие: Уч. пособ. М.: Изд-во Агар; 2000.
21. Методические рекомендации по разработке целевых научно-технических программ. М.: ОНТИТЭИ Микробиопром; 1982.
22. Методические рекомендации по идентификации опасных производственных объектов. РД 03-260-99. М.: ПИО ОБТ; 2001.
23. Методические указания по проведению анализа риска на опасных производственных объектах. РД 08-120-96. М.: ПИО ОБТ; 2001.
24. Перегудчиков И.В., Крышевич О.В. Надежность технических систем и техногенный риск. Ч. 1: Управление риском системы человек – машина – среда. М.: Изд-во МГТУ им. Н.Э.Баумана; 1998.
25. Программа действий. Повестка дня на XXI в. и другие документы конференции в Рио-де-Жанейро. Женева; 1993.
26. СП 1.3.1285-03. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). Санитарно-эпидемиологические правила. Бюл. норм. и метод. док. Госсанэпиднадзора. 2003; 13(3):45–144.
27. Славин М.Б. Практика системного моделирования в медицине. М.: Медицина; 2002.
28. Справочник по надежности. М.: Мир; 1970. Т. 1–3.
29. Урсул А.Д. Переход России к устойчивому развитию. Ноосферная стратегия. М.: Ноосфера; 1998.
30. Фресс П., Пиаже Ж. Экспериментальная психология. М.: Прогресс; 1966. Вып. 1–2.
31. Хенли Э. Дж., Куамато Х. Надежность технических систем и оценка риска. М.: Машиностроение; 1984.
32. Хоружая Т.А. Оценка экологической опасности. М.: Книга сервис; 2002.
33. Хохлов Н.В. Управление риском. М.: ЮНИТИ-ДАНА; 2001.
34. Ярошевский М.Г. История психологии. М.: Мысль; 1966. С. 282–284.
35. Kulmann A. Introduction to safety science. New-York; 1986.

I.N.Yezhov, Yu.I.Yashechkin, M.N.Lyapin, I.G.Drozdov

Development a System for Modeling and Assessing the Hazard of the Works in Medical and Biological Facilities

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov;
State Center of Virology and Biotechnology Researches "Vector",
Koltsovo

Within the frames of an analytical review, modern approaches are described whose development is considered to be very important in order to rationally operate secure working procedures at the facilities of medical and biological profile. Peculiarities of formulating the methods to assess biological hazards are analyzed together with the ways of their objectivization. The place and the role of biological safety as a scientific trend are discussed in relation with the problem of availability of practical application of the "risk theory" elements with the aim of making governing decisions based on complex, well established estimations. The architecture of the system of modeling and estimation of potential danger associated with handling pathogenic biological agents is enunciated.

Key words: safety, biosafety, risk, pathogenic biological objects, medical and biological facilities.

Поступила 26.10.07.

Т.Н.Орлова¹, Н.Ф.Василенко¹, Е.Н.Афанасьев¹, И.В.Чумакова¹,
И.В.Санникова², А.Н.Куличенко¹

ИЗУЧЕНИЕ ЦИРКУЛЯЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЛАЙМ-БОРРЕЛИОЗА В СТАВРОПОЛЬСКОМ КРАЕ

¹ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора;

²ГОУ ВПО «Ставропольская государственная медицинская академия»

Методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в суспензиях иксодовых клещей *Ixodes ricinus* выявлена рРНК возбудителя иксодового клещевого боррелиоза (Лайм-боррелиоза), зараженность составила 7,1 %. Рост заболеваемости и довольно высокий уровень иммунной прослойки населения края к возбудителю Лайм-боррелиоза (3,9 %) свидетельствуют о циркуляции боррелий на территории Ставропольского края и указывают на то, что клещи *I. ricinus* являются резервуаром и переносчиком этой болезни в данном регионе. Мониторинг за численностью иксодовых клещей, обследование их на носительство возбудителя Лайм-боррелиоза позволит прогнозировать возможность заражения людей, проживающих на энзоотичной территории.

Ключевые слова: *Ixodes ricinus*, *Borrelia burgdorferi*, полимеразная цепная реакция, иммуноферментный анализ, иксодовый клещевой боррелиоз (Лайм-боррелиоз).

В последние десятилетия возросла заболеваемость природно-очаговыми инфекциями, прежде всего передаваемыми иксодовыми клещами. Антропогенная трансформация ландшафтов в результате разнообразных по форме и степени хозяйственных преобразований, роста техногенного влияния на среду обитания человека, потепления климата привела к улучшению условий, способствующих существованию различных видов животных, в том числе носителей опасных заболеваний человека – иксодовых клещей [1, 7]. Основными переносчиками боррелий, обеспечивающими их циркуляцию в природных очагах и имеющими решающее эпидемиологическое значение, являются пастбищные клещи рода *Ixodes*. В нашей стране таковыми являются два вида иксодовых клещей: таежный клещ (*Ixodes persulcatus*), ареал которого распространяется от Прибалтики до Тихого океана, и лесной клещ (*Ixodes ricinus*), распространенный в Европе [2, 4, 6].

Высокая численность иксодовых клещей *I. ricinus* на территории Ставропольского края и благоприятные условия для их обитания способствовали возникновению случаев заболеваний иксодовым клещевым боррелиозом (Лайм-боррелиозом) [8].

Целью наших исследований явилось определение зараженности иксодовых клещей возбудителем Лайм-боррелиоза и уровня иммунной прослойки населения Ставропольского края с помощью молекулярно-биологических и иммунологических методов.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили иксодовые клещи и сыворотки крови доноров. Сбор иксодовых клещей осуществляли с апреля по сентябрь

2006–2007 гг., в период их активного паразитирования, на стандартный флаг по общепринятой методике [3]. Исследовали как единичных клещей, так и пулы, состоящие не более чем из 10 особей. При формировании пулов учитывали фазу развития клеща и место сбора.

Видовой состав иксодид, вызывающих Лайм-боррелиоз на территории Евразии, в наших сборах был представлен видом *I. ricinus*. Кроме этого вида, исследованы иксодовые клещи, которые попадали в сборы: *Dermacentor marginatus*, *D. pictus*, *Rhipicephalus rossicus*, *Rh. sanguineus*, *Haemaphysalis punctata*, *Hyalomma marginatum*, *H. scupense*.

Всего было сформировано и исследовано 212 пулов из 2008 особей. Исследование суспензий клещей осуществляли с помощью тест-системы «АмплиСенс® *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*)» для выявления рРНК *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Анализ проводили в три этапа: выделение РНК из клинического материала; постановка реакции обратной транскрипции и проведение ПЦР и электрофоретического анализа продуктов ПЦР-амплификации. Учет результатов проводили по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплификации кДНК.

Сыворотки крови доноров получены из краевой станции переливания крови (Ставрополь) в 2006–2007 гг. Исследовано 813 проб. Антитела к возбудителю Лайм-боррелиоза в сыворотках крови доноров выявляли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-системы «ЛаймБест» ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск), представляющей собой набор, основой которого яв-

ляются рекомбинантные антигены *Borrelia burgdorferi s.l.*, иммобилизованные на поверхности лунок полистиролового планшета.

Результаты и обсуждение

В результате проведения ОТ-ПЦР в 14 пробах суспензий клещей *I. ricinus* и в одной пробе *D. marginatus* обнаружена рНК возбудителя клещевого боррелиоза, зараженность имаго при этом составила 5,7 %, нимф – 1,4 %. Положительные пробы выявлены в лесостепной и предгорной ландшафтных зонах края: 9 проб в Ставрополе, две в Кисловодске и по одной в Предгорном, Шпаковском районах, городах Пятигорске и Железноводске (табл. 1).

О степени активности природного очага ик-

Таблица 1

Исследование клещей на наличие возбудителя иксодового клещевого боррелиоза в Ставропольском крае методом ОТ-ПЦР (2006–2007 гг.)

Ландшафтная зона	Административный район	Фаза развития клеща	Кол-во исследованных пулов	Кол-во положительных пулов	
				абс.	%
Лесостепная	Ставрополь	Имаго	10	7	45,0
		Нимфы	9	2	
		Личинки	1		
	Шпаковский р-н	Нимфы	1	1	100,0
	Изобильненский р-н	Имаго	5	0	0
Предгорная		Нимфы	1		
		Имаго	1	0	0
	Петровский р-н	Имаго	1	0	0
	Александровский р-н	Имаго	2	0	0
	Предгорный р-н	Имаго	3	1	20,0
		Нимфы	2		
	Пятигорск	Имаго	3	1	25,0
		Нимфы	1		
	Железноводск	Имаго	3	1	12,5
		Нимфы	5		
Степная	Кисловодск	Имаго	112	2	1,8
		Нимфы	1		
	Ессентуки	Имаго	1	0	0
	Минераловодский р-н	Имаго	3	0	0
	Невинномысск	Имаго	1	0	0
		Нимфы	8	0	0
	Новоалександровский р-н	Имаго	2		
		Нимфы	2		
	Благодарненский р-н	Нимфы	1	0	0
	Буденновский р-н	Имаго	1	0	0
	Кировский р-н	Имаго	1	0	0
	Андроповский р-н	Нимфы	2	0	0
	Ипатовский р-н	Имаго	1	0	0
	Кочубеевский р-н	Имаго	5	0	0
	Георгиевский р-н	Имаго	17	0	0
	Туркменский р-н	Имаго	1	0	0
	Труновский р-н	Имаго	2	0	0
	Советский р-н	Имаго	2	0	0
Полупустыня	Нефтекумский р-н	Имаго	2	0	0
	Левокумский р-н	Имаго	2	0	0
Итого			212	15	7,1

содового клещевого боррелиоза (ИКБ), распространенности его возбудителя на территории Ставропольского края можно сделать достоверное заключение по результатам изучения уровня иммунной прослойки к возбудителю ЛБ населения, проживающего на этой территории. С этой целью нами исследованы сыворотки крови доноров. Специфические антитела класса G (IgG) выявлены в 32 пробах из 813 исследованных. Наибольшее количество положительных проб обнаружено у доноров Ставрополя: в 22 сыворотках крови из 554 исследованных выявлены специфические антитела класса G к возбудителю Лайм-боррелиоза, причем с высокими титрами (1:800 – 1:3200) – восемь проб. Наличие специфических IgG установлено также в образцах, полученных из Шпаковского, Ипатовского, Изобильненского, Туркменского районов, городов Невинномысск и Буденновск. В 25 пробах, доставленных из городов Светлоград, Михайловск, Кисловодск, Нефтекумского и Благодарненского районов специфических антител не выявлено. В целом уровень иммунной прослойки к возбудителю ИКБ у жителей Ставропольского края составил 3,9 % (табл. 2).

При обследовании больных с лихорадкой, поступающих по провизорным показаниям в инфекционные стационары в весенне-летний период 2004–2005 гг., выявлены новые инфекционные заболевания, ранее не регистрируемые в Ставропольском крае – клещевой боррелиоз (10 больных) и клещевой риккетсиоз (1 больной) [8]. В 2006 г. на территории края зарегистрировано 12 случаев Лайм-боррелиоза, показатель заболеваемости на 100000 населения составил 0,45. В 2007 г. заболеваемость возросла в 2,49 раза (1,12 на 100000 населения). Диагноз ЛБ установлен 30 больным в городах Ставрополь, Пятигорск, Кисловодск и Предгорном районе, где наиболее часто встречается клещ *I. ricinus*.

Зараженность иксодовых клещей *I. ricinus* боррелиями на территории Ставропольского края установлена Э.И.Коренбергом и соавт. [3]. При этом у нимф боррелии не обнаружены, а зараженность имаго, по данным авторов, составила более 15 %. Клещи оказались инфицированными *Borrelia afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana* и *B. lusitaniae*, причем методом ПЦР два последних геновида обнаружены в России впервые.

Таким образом, методом ОТ-ПЦР нами подтверждена зараженность лесного клеща *I. ricinus* возбудителем иксодового клещевого боррелиоза. Рост заболеваемости и довольно высокий уровень иммунной прослойки населения края к возбудителю Лайм-боррелиоза свидетельствуют о циркуляции боррелий на территории Ставропольского края и указывают на то, что клещи *I. ricinus* являются резервуаром и переносчиком этой болезни в данном регионе.

Мониторинг за численностью иксодовых клещей, обследование их на носительство возбудителя

Выявление специфических антител к возбудителю Лайм-боррелиоза в сыворотках крови доноров в Ставропольском крае (2006–2007 гг.)

Административный район	Общее кол-во проб	Кол-во положительных проб		Величина титра специфических антител / количество сывороток				
		абс.	%					
Ставрополь	554	22	4,0	1:100 / 8	1:200 / 4	1:400 / 2	1:800 / 3	1:3200 / 5
Шпаковский район	19	1	5,2	1:100 / 0	1:200 / 0	1:400 / 0	1:800 / 0	1:3200 / 1
Ипатовский район	58	2	3,5	1:100 / 0	1:200 / 2	1:400 / 0	1:800 / 0	1:3200 / 0
Изобильненский район	73	3	4,1	1:100 / 1	1:200 / 2	1:400 / 0	1:800 / 0	1:3200 / 0
Буденновск	51	2	3,9	1:100 / 0	1:200 / 1	1:400 / 1	1:800 / 0	1:3200 / 0
Туркменский район	30	1	3,3	1:100 / 0	1:200 / 0	1:400 / 1	1:800 / 0	1:3200 / 0
Невинномысск	3	1	33,3	1:100 / 0	1:200 / 0	1:400 / 0	1:800 / 0	1:3200 / 1
Светлоград, Михайловск, Кисловодск, Нефтекумский район, Благодарненский район	25	0	0	0	0	0	0	0
<i>Итого</i>	813	32	3,9	1:100 / 9	1:200 / 9	1:400 / 4	1:800 / 3	1:3200 / 7

ЛБ позволит прогнозировать возможность заражения людей, проживающих на энзоотической территории.

заболеваний в Ставропольском крае. В кн.: Матер. VII Межгос. науч.-практ. конф. государств.-участников СНГ; 3–5 окт. 2006; Оболensk, Московской обл., Россия. Оболensk; 2006. С. 67–68.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Данчинова Г.А. Экология иксодовых клещей и передаваемых ими возбудителей трансмиссивных инфекций в Прибайкалье и на сопредельных территориях [автореф. дис. ... д-ра биол. наук]. Иркутск: Изд-во ИГУ; 2006. 46 с.
2. Коренберг Э.И. Болезнь Лайма. Мед. паразитол. 1993; 1:48–51.
3. Коренберг Э.И., Горелова Н.Б., Postic D., Kommu B.K. Новые для России виды боррелий – возможные возбудители иксодовых клещевых боррелиозов. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1999; 2:3–5.
4. Котти, Б.К., Гудиев О.Ю. Иксодовые клещи Ставрополя и его окрестностей. Мед. паразитол. 1997; 4:36–7.
5. Коренберг Э.И., редактор. Методические указания по эпидемиологии, диагностике, клинике и профилактике болезни Лайма. М., 1991. 61 с.
6. Манзенюк, И.Н., Манзенюк О.Ю. Клещевые боррелиозы (болезнь Лайма). Пособие для врачей. Кольцово; 2005. 85 с.
7. Рудакова С.А., Рудаков Н.В., Токарев Н.К. и др. Новые данные об иксодовых клещевых боррелиозах в регионах Сибири и Казахстана. В кн.: Матер. VIII Всерос. съезда эпидемиол., микробиол. и паразитол.; 26–28 марта 2002; Москва, Россия. М.; 2002. Т. 1. С. 385–387.
8. Санникова И.В., Сысолятина Г.В. Эпидемические эволюционные аспекты клещевых трансмиссивных инфекционных

T.N.Orlova, N.F.Vasilenko, E.N.Afanasiev,
I.V.Chumakova, I.V.Sannikova, A.N.Kulichenko

Studying the Circulation of Etiological Agent of Lyme Borreliosis in Stavropol Region

FSOH "Stavropol Anti-Plague Research Institute" of Rosпотребнадзор;
SEO "Stavropol State Medical Academy"

Using polymerase chain reaction with reverse transcription (RT-PCR) rRNA tick-borne borreliosis (Lyme borreliosis) etiological agent was detected in suspensions of ticks *Ixodes ricinus*. Infection rate was 7.1 %. Morbidity increase and substantially high level of Lyme borreliosis seroprevalence in the population of this region (3.9 %) evidence that Borrelia circulate in the territory of Stavropol region and ticks *I. ricinus* are vectors and the reservoir of the disease in this area. Monitoring of ixodes ticks quantity and their examination for carriage of Lyme borreliosis etiological agent will give the opportunity to forecast the possibility of infecting people, living in enzootic territory.

Key words: *Ixodes ricinus*, *Borrelia burgdorferi*, polymerase chain reaction, enzyme-linked immunosorbent assay, tick-borne borreliosis (Lyme borreliosis).

Поступила 20.02.08.

УДК 616.986.7(471)

В.П.Топорков, Л.Н.Величко

ДИНАМИКА ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ЛЕПТОСПИРОЗАМИ В ФЕДЕРАЛЬНЫХ ОКРУГАХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

Проведенный ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости лептоспирозами с 2001 по 2006 год показал, что наибольшая заболеваемость регистрировалась в Южном, Приволжском, Центральном округах со средним ИП равным $1,7 \pm 0,3$, $1,0 \pm 0,3$, $0,8 \pm 0,4$, удельный вес от общей заболеваемости в России составил 31,5; 27,6; 25,5 % соответственно. Во всех 7 федеральных округах и в целом по стране наблюдалась тенденция к снижению заболеваемости лептоспирозами.

Ключевые слова: лептоспирозы, динамика заболеваемости, удельный вес, федеральные округа.

В Российской Федерации (РФ) с 2001 по 2006 год зарегистрировано более 7,2 тыс. случаев заболевания лептоспирозами среди населения 66 субъектов федерации. Интенсивный показатель (ИП) на

100 тыс. населения по годам колебался от 0,45 до 1,72. Наибольшая заболеваемость наблюдалась в 2004 г., ИП составлял 1,72 и превышал аналогичную величину за предыдущий год в 3,4 раза. Наименьший уро-

Динамика заболеваемости лептоспирозами в федеральных округах РФ с 2001 по 2006 год

Страна, федеральные округа РФ	Кол-во больных в абсолютных числах / интенсивный показатель на 100 тыс. населения по годам						Тенденция динамики на 100 тыс. населения
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	
Россия	1435/1,0	1180/0,8	733/0,51	2467/1,72	742/0,51	647/0,45	$y_1=1,0-0,65$
Северо-Западный	193/0,85	172/0,76	89/0,4	166/0,73	147/0,65	104/0,46	$y_1=0,78-0,5$
Центральный	421/1,12	141/0,37	97/0,26	910/2,4	121/0,3	144/0,4	$y_1=0,92-0,68$
Южный	506/2,3	428/2,0	262/1,2	613/2,8	267/1,2	199/0,92	$y_1=2,28-1,18$
Приволжский	267/0,82	382/1,2	242/0,75	754/2,3	163/0,5	182/0,56	$y_1=1,15-0,88$
Уральский	5/0,03	10/0,07	5/0,03	1/0,007	3/0,02	5/0,03	$y_1=0,05-0,03$
Сибирский	28/0,14	23/0,12	13/0,07	14/0,07	30/0,16	6/0,02	$y_1=0,13-0,06$
Дальневосточный	15/0,2	24/0,33	25/0,35	9/0,12	11/0,15	7/0,07	$y_1=0,30-0,09$

вень заболеваемости регистрировался в 2003, 2005 и 2006 гг. (ИП – 0,45, 0,51), в 2001 и 2002 гг. (ИП – 1,0 и 0,8). Определение тенденции динамики заболеваемости выявило ее снижение ($y_1=1,0-0,65$ на 100 тыс. населения). В предыдущий период с 1995 по 2000 год в РФ наблюдалось 9,5 тыс. случаев заболевания, за анализируемый период произошло снижение заболеваемости в 1,3 раза. В РФ в основном регистрируется спорадическая заболеваемость, но встречаются и групповые случаи. В 2004 г. в Павловском районе Ульяновской области во время купания в открытом водоеме заразились и одновременно заболели лептоспирозами 14 чел. [3]. В 2005 г. в Красногвардейском районе Ставропольского края зарегистрированы групповые заболевания людей лептоспирозами, заболели 42 чел. Заражение произошло в антропогенном очаге хозяйственного типа при купании, рыбной ловле в водоеме.

Лептоспирозы имеют большую социально-экономическую значимость для страны, на лечение больных с 2001 по 2006 год израсходовано более 230 млн рублей [6].

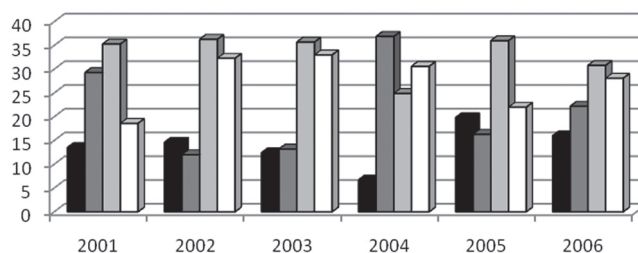
Целью исследования является анализ динамики заболеваемости лептоспирозами в федеральных округах Российской Федерации.

Для анализа использованы данные официальной статистики Минздравсоцразвития России, Противочумного центра, Федерального центра гигиены и эпидемиологии, центров гигиены и эпидемиологии, Управления Роспотребнадзора в субъектах Российской Федерации и литературные источники. Методы вариационной статистики применены для определения ИП на 100 тыс. населения, средней ошибки (m) к ним, экстенсивных показателей заболеваемости и их ошибок, тенденции динамики заболеваемости с помощью параболы I порядка [5].

За анализируемый период (2001–2006 гг.) наибольшее число больных лептоспирозами зарегистрировано в Южном округе (2275 случаев). ИП заболеваемости колебался от 1,2 до 2,8 в разные годы (таблица). Повышение заболеваемости в округе отмечалось в 2001, 2002 и 2004 гг., когда ИП равнялся 2,0–2,8, в 2003 и 2005 гг. – 1,2. Средний показатель за 6 лет в округе равный $1,7 \pm 0,3$ превышал аналогичную величину в стране в 2 раза. В то же время

за анализируемый период заболеваемость лептоспирозами в Южном округе имела тенденцию к снижению в 1,9 раза. Это вызвано прежде всего снижением уровня заболеваемости в Краснодарском крае в 2,2 раза ($y_1=7,34-3,25$ на 100 тыс. населения). С 1999 г. Ростовским научно-исследовательским институтом микробиологии и паразитологии выпускается новая концентрированная поливалентная лептоспирозная вакцина. За последние 5 лет профилактические прививки проведены в 24 субъектах РФ 500 тыс. человек из групп повышенного риска заражения, большинство доз вакцины (80 %) использовано на эндемичных по лептоспирозам территориях Южного округа. За этот период в округе иммунизировали против лептоспироза более 400 тыс. [4]. Заболевания лептоспирозами выявлялись в 9 субъектах округа из 13, на них приходится 31,5 % от заболеваемости в РФ (рисунок). Наибольшая заболеваемость наблюдалась в Краснодарском крае, среднеемноголетний ИП равнялся $5,3 \pm 1,2$, а его доля в заболеваемости округа составила 65,0 %. В Ставропольском крае и Чеченской республике среднеемноголетний ИП равнялся 2,0. Уровень заболеваемости выше генеральной совокупности среднего многолетнего общероссийского показателя в Краснодарском, Ставропольском краях, Чеченской республике.

В Приволжском федеральном округе (ПФО) с 2001 по 2006 год выявлено 1990 случаев заболевания. ИП колебался в разные годы от 0,51 до 2,3. Повышение заболеваемости в округе в 3 раза наблюдалось в 2004 г., когда ИП составил 2,3 против



Структура заболеваемости лептоспирозом в Северо-Западном, Центральном, Южном и Приволжском федеральных округах РФ с 2001 по 2006 год (в %):
 ■ – СЗФО, ■ – ЦФО, ■ – ЮФО, □ – ПФО

0,75 в 2003 г., в 2005 г. произошло снижение в 4,6 раза. В остальные годы показатели заболеваемости колебались от 0,51 до 1,2. Среднемноголетний ИП равнялся $1,0 \pm 0,3$. В округе прослеживается тенденция к снижению заболеваемости за анализируемый период в 1,3 раза. Наибольшая заболеваемость наблюдалась в Мордовии, Удмуртии, Пермском крае и Нижегородской области, среднемноголетние ИП в них составляли $12,8 \pm 6,4$, $3,0 \pm 0,7$, $1,6 \pm 0,5$, $1,4 \pm 0,6$ соответственно. За анализируемый период в ПФО произошло повышение заболеваемости в 1,2 раза по сравнению с предыдущим периодом (1995–2000 гг.). Заболеваемость лептоспирозами регистрировалась в 13 субъектах (за исключением республики Башкортостан), что составило 27,6 % от заболеваемости в РФ. Наибольшее число случаев заболевания выявлялось в республиках Мордовия (35,0 % от заболеваемости в округе), Удмуртская (14,5 %), Пермском крае (14,1 %), Нижегородской области (14,2 %). Сложная эпидемиологическая ситуация сложилась в республике Мордовия в 2002 и 2004 гг., когда показатели заболеваемости равнялись 22,2 и 38,2 на 100 тыс. насел. В предыдущий период в Мордовии зарегистрировано 207 больных, за анализируемый период заболеваемость повысилась в 3,5 раза. В Пермском крае ИП заболеваемости по двум периодам составлял 2,0 и 1,6, а в Удмуртской республике – 3,0. Уровень заболеваемости выше генеральной совокупности среднего многолетнего общероссийского показателя в Мордовии, Удмуртии, Пермском крае.

В Центральном округе за анализируемый период зарегистрировано 1834 случая заболевания лептоспирозами. ИП варьировал по годам от 0,26 до 2,4. Наибольший уровень заболеваемости зарегистрирован в 2001 и 2004 гг., когда ИП равнялся 1,12 и 2,4 соответственно, в остальные годы заболеваемость держалась на низком уровне, ИП составлял 0,26–0,43, а среднемноголетний – $0,8 \pm 0,4$. Заболеваемость в округе статистически неотличима от общероссийской. За анализируемый период имела место тенденция к снижению заболеваемости в округе в 1,3 раза. Наибольшая заболеваемость наблюдалась в Тульской, Ярославской, Рязанской, Калужской областях, где среднемноголетние ИП равнялись $6,5 \pm 4,0$, $2,4 \pm 1,6$, $2,3 \pm 1,4$, $1,9 \pm 1,2$ соответственно. Заболеваемость регистрировалась во всех 18 субъектах округа и составила 25,5 % от заболеваемости в стране. Наибольшее число больных (от числа в округе) выявлялось в Тульской (33,4 %), Ярославской (10,6 %), Рязанской (8,6 %), Калужской (6,5 %), Московской (6,0 %), Воронежской (6,4 %) областях и Москве (8,7 %). Уровень заболеваемости выше генеральной совокупности среднего многолетнего общероссийского показателя в Рязанской, Калужской, Тульской и Ярославской областях.

В Северо-Западном федеральном округе за анализируемый период зарегистрировано 872 случая лептоспирозов. Ежегодный ИП колебался от 0,4 до 0,85. Средний многолетний ИП составил

$0,64 \pm 0,09$. Заболеваемость в округе ниже общероссийской в 1,1 раза, наблюдалась тенденция к снижению заболеваемости в 1,5 раза. Заболеваемость лептоспирозами наблюдалась в 9 субъектах округа из 11 и составила 12,1 % от заболеваемости в РФ. Наибольшая заболеваемость лептоспирозами наблюдалась в Калининградской, Вологодской областях и Санкт-Петербурге, где средний ИП равнялся $3,7 \pm 1,1$, $1,5 \pm 0,35$, $1,2 \pm 0,17$ соответственно. Удельный вес больных в Санкт-Петербурге составил 40,2 % (от числа в округе), в областях: Калининградской – 24,2 %, Вологодской – 13,6 %, Архангельской – 9,5 %, Ленинградской – 6,0 %. Уровень заболеваемости выше генеральной совокупности среднего многолетнего общероссийского показателя в Калининградской области.

В Уральском федеральном округе с 2001 по 2006 год зарегистрировано 29 случаев заболевания лептоспирозами. ИП по годам колебался от 0,007 до 0,07, средний показатель равнялся $0,04 \pm 0,01$. Заболеваемость в округе ниже общероссийской в 20 раз, прослеживается тенденция к ее снижению в 1,4 раза. Большая часть больных выявлена в Челябинской области, средний ИП равнялся $0,11 \pm 0,05$. Лептоспирозы регистрировались в 4 субъектах округа из 6, что составило 0,4 % от заболеваемости в РФ, 87,5 % случаев выявлено в Челябинской области.

В Сибирском федеральном округе зарегистрировано 114 случаев лептоспирозов. Показатели заболеваемости колебались в разные годы от 0,07 до 0,16, средний ИП составил $0,1 \pm 0,02$. Заболеваемость в округе в 8,1 раза ниже общероссийской, наблюдается тенденция к снижению заболеваемости в 2 раза. Лептоспирозы регистрировались в 10 субъектах из 12, наибольшее число больных выявлено в Кемеровской области (51,9 % от числа больных в округе). На долю округа приходится 1,6 % от заболеваемости в РФ.

В Дальневосточном федеральном округе зарегистрировано 91 случай лептоспирозов, показатель заболеваемости варьировал по годам от 0,12 до 0,35 на 100 тыс. населения, а средний многолетний равнялся $0,2 \pm 0,05$. Заболеваемость ниже общероссийской в 4 раза, прослеживается тенденция к снижению в 3,2 раза. Лептоспирозы регистрировались в 3 субъектах из 9, наибольшее число больных выявлено в Хабаровском крае (72,6 % от числа больных в округе), а средний ИП в крае составил $0,8 \pm 0,2$. На долю округа приходится 1,3 % от заболеваемости в РФ.

Проведенный анализ динамики заболеваемости лептоспирозами позволил выявить общую закономерность для четырех европейских федеральных округов (СЗФО, ЦФО, ЮФО, ПФО). Независимо от уровня заболеваемости наблюдался синхронный подъем в 2004 г. после снижения в 2003 г. и последующее снижение после роста в 2005 г. Эта закономерность не прослеживалась в Уральском, Сибирском, Дальневосточном округах. Можно предположить, что во всех четырех округах действуют одни и те же

факторы, вызывающие рост и снижение заболеваемости. Это прежде всего высокая численность и инфицированность носителей возбудителя инфекции, низкая иммунная прослойка против лептоспирозов среди населения, недостаточная защита водоемов от загрязнения, несоблюдение правил личной гигиены в природных очагах и незнание населением мер профилактики против природно-очаговых инфекционных заболеваний.

К эпидемическим особенностям следует отнести разную интенсивность эпидемического процесса в субъектах Центрального, Приволжского, Южного и Северо-Западного округов. В Уральском, Сибирском и Дальневосточном округах наблюдался низкий уровень заболеваемости. Высокая заболеваемость регистрировалась в республике Мордовия со средне-многолетним ИП равным 12,8, в то же время в ней также наблюдалась тенденция к снижению заболеваемости за 6 лет с 14,09 до 11,5 на 100 тыс. населения. Средний уровень заболеваемости со среднемноголетним ИП от 2,3 до 6,5 отмечался в 6 субъектах четырех округов. В Центральном округе он наблюдался в Тульской, Рязанской, Ярославской областях, Южном – Краснодарском крае, ПФО – Удмуртии, Северо-Западном – Калининградской области. В 9 субъектах тех же федеральных округов эпидемический процесс был менее интенсивным, среднемноголетний ИП колебался от 1,2 до 2,0, в Центральном округе – 2 (Калужская, Смоленская области), ПФО – 3 (Нижегородская, Ульяновская области, Пермский край), Южном – 2 (Ставропольский край, Чеченская республика), Северо-Западном – 2 (Вологодская область, Санкт-Петербург). В остальных 50 субъектах федерации, в которых регистрировались лептоспирозы, наблюдался низкий уровень заболеваемости.

Как и при других зоонозах с природной очаговостью, при лептоспирозах достаточно выражена тенденция к урбанизации [1, 7]. По мнению Ю.В.Ананьиной [1], преобладание доли городского населения среди больных объясняется не только превышением численности горожан и более высоким уровнем клинической и лабораторной диагностики, но и объективным ростом типично «городских» этиологических форм лептоспирозов, вызванных серогруппами *LL. icterohaemorrhagiae* и *conicola*, источниками которых являются крысы и собаки. Рост заболеваемости лептоспирозами, вызванный *L. canicola*, отмечен, кроме России, и в других странах, поэтому

его относят к категории «возвращающихся» инфекций [1, 2].

Таким образом, проведенный ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости лептоспирозами с 2001 по 2006 год показал, что наибольшая заболеваемость регистрировалась в Южном, Приволжском, Центральном округах с многолетним ИП равным $1,7 \pm 0,3$, $1,0 \pm 0,3$, $0,8 \pm 0,4$, а удельный вес от общей заболеваемости в России составил 31,5, 27,6, 25,5 % соответственно. Низкая заболеваемость характерна для Уральского, Дальневосточного, Сибирского округов, где ИП равнялся $0,04 \pm 0,01$, $0,09 \pm 0,02$, $0,2 \pm 0,05$ соответственно, на их долю приходится 3,3 % от заболеваемости в РФ. Во всех 7 федеральных округах и в целом по стране наблюдалась тенденция к снижению заболеваемости лептоспирозами за анализируемый период.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ананьина Ю.В. Штутгартская болезнь – «возвращающийся» лептоспироз. В кн.: Матер. IX Моск. Междунар. ветеринар. конгресса. М.; 2001. С. 40–41.
2. Зленко А.В., Савченко С.Т., Саяпин А.Г. и др. Эпидемиологическая и эпизоотологическая роль собак в заболеваемости лептоспирозом на территории Волгоградской области. В кн.: Матер. VI Межгос. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ. Волгоград; 2005. С. 27–28.
3. Нафеев А.А. Групповая заболеваемость лептоспирозом на неэндемичной территории. Эпидемиол. и инф. бол. 2006; 2:54–5.
4. Постановление главного государственного санитарного врача Российской Федерации № 73 от 24.09.2007 «Об организации мероприятий по профилактике лептоспирозов».
5. Плохинский Н.А. Биометрия. М.: Изд-во Моск. ун-та; 1970. С. 245–247.
6. Шаханина И.Л., Осипова Л.А. Экономические потери от инфекционной заболеваемости в России: величина и тенденции. Эпидемиол. и инф. бол. 2005; 4:19–21.
7. Ющенко Г.В., Нагорнов Д.В., Сироткина Т.Т. Лептоспироз в Ярославской области. Эпидемиол. и инф. бол. 2006; 3:17–8.

V.P.Toporkov, L.N.Velichko

Dynamics of Leptospirosis Morbidity in the Federal Districts of the Russian Federation

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

A retrospective epidemiologic analysis of leptospirosis for the period from 2001 to 2006 revealed the most intensive morbidity in the Southern, Central and Volga Districts with their mean intensive indices being 1.7 ± 0.3 , 1.0 ± 0.3 , 0.8 ± 0.4 , their respective portions of the total sickness rate for Russia constituting 31.5, 27.6, 25.5 percent respectively. A tendency to decreased leptospirosis morbidity was observed in all seven federal districts and in the Russian Federation as a whole.

Key words: leptospirosis, morbidity dynamics, federal districts.

Поступила 18.08.07.

А.А.Бывалов², А.В.Чернядьев¹, И.В.Маракулин¹, К.Е.Гаврилов¹

ВЛИЯНИЕ НОСИТЕЛЬСТВА FRA-ОПЕРОНА *YERSINIA PESTIS* НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОК РЕЦИПИЕНТНОГО ШТАММА *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

¹ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны РФ», Киров; ²Институт физиологии Коми Научного Центра Уральского Отделения Российской Академии Наук, Сыктывкар

Оценена зависимость морфологических свойств микробов *Yersinia pseudotuberculosis* 164/84 от температуры культивирования и носительства fra-оперона чумного микроба. При температуре выращивания 4–6 °С бактерий двух изогенных вариантов (fra⁺ и fra⁻) штамма 164/84 отмечается меньшая, по сравнению с температурой 26–28 и 36–38 °С, скорость развития популяции. Существенные различия между микробами fra⁺- и fra⁻- вариантов проявляются лишь на поздних сроках выращивания культур при температуре 36–38 °С и заключаются в относительно больших размерах клеток капсулообразующего варианта.

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, микробная культура, fra-оперон, антиген FI, fra⁺- и fra⁻- изогенные варианты.

Капсула (или капсулоподобные образования) является одним из факторов патогенности бактерий многих таксонов, вызывающих антропонозные заболевания. К числу таких микробов относится и возбудитель чумы, способный образовывать капсулу, участвующую в проявлении антифагоцитарной, адгезивной активностей микроба в организме теплокровного хозяина [1]. Иммунохимическая активность капсулы определяется антигеном FI, продукция которого усиливается при повышении температуры культивирования чумного микроба. Капсульный антиген FI широко используется в производстве и разработке иммунопрофилактических, иммунодиагностических препаратов. В качестве штаммов – продуцентов FI-антигена в таких работах обычно используют вакцинный штамм EV чумного микроба либо рекомбинантные варианты грамотрицательных бактерий, в геном клеток которых включен fra-оперон *Yersinia pestis*. Такие варианты могут применяться при изучении механизмов патогенеза чумы, формирования специфического иммунитета, а также филогенеза *Y. pestis*. В настоящее время считается общепризнанной теория о происхождении чумного микроба от возбудителя туберкулеза. Одним из крупных эволюционных шагов этого процесса явилось приобретение клетками «прародителя» *Y. pestis* плазмиды, детерминирующей в том числе биосинтез FI-антигена и обусловившей существенный вклад в процесс перехода одной из ветвей иерсиний от сапрофитизма к паразитизму.

Ранее нами получены два изогенных варианта иерсиний, с помощью которых мы начали исследования условий экспрессии и структурно-функциональной значимости признака капсулообразования *Y. pestis* в бактериях близкородственного реципиента – *Yersinia pseudotuberculosis* [2, 3].

Целью настоящей работы являлось изучение

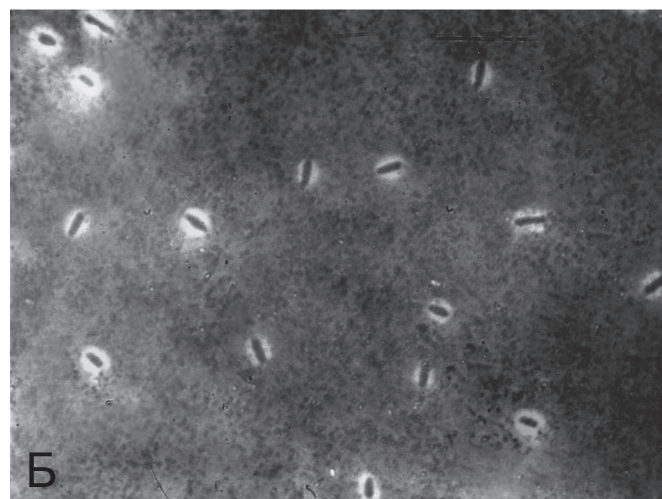
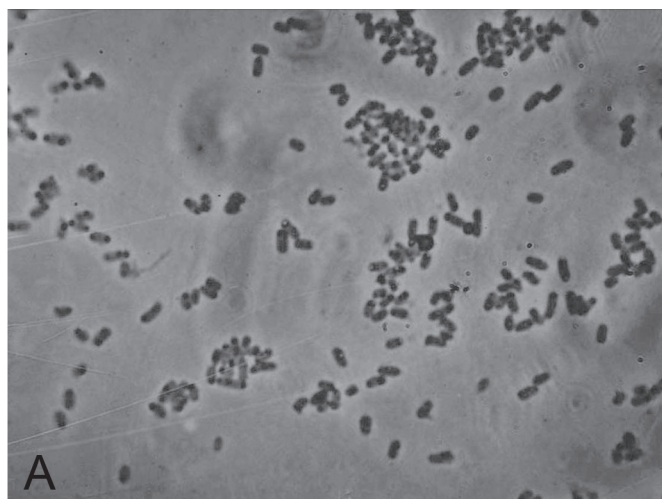
по морфометрическим показателям экспрессии fra-оперона *Y. pestis* в клетках *Y. pseudotuberculosis* при различных температурных условиях культивирования.

Материалы и методы

В работе использовали два изогенных варианта *Y. pseudotuberculosis*, полученных путем трансформации в клетки реципиентного штамма 164/84, плазмид pBR328-Fra и pBR328, различающихся лишь наличием или отсутствием fra-оперона чумного микроба и поименованных далее *Y. pseudotuberculosis* 164/84 (pBR328-Fra) и *Y. pseudotuberculosis* 164/84 (pBR328) (или fra⁺- и fra⁻- варианты) соответственно [2]. Культуры двух названных вариантов *Y. pseudotuberculosis* выращивали на агаре Хоттингера (pH 7,2) при температуре 4–6, 26–28 и 36–38 °С в течение 5 сут. Культуры для исследования смывали с поверхности среды 0,9 % раствором NaCl.

Иммунохимическую активность культур оценивали в реакции диффузионной преципитации (РДП) с антисывороткой к FI-антигену и в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с эритроцитарным чумным иммуноглобулиновым диагностикумом производства 48 ЦНИИ Минобороны России. Наличие или отсутствие капсулы у бактерий изучаемых вариантов оценивали микроскопическим методом тушевого контрастирования.

Морфологические свойства микробов анализировали при помощи циторефрактометрического метода и автоматизированной морфометрии. Циторефрактометрический метод использовали для определения относительного содержания в пробах живых и делящихся клеток. Препараты для аноптальной микроскопии готовили по известной методике [5] и анализировали с помощью микроскопа МБИ-15. Для автоматизированного измерения геометрических ха-



Микроскопия методом тушевого контрастирования бактерий *Y. pseudotuberculosis* 164/84 (pBR328) (А) и 164/84 (pBR328-Fra) (Б), выращенных при температуре 36–38 °С

рактических микробов использовали анализатор изображений «MAGISCAN 2» фирмы «JOYCE-LOEBL», Англия. Коэффициент формы эллипсоидных клеток определяли принятым методом [4].

Результаты и обсуждение

Результаты микроскопических исследований методом тушевого контрастирования показали, что вокруг бактерий 164/84 (pBR328-Fra), выращенных при температуре 26–28 °С и (в большей степени) 36–38 °С, выявляется капсула. На рисунке видно, что клетки капсулообразующего варианта (Б) окружены зоной просветления, отсутствующей у контрольного варианта 164/84 (pBR328) (А). При температуре выращивания микробов 164/84 (pBR328-Fra), равной 4–6 °С, капсула не выявлялась.

Результаты определения иммунохимической активности культур двух сравниваемых вариантов псевдотуберкулезного микроба, представленные в табл. 1, показывают, что *fra*-оперон *Y. pestis* в составе гибридной плазмиды pBR328-Fra индуцирует биосинтез FI-антигена и в клетках нового хозяина: культуры референс-варианта (*fra*-варианта) FI-антиген не продуцировали (данные не представлены). Следует отметить, что выраженность этого призна-

ка, как и в чумных бактериях, зависит от температуры выращивания биомассы клеток: максимальная продукция FI-антигена отмечена при температуре культивирования 36–38 °С, существенно меньшая при температуре 26–28 °С; при 4–6 °С РДП и РНГА не выявляли в культуре *fra*⁺-варианта FI-антиген при использованных условиях их постановки.

Интенсивное шуттелирование культуры *fra*⁺-варианта, выращенной при температуре 36–38 °С, и последующее ее центрифугирование (10000 g, 30 мин) приводило к «вымыванию» капсулообразного вещества с поверхности клеток, о чем судили по данным микроскопии (метод тушевого контрастирования) клеток до и после указанных операций, а также по результатам РДП и РНГА препаратов надосадочной жидкости и клеточных осадков, полученных после центрифугирования шуттелированной и нешуттелированной культур.

При высеве на плотную питательную среду микробы двух вариантов *Y. pseudotuberculosis* приживались и начинали активно расти, скорость роста зависела от температуры выращивания.

Наибольшая скорость роста популяции наблюдалась при температуре 26–28 °С, при которой культуры обычно уже на 2-е – 3-и сутки выходили на стационарную или близкую к ней фазу. Об этом свидетельствуют невысокое содержание делящихся клеток, их размеры и форма, а также относительная однородность культур и высокое значение отношения площади поверхности к объему микробов (табл. 2). При дальнейшем выращивании изменения в культурах продолжались в сторону снижения размеров клеток и содержания делящихся особей, а также резкого уменьшения содержания живых бактерий, что указывает на отмирание большей части популяции уже на 5-е сутки культивирования (табл. 2).

При температуре выращивания 4–6 °С все мета-

Таблица 1

Иммунохимическая активность культур *Y. pseudotuberculosis* 164/84 (pBR328-Fra), выращенных при различных температурах

Метод определения	Титр FI-антигена в культурах, выращенных при температуре ... , °С		
	4–6	26–28	36–38
РДП	Нет	1:16	1:128
РНГА	Нет	1:64	1:512

Примечание. Исследуемые культуры, выращенные в течение 5 сут, начинали титровать (с шагом 2): для РДП с концентрации 10^{11} м.к.·см⁻³, для РНГА – с 10^7 м.к.·см⁻³.

Таблица 2

Динамика морфометрических параметров бактерий *Y. pseudotuberculosis* штамма 164/84 при выращивании на плотной питательной среде, ($\bar{x} \pm J_{95}$)

Температура выращивания, °C	Вариант штамма	Время выращивания, сут	Содержание живых клеток, %	Содержание делящихся клеток, %	Длина клеток, мкм	Диаметр клеток, мкм	Коэффициент формы клеток, отн. ед.	Отношение площади к объему клеток, мкм ⁻¹
4–6	fra ⁻	1	91,5 ± 1,6	40,0 ± 3,6	3,07 ± 0,26	0,92 ± 0,05	0,91 ± 0,02	4,84 ± 0,22
		3	93,8 ± 1,3	15,1 ± 3,0	2,72 ± 0,23	0,91 ± 0,05	0,89 ± 0,02	4,95 ± 0,19
		5	96,8 ± 1,0	10,8 ± 1,9	2,34 ± 0,16	0,83 ± 0,04	0,87 ± 0,02	5,47 ± 0,18
	fra ⁺	1	93,6 ± 1,4	43,5 ± 3,9	3,25 ± 0,29	0,92 ± 0,05	0,92 ± 0,03	4,76 ± 0,25
		3	94,0 ± 1,4	19,9 ± 2,2	2,56 ± 0,25	0,91 ± 0,05	0,89 ± 0,02	4,90 ± 0,20
		5	98,5 ± 0,7	14,8 ± 2,8	2,26 ± 0,17	0,77 ± 0,03	0,88 ± 0,02	5,87 ± 0,19
26–28	fra ⁻	1	99,0 ± 0,6	11,8 ± 1,7	1,54 ± 0,11	0,82 ± 0,04	0,72 ± 0,02	5,92 ± 0,14
		3	78,0 ± 2,1	5,4 ± 1,2	1,41 ± 0,10	0,72 ± 0,04	0,74 ± 0,02	6,71 ± 0,12
		5	18,9 ± 2,0	3,0 ± 1,0	1,32 ± 0,10	0,70 ± 0,03	0,72 ± 0,01	6,95 ± 0,12
	fra ⁺	1	98,1 ± 0,7	12,4 ± 1,8	1,51 ± 0,12	0,76 ± 0,03	0,75 ± 0,02	6,29 ± 0,15
		3	62,0 ± 2,3	5,8 ± 1,3	1,52 ± 0,11	0,75 ± 0,03	0,76 ± 0,02	6,40 ± 0,11
		5	17,8 ± 1,8	3,5 ± 1,0	1,38 ± 0,10	0,69 ± 0,03	0,75 ± 0,02	6,99 ± 0,12
36–38	fra ⁻	1	90,2 ± 1,5	12,6 ± 1,7	1,63 ± 0,13	0,93 ± 0,05	0,68 ± 0,02	5,30 ± 0,16
		3	69,3 ± 2,2	10,5 ± 1,6	1,75 ± 0,13	0,99 ± 0,05	0,69 ± 0,02	4,99 ± 0,17
		5	51,8 ± 2,3	4,6 ± 1,2	1,70 ± 0,12	0,94 ± 0,04	0,69 ± 0,02	5,23 ± 0,16
	fra ⁺	1	87,8 ± 2,0	15,2 ± 3,0	1,78 ± 0,13	0,92 ± 0,04	0,73 ± 0,03	5,23 ± 0,15
		3	65,3 ± 2,3	10,8 ± 2,0	1,87 ± 0,14	0,97 ± 0,05	0,73 ± 0,02	4,99 ± 0,16
		5	56,1 ± 2,2	7,4 ± 1,6	1,96 ± 0,13	1,06 ± 0,05	0,71 ± 0,02	4,61 ± 0,17

болические процессы в популяции *Y. pseudotuberculosis*, по-видимому, протекают значительно медленнее. Низкие скорости подготовки к делению и самого деления, а также отмирания и лизиса клеток находят отражение в высоком содержании живых и делящихся микробов, больших размерах бактерий и выраженном полиморфизме культур. Даже к 5-м суткам культивирования при температуре 4–6 °C популяции далеки от стационарной фазы.

Для культур *Y. pseudotuberculosis*, выращенных при температуре 36–38 °C, уже в начальный период развития популяции отмечено значительное содержание отмирающих клеток на различных стадиях этого процесса. В таких культурах наблюдалось и много морфологически измененных микробов – раздутых, округлых, иногда шаровидных. В связи с наличием большого разнообразия форм клеток культуры выглядели очень полиморфными (хотя средние размеры клеток варьируют мало). При выращивании культуры в течение более 3 сут процессы отмирания клеток продолжали нарастать, а доля делящихся бактерий снижалась.

По морфологическим параметрам различия бактерий fra⁺- и fra⁻-вариантов штамма 164/84 псевдотуберкулезного микроба выражены слабо, существенных отличий между культурами двух вариантов, выращенными при температуре 4–6 °C и 26–28 °C, ни по одному из оцениваемых показателей не отмечено. Однако анализ динамики развития культур при температуре 36–38 °C выявил, что культуры fra⁺- и fra⁻-вариантов после 3 сут культивирования

резко расходятся по размерам клеток – их длине и диаметру (табл. 2). По другим морфологическим показателям культуры так выражено не отличались. По-видимому, такие различия между двумя вариантами микробов обусловлены относительным повышением биосинтеза и/или экскреции FI-антигена к 5-м суткам выращивания бактериями fra⁺-варианта с усилением процесса капсулообразования и соответствующим увеличением размеров клеток. Отличия в развитии штаммов подтверждаются и тем, что для fra⁺-варианта с 3-х по 5-е сутки выращивания убыль относительного содержания живых клеток составила 9,2 %, а делящихся – 3,4 %, в то время как значения указанных показателей для fra⁻-варианта составили 17,5 и 5,9 % соответственно, т.е. различались почти в 2 раза. Кроме того, только у fra⁺-варианта при температуре выращивания 36–38 °C на 5-е сутки роста отмечено снижение отношения площади поверхности клеток к их объему (табл. 2), что обычно наблюдается при стабильных условиях развития популяции.

Таким образом, установлено, что микробы рекомбинантного варианта *Y. pseudotuberculosis* 164/84, включающие fra-оперон *Y. pestis* и выращенные на плотной питательной среде при температуре 36–38 °C, образуют капсулу (капсулоподобное вещество), непрочно связанную с клеточной поверхностью. Показано также увеличение средних размеров (длины и диаметра) клеток названного варианта, в отличие от его изогенного fra⁻-варианта, на 5-е сутки культивирования при температуре 36–38 °C. При использовании иных температурных режимов выращи-

вания – 4–6 °C и 26–28 °C – значимых морфометрических различий между культурами сравниваемых вариантов не выявлено.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимов А.П. Факторы *Yersinia pestis*, обеспечивающие циркуляцию и сохранение возбудителя чумы в экосистемах природных очагов. Сообщение I. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2002; 3:3–23.
2. Бавалов А.А., Гаврилов К.Е., Крупин В.В. и др. Биологические и физико-химические свойства культур бактерий *Yersinia pseudotuberculosis*, несущих fra-оперон *Yersinia pestis*. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2008; 1:14–8.
3. Печенкин Д.В., Бывалов А.А., Маракулин И.В. Влияние капсулы *Yersinia pestis* на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов морской свинки. Пробл. особо опасных инф. 2005; 90(2):47–8.
4. Тимаков В.Д., Гольдфрахт Д.М. Основы экспериментальной медицинской бактериологии. М.: Медгиз; 1958. 347 с.
5. Фихман Б.А. Микробиологическая рефрактометрия. – М.: Медицина; 1967. 325 с.

A.A.Byvalov, A.V.Chernyadiev, I.V.Marakulin, K.E.Gavrilov

Effects of *Yersinia pestis* Fra-Operon Carriage on the Cellular Morphologic Features of the Recipient *Yersinia pseudotuberculosis* Strain

The 48th Central Scientific Research Institute of the RF Ministry of Defense, Kirov; Physiology Institute of Komi Scientific Center of the Urals Division of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar

Cellular morphologic variations of *Yersinia pseudotuberculosis* strain 164/84 were assessed depending on the cultivation temperature and the plague agent's fra-operon carriage by these cells. Notably slower population growth of the two isogenic variants of strain 164/84 (fra⁺ and fra⁻) was observed at the cultivation temperatures of 4 to 6 °C as compared with those at 26–28 °C and 36–38 °C. Only late growth stages at the temperatures of 36 to 38 °C brought about significant differences between the fra⁺ and fra⁻ cell variants expressed in the occurrence of relatively bigger cells in the population of the capsule forming *Y. pseudotuberculosis* variant.

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, microbial culture, fra-operon, F1-antigen, fra⁺- and fra⁻-isogenic variants.

Поступила 07.12.07.

УДК 616.981.452+616-002.71

Н.А.Видяева, А.В.Гаева, Л.М.Куклева, Г.Н.Одинокоев, В.В.Кутырев

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИОКИСЛИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS* РАЗЛИЧНЫХ ПОДВИДОВ И *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

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

Проведено сравнительное электрофоретическое изучение антиокислительных ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза и пероксидаза) у штаммов *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium*. Показано, что антиокислительные ферменты иерсиний по электрофоретической подвижности отличаются от ферментов *E. coli* и *S. typhimurium*. Их экспрессия зависит от температуры культивирования и плазмидного состава. Выявлены особенности экспрессии каталазы-пероксидазы у штаммов возбудителя чумы улэгейского подвида, у штаммов возбудителя псевдотуберкулеза VI серовара и штаммов, выделенных от людей.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, антиокислительные ферменты, супероксиддисмутаза, каталаза, пероксидаза.

Возбудитель чумы, *Yersinia pestis*, в отличие от своего предшественника возбудителя псевдотуберкулеза, *Yersinia pseudotuberculosis*, является факультативным внутриклеточным паразитом. Попадая в фагоцит, чумной микроб подвергается антимикробному действию факторов защиты фагоцитирующей клетки, проявлением одного из которых является «окислительный взрыв». При этом в фагоците образуются активные формы кислорода: супероксиданион, гидроперекиси, гидроксильный радикал, действие которых направлено на повреждение жирных кислот, белков, ДНК [9, 17, 20]. Патогенные микроорганизмы выработали ряд механизмов, направленных на защиту клетки от окислительного повреждения, среди которых важная роль принадлежит антиокислительным ферментам (АО) – супероксиддисмутазе (СОД) и гидропероксидазам (каталазе и пероксидазе) [5]. У целого ряда патогенных бактерий обнаружена корреляция между активностью АО ферментов, устойчивостью к фагоцитозу и вирулентностью [6, 18].

У возбудителя чумы выявлены и охарактеризованы супероксиддисмутаза, каталаза и пероксидаза [1, 2, 15, 19, 21]. Установлено, что супероксиддис-

мутазная и каталазная активности являются термоиндуцибельными признаками [2, 4, 19, 21] и активность супероксиддисмутазы не связана с носительством собственных плазмид. В 1993 г. R.J.Mehigh и R.R.Brubaker [21] идентифицировали белок с молекулярной массой ~70 кД (p70), как каталазу, но не пероксидазу и супероксиддисмутазу. Этот белок экспрессировался в Ca²⁺-дефицитной среде только при 37 °C, и его каталазная активность составляла менее 10 % от общей каталазной активности в клеточных экстрактах. Они также определили, что белок p70 является одним из термоиндуцибельных антигенов возбудителя чумы, названного антиген 5 или E, так как этот белок перекрестно реагировал с антителами, полученными к антигену 5. M.Rockenmacher [23] обнаружил корреляцию между высокой каталазной активностью и вирулентностью *Y. pestis*, по мнению других авторов такой корреляции не наблюдается. Кроме того, было выявлено, что активность каталазы, и пероксидазы возбудителя чумы и псевдотуберкулеза несколько различались между собой [1, 10].

На территории бывшего СССР и Монголии, помимо основного подвида возбудителя чумы, цир-

кулируют штаммы четырех неосновных подвигов (кавказского, гиссарского, алтайского и улэгейского). Эти штаммы имеют избирательную вирулентность (вирулентны для белых мышей и авирулентны для морских свинок) и обладают как свойствами, объединяющими основную и неосновные подвиды, так и общими для неосновных подвигов и возбудителя псевдотуберкулеза. Неосновные подвиды в настоящее время рассматриваются как наиболее древние формы возбудителя чумы [3]. Возможно, что избирательная вирулентность неосновных подвигов обусловлена либо изменением, либо активности АО ферментов, либо их изоформ.

В связи с этим цель нашей работы: дать сравнительную электрофоретическую характеристику антиокислительных ферментов иерсиний, *Escherichia coli* и *Salmonella typhimurium*; определить влияние различного сочетания собственных плазмид и температуры культивирования иерсиний на экспрессию антиокислительных ферментов; провести сравнительный электрофоретический анализ АО ферментов штаммов *Y. pestis* биоваров *antiqua*, *medievalis* и *orientalis* и пяти подвигов (основной, алтайский, кавказский, гиссарский, улэгейский), циркулирующих на территории России и ближнего зарубежья, а также штаммов *Y. pseudotuberculosis*.

Материал и методы

Для сравнительного изучения влияния температуры и плазмид на экспрессию антиокислительных ферментов у бактерий использовались производные вакцинного штамма *Y. pestis* EV с различным сочетанием плазмид pFra, pCad и pPst, *Y. pseudotuberculosis* 85 (pCad⁺) и его изогенный бесплазмидный клон, а также *Escherichia coli* K12 и *Salmonella typhimurium* LT2. Для исследования изоферментного спектра антиокислительных ферментов у иерсиний различного происхождения выбрано по два штамма возбудителя чумы биоваров *medievalis* (212 и 162) и *orientalis* (243 и 195 P⁻), один штамм биовара *antiqua* (172), по одному штамму основного (231) и кавказского (1146) подвигов, по два штамма алтайского (И-2998 и 2359) и гиссарского (А-1724 и А-1728) подвигов, три штамма улэгейского подвида (И-3131, И-3068 и И-3069), по одному штамму *Y. pseudotuberculosis* I-IV сероваров и по два штамма возбудителя псевдотуберкулеза, выделенных от грызунов (417, 2600) и людей, больных дальневосточной скарлатиноподобной лихорадкой (312, 50-73).

Культуры иерсиний выращивали в бульоне Хоттингера (рН 7,2) с добавлением 20 мМ Mg²⁺ в течение 6 ч при 28 °С и в течение 18 ч – при 37 °С (для экспрессии Ca²⁺-зависимых белков), либо 24 ч – при 28 °С, а *E. coli* и *S. typhimurium* – при 37 °С в течение 24 ч. Для штаммов возбудителя чумы пяти подвигов и штаммов возбудителя псевдотуберкулеза использовали условия культивирования, при которых проявляется только одна из изоформ фермента: бульон

LB (без добавления магния) и температура культивирования 28 °С. Клетки собирали центрифугированием, отмывали дважды физраствором и разрушали ультразвуком. Неразрушенные клетки и осколки мембран осаждали центрифугированием (4000 g, 20 мин), цитоплазму отбирали, концентрировали замораживанием-оттаиванием, доводили концентрацию белка до 1 мг/мл и анализировали методом электрофореза в неденатурирующих условиях по В.Д.Дэвис [12] с последующей обработкой электрофореграмм для специфического проявления супероксиддисмутазы [7], каталазы [16] и пероксидазы [22]. Определение активности ферментов проводили спектрофотометрически: СОД по [8], каталазы по [25], пероксидазы по [11].

Результаты и обсуждение

Изучение изоферментного спектра антиокислительных ферментов бесплазмидного штамма и штаммов с различным сочетанием плазмид чумного микроба показало, что все три фермента (СОД, каталаза и пероксидаза) продуцируются как у плазмидсодержащих, так и у бесплазмидных штаммов *Y. pestis* (рис. 1).

Выявленные на энзимограммах СОД каталаза и пероксидаза отличались по своей электрофоретической подвижности от соответствующих антиокислительных ферментов *E. coli* и *S. typhimurium*. СОД *Y. pestis* представлена двумя изоформами СОД-1 и СОД-2. Обе они отличались от известных форм СОД (Mn-СОД и Fe-СОД) *E. coli*, но по электрофоретической подвижности СОД-1 чумного микроба близка к Mn-СОД, а СОД-2 – к Fe-СОД *E. coli*.

Анализ энзимограмм СОД, производных штамма *Y. pestis* EV с различным сочетанием собственных плазмид, выращенных при 28 и 37 °С показал,

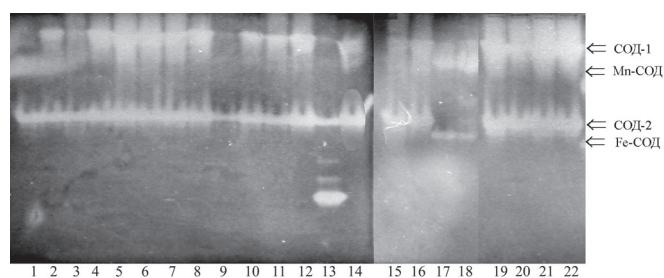


Рис. 1. Изоферментный спектр супероксиддисмутазы штаммов *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *E. coli* K-12 и *S. typhimurium* LT2:

- 1 – *Y. pestis* EV (pCad⁺ pPst⁺ pFra⁺), 37 °С; 2 – *Y. pestis* EV, 28 °С;
- 3 – *Y. pestis* KM 217 (pCad⁺ pPst⁺ pFra⁺), 37 °С; 4 – *Y. pestis* 217, 28 °С;
- 5 – *Y. pestis* KM 218 (pCad⁺ pPst⁺ pFra⁺), 37 °С; 6 – *Y. pestis* KM 218, 28 °С;
- 7 – *Y. pestis* KM 216 (pCad⁺ pPst⁺ pFra⁺), 37 °С; 8 – *Y. pestis* KM 216, 28 °С;
- 9 – *Y. pestis* KM 215 (pCad⁺ pPst⁺ pFra⁺), 37 °С; 10 – *Y. pestis* KM 215, 28 °С;
- 11 – *Y. pestis* KM 225 (pCad⁺ pPst⁺ pFra⁺), 37 °С; 12 – *Y. pestis* KM 225, 28 °С;
- 13 – *Y. pestis* KM 226 (pCad⁺ pPst⁺ pFra⁺), 37 °С;
- 14 – *Y. pestis* KM 226, 28 °С; 15 – *Y. pestis* KM 227 (pCad⁺ pPst⁺ pFra⁺), 37 °С;
- 16 – *Y. pestis* KM 227, 28 °С; 17 – *E. coli* K-12; 18 – *S. typhimurium* LT2;
- 19 – *Y. pseudotuberculosis* 85 (pCad⁺), 37 °С; 20 – *Y. pseudotuberculosis* 85, 28 °С;
- 21 – *Y. pseudotuberculosis* 85/21 (pCad⁺), 37 °С;
- 22 – *Y. pseudotuberculosis* 85/21, 28 °С

что плазмида pCad и температура инкубации влияют на изоферментный спектр АО ферментов чумного микроба: при 37 °С культивирования интенсивность окраски СОД-1 значительно снижена у штаммов, содержащих pCad (EV – pCad⁺ pPst⁺ pFra⁺, КМ 217 – pCad⁺, КМ 215 – pCad⁺ pPst⁺), а у *Y. pestis* КМ 226 (pCad⁺ pFra⁺) при 37 °С появились еще три быстродвижущиеся полосы. Однако спектрофотометрическое изучение активности СОД не выявило значительных различий в активности этого фермента в зависимости от плазмидного состава, то есть активность СОД штамма КМ 226, выращенного и при 28, и 37 °С была одинаковой.

Специфическая окраска полиакриламидных гелей, содержащих белки цитоплазмы, на пероксидазу позволила выявить в штаммах *Y. pestis* две полосы, которые отличались от пероксидаз *E. coli* и *S. typhimurium*.

Применяемый нами метод выявления каталазы не позволил обнаружить этот фермент у штаммов *E. coli* и *S. typhimurium*, в то время как у штаммов чумного микроба он проявлялся на уровне пероксидазы с более высокой электрофоретической подвижностью. По-видимому, выявляемый фермент является каталазой, обладающей пероксидазной активностью (каталаза-пероксидаза).

Анализ энзимогамм каталазы и пероксидазы производных штамма *Y. pestis* EV с различным сочетанием собственных плазмид, выращенных при 28 и 37 °С, показал, что плазмида pCad и температура инкубации влияют на изоферментный спектр АО ферментов чумного микроба: при 37 °С культивирования у штаммов pPst⁺, pCad⁺, pPst⁺ pCad⁺ pFra⁺, pPst⁺ pCad⁺ отсутствовала полоса с более высокой электрофоретической подвижностью и соответствующая ей полоса на энзимогамме каталазы. Эти данные полностью коррелировали с результатами спектрофотометрического определения активности пероксидазы и каталазы.

Специфическое выявление ферментов на электрофореграммах в настоящее время широко применяется в методе мультилокусного энзимотипирования различных видов бактерий [24]. С этой целью подбираются условия культивирования, при которых проявляется одна из изоформ данного фермента. Поэтому для изучения экспрессии антиокислительных ферментов у штаммов возбудителя чумы различного происхождения и у псевдотуберкулезного микробов клетки выращивали при 28 °С в бульоне LB в течение 18 ч. При данных условиях культивирования специфическая окраска гелей на АО ферменты позволила установить, что все изученные штаммы возбудителя чумы и псевдотуберкулеза экспрессируют только одну форму супероксиддисмутазы с одинаковой электрофоретической подвижностью у всех изученных штаммов. Судя по интенсивности негативных пятен на геле, которые формируются на фиолетовом фоне в процессе специфической окраски на супероксиддисмутазу, ее активность у всех штам-

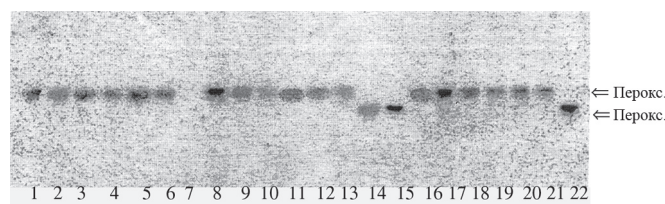


Рис. 2. Энзимогамма пероксидазы штаммов *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis*

1–12 – *Y. pestis*: 1 – 231, 2 – 1146, 3 – И 2998, 4 – 2359, 5 – А 1728, 6 – А 1724, 7 – И 3131, 8 – 172, 9 – 162, 10 – 212, 11 – 195Р, 12 – 243; 13–22 – *Y. pseudotuberculosis*: 13 – 2600, 14 – 50–73, 15 – 312, 16 – 417, 17 – I, 18 – II, 19 – III, 20 – IV, 21 – V, 22 – VI

мов была одинакова. Окраска гелей на пероксидазу и каталазу также выявила только одну изоформу этих ферментов. Сопоставление энзимогамм этих ферментов показывает, что при данных условиях культивирования экспрессируется только фермент, обладающий двумя активностями, а именно пероксидаза-каталаза (рис. 2).

Он продуцируется всеми изученными штаммами, кроме улегейского, у которого его экспрессия отсутствует или значительно снижена. В настоящем исследовании показано, что улегейский подвида, как и ожидалось, обладает повышенной чувствительностью к окислительному стрессу, что может быть следствием пониженной активности каталазы-пероксидазы у этого подвида. У возбудителя псевдотуберкулеза каталаза-пероксидаза имела ту же электрофоретическую подвижность, что и у *Y. pestis*. Исключение составляют штаммы *Y. pseudotuberculosis*, выделенные от людей, и штамм VI серовара, у которых этот фермент имеет более высокую подвижность, чем у остальных изученных штаммов.

Таким образом, в результате проведенных исследований было обнаружено, что АО ферменты чумного микроба отличаются по электрофоретической подвижности от АО ферментов *E. coli* и *S. typhimurium*; изоферментный спектр АО ферментов зависит от температуры культивирования и плазмидного состава; штаммы *Y. pestis* улегейского подвида обладают сниженной активностью пероксидазы, а у штаммов *Y. pseudotuberculosis* VI серовара и штаммов, выделенных от людей, пероксидаза имеет более высокую электрофоретическую подвижность.

Работа поддержана грантами РФФИ: 07-04-00100а, 08-0400731а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Джанапидзе М.Н. Каталазная и пероксидазная активность чумного и псевдотуберкулезного микробов [дис. ... канд. мед. наук]. 1953. 205 с.
2. Куликов О.А., Дробков В.И., Дармов И.В. и др. Супероксиддисмутазы чумного микроба. Вестн. Рос. АМН. 1996; 6:45–9.
3. Куклева Л.М., Проценко О.А., Кутырев В.В. Современные представления о родстве возбудителей чумы и псевдотуберкулеза. Мол. генет. микробиол. и вирусол. 2002; 1:3–7.
4. Шиманюк Н.Я., Асеева А.Е., Мишанькин Б.Н. Супероксиддисмутазная активность у иерсиний. В кн.: Иерсиниозы: микробиол., эпидемиол., клиника, патогенез, иммунол. Владивосток; 1968. С. 83–84.

5. Babor B. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *New Engl. J. Med.* 1978; 289:659–68.
6. Beaman B., Black C., Doughty F., et al. Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia asteroides*: importance in resistance to microbicidal activities of human polymorphonuclear neutrophils. *Infect. Immun.* 1985; 47:135–41.
7. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1971; 44:276–87.
8. Beyer W., Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Anal. Biochem.* 1987; 161:559–66.
9. Brot N., Weissbach L., Werth J., et al. Enzymatic reduction of protein-bound methionine sulfoxide. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981; 78:2155–58.
10. Burrows T., Farrel J., Gillett W. The catalase activity of *Pasteurella pestis* and other bacteria. *Br. J. Exp. Pathol.* 1964; 45:579–88.
11. Cohen H. The use of diaminobenzidine for spectrophotometric and acrylamide gel detection of sulfite oxidase and its applicability to hydrogen peroxide-generating enzymes. *Anal. Biochem.* 1973; 53:208–22.
12. Davis B. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1964; 121:404–27.
13. Fridovich I. Oxygen radicals, hydrogen, peroxide and oxygen toxicity. In: W.A.Prior, editor. *Free radicals in biology*. New York: Academic Press; 1976. p. 239–277.
14. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science.* 1978; 201:875–80.
15. Garcia E., Nedialkov Y., Elliott J., et al. Molecular characterization of KatY (Antigen 5), a thermoregulated chromosomally encoded catalase-peroxidase of *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 1999; 181(10):3114–22.
16. Gregory E., Fridovich I. Visualization of catalase in acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1974; 58:57–62.
17. Hollstein M., Brooks P., Linn S., et al. Hydroxymethyluracil DNA glycosylase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984; 81:4003–7.
18. Mandell G. Catalase, superoxide dismutase and virulence in *Staphylococcus aureus*: *in vitro* and *in vivo* studies with emphasis on staphylococcal-leukocyte interaction. *J. Clin. Invest.* 1975; 55:561–66.
19. Marcheva D., Nicolova S., Veljanov D. О распространении каталазной активности у бактерий рода *Yersinia*. Докл. Болг. АН. 1988; 41(3):57–60.
20. Mead J. Free radical mechanism of lipid damage and consequences for cellular membranes. In: W.A.Prior, editor. *Free radicals in biology*. New York: Academic Press; 1976. P. 51–68.
21. Mehlig R., Brubaker R. Major stable peptides of *Yersinia pestis* synthesized during the low-calcium response. *Infect. Immun.* 1993; 61(1):13–22.
22. Raymond S. Acrylamide gel electrophoresis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1964; 121:350–65.
23. Rockenmacher M. Relationship of catalase activity to virulence in *Pasteurella pestis*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1949; 71:99–101.
24. Selander R., Caugant D., Ochman H., et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 1986; 51:873–84.
25. Vassilyadi M., Archibald F. Catalase, superoxide dismutase and production of O₂-sensitive mutants of *Bacillus coagulans*. *Can. J. Microbiol.* 1985; 31:994–99.

N.A.Vidyayeva, A.V.Gaeva, L.M.Koukleva, G.N.Odinokov, V.V.Kutyrev

Comparative Characteristics of Antioxidative Enzymes of *Yersinia pestis* Strains of Different Subspecies and *Yersinia pseudotuberculosis* Strains

Russian Anti-Plague Research Institute "Micrbe", Saratov

Comparative electrophoretic investigation was carried out to study antioxidative enzymes (superoxide dismutase, catalase and peroxidase) in strains of *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. It was shown that *Yersinia* antioxidative enzymes are different from *E. coli* and *S. typhimurium* enzymes in electrophoretic motility. Their expression depends on cultivation temperature and plasmid content. Peculiarities of catalase-peroxidase expression were determined in strains of plague etiological agent of Uleji subspecies, in strains of pseudotuberculosis etiological agent of IV serovar and in strains isolated from humans.

Key words: *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, antioxidative enzymes, superoxide dismutase, catalase, peroxidase.

Поступила 12.03.08.

УДК 576.851.132:616.982.27-033

Е.В.Калинкина, Н.П.Агеева, О.А.Меринова, Д.А.Лобойко, Д.В.Викторов, Л.К.Меринова

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МУТАНТОВ ПАТОГЕННЫХ *BURKHOLDERIA*, РЕЗИСТЕНТНЫХ К ФТОРХИНОЛОМ И ЦЕФАЛОСПОРИНАМ

ФГУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт»

Исследованы фенотипические свойства мутантов филогенетически родственных патогенных видов *Burkholderia* (*B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. cepacia*), резистентных к фторхинолонам и цефалоспорином. Показано, что штаммы с маркерами Pfx^R (Ofx^R), Cfz^R приобретают перекрестную устойчивость множественного типа к антибиотикам различных классов. Резистентность штаммов изменяется под действием от блокирующего влияния ингибитора кальциевых мембранных каналов – верапамила. Мутантные штаммы отличаются по продукции внеклеточных ферментов (протеаз, лецитиназы, липазы) и вирулентностью.

Ключевые слова: *Burkholderia*, антибиотикорезистентность, мутанты, фторхинолоны, цефалоспорины, фенотипические свойства, верапамил.

Возбудители мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) и сапа (*Burkholderia mallei*), а также являющиеся оппортунистическими патогенами микроорганизмы комплекса *Burkholderia cepacia* составляют группу филогенетически родственных видов [3, 8].

Наряду с общностью и клинической значимостью, эти микроорганизмы характеризуются высокой природной резистентностью к антибактериальным

препаратам, включающим широкий спектр антибиотиков различных классов [1, 2].

Способность всех трех видов быстро повышать антибиотикорезистентность в процессе лечения ограничивает выбор эффективных лекарственных средств и создает серьезные трудности при химиотерапии заболеваний, вызываемых буркхольдериями [2, 5, 7].

Экспериментальной моделью для изучения механизмов лекарственной устойчивости этих видов могут служить штаммы с измененной чувствительностью к антибиотикам, которые в настоящее время используются для лечения. Обычно мутанты с направленно селекционированными маркерами устойчивости (или чувствительности) к определенным ингибиторам несут ряд дополнительных признаков, изучение которых позволяет определять основные закономерности развития резистентности и осуществлять выбор штаммов, необходимых для исследования ее молекулярно-генетической природы.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании фенотипов мутантных штаммов родственных видов *Burkholderia* (*B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. cepacia*) с измененной чувствительностью к препаратам ряда цефалоспоринов и фторхинолонов и в оценке влияния на резистентность блокатора кальциевых мембранных каналов – верапамила.

Материалы и методы

В работе использованы штаммы *B. pseudomallei* 56770 и 57576, *B. mallei* Ц-5н, *B. cepacia* 25416, 8235 дикого типа и их мутанты, отобранные в результате направленной селекции клонов, резистентных к фторхинолонам (пемфлоксацину, офлоксацину) и цефалоспорином (цефтазидиму). Минимальные подавляющие концентрации пемфлоксацина («LEK Pharmaceutical», Словения), офлоксацина («Хехст Мэрион Руссель Лтд.», Индия), цефтазидима («Glaxooperations», Англия) и других антибиотиков отечественного производства определяли методом стандартных серийных разведений на плотных питательных средах.

Культуры выращивали на L-агаре и L-бульоне («Difco», США) при температуре 32 °С. Продукцию внеклеточных ферментов (протеаз, лецитиназы, липазы) исследовали на средах с добавками необходимых субстратов [4].

Для оценки влияния на резистентность штаммов блокатора кальциевых мембранных каналов культуры ($1 \cdot 10^2$ м.к.) высевали на плотные питательные среды с добавками антибиотиков и верапамила – 25 мкг/мл, или не содержащие его [6, 7]. Штаммы инкубировали 48 ч, после чего учитывали количество жизнеспособных клеток.

Определение вирулентных свойств проводили на модели одноклеточного организма *Paramecium caudatum*. Инфузории выращивали в сенном настое в течение недели. Взвеси 18-часовых культур микроорганизмов в концентрации $1 \cdot 10^7$ м.к./мл соединяли в равных объемах (500 мкл) с культурой парамеций на предметном стекле с лункой. Взвесь изолировали с помощью покровного стекла, фиксированного вазелиновым маслом. Время гибели простейших наблюдали при световой микроскопии препаратов, начиная от контакта с культурами бактерий до полного прекращения подвижности инфузорий. Вирулентность

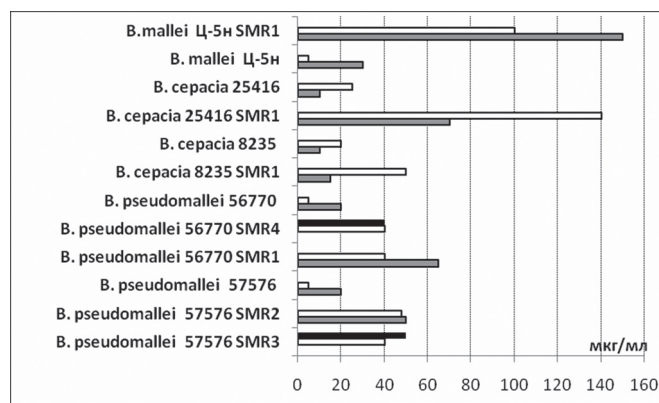


Рис. 1. Показатели антибиотикорезистентности SMR-мутантов *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. cepacia*:

■ – пемфлоксацин; ■ – офлоксацин; □ – цефтазидим

характеризовали по времени гибели 100 % клеток простейших.

Результаты и обсуждение

Мутантные штаммы *Burkholderia*, использованные в работе и обозначенные как штаммы SMR-типа, имели два селектированных маркера резистентности Pfx^R (Ofx^R), Cfz^R в различной последовательности и отличались устойчивостью к пемфлоксацину (офлоксацину) и цефтазидиму, превышающей уровень ее у исходных штаммов в 3–5 раз и более, в зависимости от типа резистентности и вида микроорганизма (рис. 1).

Было отмечено, что у *B. cepacia* быстрее, чем у двух других видов, формировалась устойчивость к цефтазидиму, которая сохранялась на высоком уровне, тогда как у *B. pseudomallei* и *B. mallei* наиболее стабильно проявлялся фенотип резистентности к фторхинолонам.

Определение у мутантов, резистентных к пемфлоксацину, офлоксацину и цефтазидиму перекрестной устойчивости показало, что все SMR-штаммы *B. cepacia* приобретали дополнительную устойчивость к трем препаратам с различным механизмом действия (ампициллину, хлорамфениколу, тетрациклину), но практически не изменяли резистентности к антибиотикам ряда аминогликозидов. Что касается перекрестной резистентности SMR-мутантов возбудителя мелиоидоза, то у них происходило некоторое варьирование ее в зависимости от исходного штамма и первоначального маркера, однако во всех случаях наблюдалось заметное повышение устойчивости, прежде всего к хлорамфениколу и ампициллину и в меньшей степени к тетрациклину и препаратам ряда аминогликозидов. Подобным образом формировалась перекрестная устойчивость и у мутантных штаммов *B. mallei*.

Мутанты *Burkholderia*, устойчивые к фторхинолонам и цефалоспорином, обнаружившие при этом множественный характер резистентности, исследовали далее на способность к продукции некоторых внеклеточных ферментов (лецитиназы, протеазы,

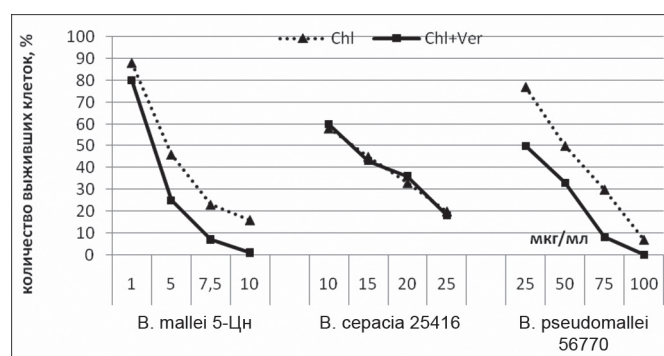


Рис. 2. Динамика изменения резистентности диких штаммов *Burkholderia* к хлорамфениколу под влиянием верапамила

липазы), используя ее как тест для косвенной оценки возможных изменений в проницаемости клеточной стенки микроорганизмов, имеющей отношение к формированию резистентности. С этой же целью определяли влияние на уровень устойчивости штаммов верапамила – блокатора кальциевых мембранных каналов [6, 7].

Изучение активности внеклеточных ферментов показало, что штаммы *B. cepacia* и *B. pseudomallei* с маркерами Pfx^R (Ofx^R) и Cfx^R отличались от исходных, прежде всего повышенной способностью к гидролизу протеинов молока, которая у *B. cepacia* 8235 SMR1 (Pfx^R Cfx^R) и 8235 SMR2 (Cfx^R Pfx^R) сопровождалась потерей твин-эстеразной активности. Исключением являлись мутанты *B. pseudomallei* 56770 SMR4 (Ofx^R Cfx^R); у них практически отсутствовала протеазная активность, и были существенно снижены функции как твин-эстеразы, так и лецитиназы.

Влияние верапамила оценивали по изменению устойчивости штаммов *Burkholderia* к ряду препаратов, включая препараты, использованные при получении мутантов. При этом наблюдали сходную, вне зависимости от выбранного антибиотика, динамику изменений (приводятся данные по определению устойчивости к одному из них – хлорамфениколу).

Как показано на рис. 2, верапамил в наименьшей степени оказывал воздействие на исследованный тип резистентности дикого штамма *B. cepacia* 25416. Кривые ингибирования роста клеток этим антибиотиком как без, так и в присутствии блокатора находились достаточно близко, так что расхождение в количестве колоний составляло менее 5 процентов. В отличие от этого, у диких штаммов *B. pseudomallei* 56770 и *B. mallei* Ц-5н в присутствии верапамила наблюдалось отчетливое снижение устойчивости, проявляющееся в уменьшении числа жизнеспособных клеток на 20–40 %.

Что касается полирезистентных штаммов *B. cepacia* и *B. pseudomallei*, то показатели их выживаемости при наличии в среде хлорамфеникола вместе с верапамилем могли как повышаться, так и понижаться (рис. 3). В частности, установлено, что на среде с верапамилем штаммы *B. cepacia* 25416 SMR1 и SMR116 снижают резистентность к хлорамфениколу,

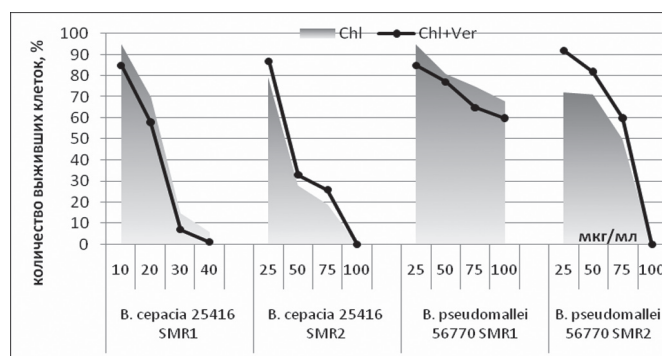


Рис. 3. Показатели резистентности SMR-мутантов *Burkholderia* в присутствии верапамила: SMR1 – Pfx^RCfx^R; SMR2 – Cfx^RPfx^R

тогда как штаммы 25416 SMR2 и SMR111 отчетливо повышают ее.

Сходная картина динамики выживаемости в присутствии блокирующего агента наблюдалась и у резистентных штаммов *B. pseudomallei*, а именно, некоторые из них на среде с верапамилем проявляли повышенную устойчивость, тогда как выживаемость других при его воздействии имела явную тенденцию к снижению. В отличие от них, резистентные штаммы *B. mallei* в присутствии верапамила, как правило, демонстрировали лишь снижение устойчивости.

Известно, что штаммы бактерий с повышенной резистентностью нередко характеризуются изменением (чаще снижением) вирулентных свойств. Для характеристики этого признака у полученной группы мутантов мы использовали модель одноклеточного организма *Paramecium caudatum*, позволявшую быстро тестировать множество клонов. При этом установили, что среди полирезистентных штаммов всех трех видов *Burkholderia* есть штаммы как снизившие вирулентность по сравнению с диким типом, так и штаммы, сохранившие ее на исходном уровне или несколько отличающиеся от него.

Данные по предварительной оценке вирулентности на инфузориях были подтверждены результатами определения фитопатогенности у *B. cepacia* и коррелировали с показателями вирулентности резистентных штаммов *B. pseudomallei* для белых мышей.

Таким образом, изучение фенотипов SMR-мутантов *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. cepacia* с маркерами устойчивости к фторхинолонам и цефалоспорином показало, что их резистентность носит множественный характер. Возможно, что в развитии ее принимают участие белки наружной мембраны, в частности, протеины кальциевых мембранных каналов, которые, не являясь строго специфичными для транспорта антибиотиков, тем не менее оказывают влияние на динамические процессы снижения мембранной проницаемости или увеличения транспорта ингибитора вовне.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Пушкарева В.И., Величко В.В., Каминская А.А. *Burkholderia cepacia* в разных экологических условиях: числен-

ность и изменчивость бактериальной популяции. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005; 3:39–44.

2. Шагинян И.А., Чернуха М.Ю. Бактерии комплекса *Burkholderia cepacia*: особенности диагностики, организации генома и метаболизма. Мол. генет., микробиол., вирусол. 2003; 2:7–11.

3. Coenye T., Vandamme P. Environ. Microbiol. 2003; 5:719–29.

4. Difco manual. Dehydrated culture media and reagents for microbiology. Detroit Michigan; 1985. 1155 p.

5. Gibson R.L., Burns J.L., Ramsey B.W. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2003; 168:918–51.

6. Moore R.A., DeShazer D., Reckseidler S. Antimicrob. Agents Chemother. 1999; 43:465–70.

7. Moore R.A., Woods D.E. In: International Congress on Melioidosis Proceeding. Bangkok; 1998. p. 157.

8. Yabuuchi E., Kosako Y., Oyaizu H., et al. Microbiol. Immunol. 1992; 36:1251–75.

E.V.Kalinkina, N.P.Ageeva, O.A.Merinova, D.A.Loboiko,
D.V.Viktorov, L.K.Merinova

Phenotypic Peculiarities of Pathogenic *Burkholderia* Mutants Resistant to Fluoroquinolones and Cephalosporins

Volgograd Anti-Plague Research Institute

Examined were phenotypic peculiarities of mutants of *Burkholderia* phylogenetically-related pathogenic species (*B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. cepacia*) resistant to fluoroquinolones and cephalosporins. It was shown that strains with Pfx^R (Ofx^R), Cfx^R markers acquire high multi-drug resistance to antibiotics of different classes. Strain resistance changes under blocking influence of verapamil – inhibitor of calcium membrane channels. Mutant strains differ in production of extracellular enzymes (proteases, lecithinase, lipase) and virulence.

Key words: *Burkholderia*, drug resistance, mutants, fluoroquinolones, cephalosporins, phenotypic peculiarities, verapamil.

Поступила 21.03.08.

УДК 616.981.452:576.809.33

Т.Н.Щуковская, С.Н.Клюева, А.Л.Кравцов, О.А.Волох, Ю.А.Алешина, В.В.Кутырев

ВЛИЯНИЕ БИОГЕННОГО АМИНА СЕРТОНИНА НА РОСТ И ПРОФИЛЬ БЕЛКОВ ЧУМНОГО МИКРОБА В УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ПЛОТНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

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

Получены новые сведения о стимулирующем влиянии биогенного амина серотонина на рост чумного микроба. С применением серотонина разработан способ выделения *Yersinia pestis* бактериологическим методом из исследуемого материала, контаминированного сопутствующей микрофлорой, включая объекты внешней среды, позволяющий сократить до 24 часов сроки биологического накопления возбудителя чумы и увеличить число колониеобразующих единиц (КОЕ) чумного микроба. Выявлен ингибирующий эффект серотонина на синтез полипептида с молекулярной массой 22 кДа в условиях культивирования на агаре Хоттингера (рН 7,2) при 28 °С в течение 24 ч.

Ключевые слова: *Y. pestis*, серотонин, объекты внешней среды, рост, электрофоретический профиль белков.

В настоящее время интенсивно ведутся исследования, направленные на изучение триггерных молекулярных механизмов взаимодействия патогена с организмом хозяина, в том числе возможности использования микроорганизмами для ускорения собственного развития эндогенных биологически активных веществ (нейрогормонов) макроорганизма. Формируется новое междисциплинарное направление – микробная эндокринология, изучающая фундаментальные и прикладные аспекты нейроэндокринной регуляции взаимодействия про- и эукариот [12].

Установлено, что бактерии имеют фрагменты молекул, аналогичные связывающим сайтам некоторых естественных физиологически активных веществ организма хозяина, таких как инсулин, гонадотропин, кальмомодулин. Выявлен стимулирующий эффект стрессорных гормонов на рост патогенных штаммов *Escherichia coli*, показана зависимость транскрипции генов, кодирующих секрецию III типа и синтез флагелл, у энтерогеморрагических и энтеротоксигенных *E. coli* от эпинефрина (адреналина) и норэпинефрина (норадреналина), синтезируемых в клетках хозяина [6].

В этой связи, большой интерес представляет серотонин (5-окситриптами), принадлежащий к

группе биогенных аминов: азотистых оснований, возникающих в организме при декарбоксилировании аминокислот и обладающих чрезвычайно сильной активностью, благодаря высокой способности их к конформационным изменениям, к соединению с макромолекулами, к переносу электронов и протонов. Серотонин является нейромедиатором, медиатором воспаления и аллергических реакций, одним из компонентов сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, обладает выраженным иммуномодулирующим действием, способен комплексовать с ДНК про- и эукариот, с нуклеозидами и нуклеотидами, ингибировать процессы перекисного окисления липидов в клеточных мембранах, непосредственно взаимодействуя с перекисными радикалами [2, 4, 7, 8].

Установлено, что серотонин ускоряет рост культур *E. coli*, *Rhodospirillum rubrum*, *Candida guilliermondii*, *Streptococcus faecalis*, вызывая сокращение лаг-фазы, стимулирует формирование биопленки у *E. coli* и плодовых тел у миксобактерий [5]. Комбинация антибиотиков с психотропными препаратами – селективными ингибиторами транспорта серотонина через ионный канал, приводит к появлению чувствительности у полиантибиотикорезистентных штаммов [13].

Ранее, нами выявлено стимулирующее действие серотонина на накопление биомассы чумного микроба в жидких питательных средах [10]. Цель настоящего исследования – изучение влияния биогенного амина серотонина на рост и общий профиль синтезируемых белков чумного микроба в условиях культивирования на плотных питательных средах, возможности использования полученных результатов для повышения эффективности бактериологического метода исследования на чуму материала, контаминированного сопутствующей микрофлорой, включая объекты внешней среды.

Материалы и методы

В работе использовали вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ (*pFra*⁺, *pCad*⁺, *pPst*⁺), *Staphylococcus aureus* 209-П и *E. coli* 25922 ATCC (Государственная коллекция патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб», Саратов). Серотонин-креатинин сульфат (СКС) фирмы «Merck» (Germany) применяли в виде свежеприготовленного водного раствора в конечной концентрации 10^{-5} М в пересчете на серотонин основание, стерилизованного фильтрацией через мембранные фильтры с диаметром пор 0,2 μ m.

Y. pestis EV выращивали на агаре Хоттингера (рН 7,2) при температуре 28 °С в течение 48 ч, *E. coli* при 37 °С в течение 24 ч и *S. aureus* на агаре Хоттингера (рН 7,4) при 37 °С в течение 24 ч. Из полученных культур готовили соответствующие взвеси в стерильном 0,9 % растворе натрия хлорида (рН 7,2) по стандартному образцу мутности ОСО-42-28-85П 10 ед., эквивалентному $1 \cdot 10^9$ м.к./мл. Методом серийных разведений доводили концентрацию клеток до 10^3 м.к. в 1 мл. Для получения смешанной взвеси клеток *Y. pestis* EV, *S. aureus*, *E. coli* по 500 мкл взвеси каждого штамма вносили в одну пробирку. Навески природной почвы массой 1 г инфицировали 10^5 и 10^4 м.к *Y. pestis* EV, затем суспензировали в 10 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Для освобождения от грубых механических примесей полученную взвесь отстаивали в течение 3–5 мин, далее забирали верхний слой почвенной суспензии.

В одном варианте 100 мкл из образцов бактериальных взвесей, почвенной суспензии высевали на обработанную перед посевом серотонином поверхность пластин агара Хоттингера (рН 7,2), агара Хоттингера (рН 7,2) с лизированной кровью и генцианвиолетом (1:100000) с последующей инкубацией посевов при 28 °С в течение 24–48 ч. В другом – в опытные образцы бактериальных взвесей, почвенной суспензии добавляли раствор СКС в конечной концентрации 10^{-5} М в пересчете на серотонин основание и оставляли при комнатной температуре в течение 30 мин, затем высевали по 100 мкл на те же питательные среды без их предварительной обработки серотонином. Контролем служили посевы без серотонина.

Относительное содержание ДНК в клетках

чумного микроба регистрировали методом проточной цитометрии после специфической окраски смесью бромида этидия и митрамицина (1:1) [14]. Количественное измерение уровня свечения каждого из клеточных элементов в области спектра свыше 550 нм проводили на проточном цитофлуориметре ICP-22 PHYWE (Германия), оснащенный 2048 канальным амплитудным анализатором импульсов Orto Instruments (Westwood, Mass USA) для автоматической сортировки клеток и построения гистограмм. В каждом образце анализировалось не менее 30000 клеток. Электрофоретическое разделение цельноклеточных лизатов исследуемых культур в ПААГ с 0,1 % SDS осуществляли в системе диск-электрофореза по методу U.K.Laemmli с окраской гелей Coomassie Brilliant Blue R-250 [11]. Анализ полученных данных проводили с использованием стандартного пакета программ «Excel 2000», «Adobe Photoshop».

Результаты и обсуждение

В ходе проведенных нами исследований установлено, что биогенный амин серотонин в концентрации 10^{-5} М оказывает стимулирующее действие на рост чумного микроба в условиях культивирования на плотных питательных средах, применяемых при стандартном бактериологическом методе исследования на чуму (агар Хоттингера, рН 7,2, агар Хоттингера, рН 7,2, с лизированной кровью и генцианвиолетом).

Обработка серотонином как непосредственно самого исследуемого материала перед посевом (бактериальной взвеси, инфицированной почвенной суспензии), так и готовых агаровых пластин приводила к достоверному увеличению числа КОЕ чумного микроба. При добавлении серотонина во взвесь клеток *Y. pestis* EV или на поверхность агара количество выросших через 24–48 ч колоний чумного микроба возрастало в 2 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными посевами (таблица).

Аналогичные результаты получены нами при изучении влияния серотонина на рост чумного микроба в смешанной культуре. Ростостимулирующий эффект серотонина проявлялся одинаково как при нанесении раствора серотонина на поверхность агара, так и при внесении его в смешанную взвесь клеток *Y. pestis* EV, *S. aureus*, *E. coli* за 30 мин до посева на плотную питательную среду. Серотонин в концентрации 10^{-5} М оказывал также стимулирующее действие и на рост *E. coli*, что согласуется с данными А.В.Олескина и соавт. [5], однако сам эффект выражен намного слабее по сравнению с его действием на чумной микроб (уровень стимуляции роста по сравнению с контролем – 25% у *E. coli*, против – 120 % у *Y. pestis*; число КОЕ в контроле принято за 100 %). Отсутствие роста *St. aureus* 209-П связано с ингибирующим действием генцианвиолета на грамположительные бактерии.

Влияние 10^{-5} М серотонина на количество КОЕ *Y. pestis* через 24 и 48 ч инкубации при 28 °С на агаре Хоттингера (рН 7,2) с лизированной кровью и генцианвиолетом (1:100000)

Исследуемый материал	10^{-5} М серотонина	Вид микроорганизмов	КОЕ		
			n	через 24 ч	через 48 ч
				М ± m	М ± m
Монокультура	Внесение во взвесь	<i>Y. pestis</i> EV	10	44 ± 1,8*	85 ± 1,8*
	Контроль (без серотонина)	<i>Y. pestis</i> EV	10	20 ± 1,2	38 ± 1,0
Монокультура	Внесение во взвесь	<i>E. coli</i> 25922 ATCC	10	62 ± 2,5*	88 ± 4,9
	Контроль (без серотонина)	<i>E. coli</i> 25922 ATCC	10	50 ± 2,0	83 ± 4,3
Монокультура	Внесение во взвесь	<i>St. aureus</i> 209-П	10	Нет роста	Нет роста
	Контроль (без серотонина)	<i>St. aureus</i> 209-П	10	Нет роста	Нет роста
Смешанная культура	Внесение во взвесь	<i>Y. pestis</i> EV	10	12 ± 2,4*	32 ± 3,6*
		<i>St. aureus</i> 209-П	10	Нет роста	Нет роста
		<i>E. coli</i> 25922 ATCC	10	16 ± 2,7	29 ± 3,1
Смешанная культура	Контроль (без серотонина)	<i>Y. pestis</i> EV	10	6 ± 1,5	15 ± 1,9
		<i>St. aureus</i> 209-П	10	Нет роста	Нет роста
		<i>E. coli</i> 25922 ATCC	10	13 ± 2,3	22 ± 2,8
Почва (10^5 м.к. <i>Y. pestis</i> на 1 г почвы)	Внесение в почвенную суспензию	<i>Y. pestis</i> EV	5	6 ± 0,5*	55 ± 6,1*
	Нанесение на поверхность агаровых пластин	<i>Y. pestis</i> EV	5	7 ± 0,8*	37 ± 2,1*
	Контроль (без серотонина)	<i>Y. pestis</i> EV	5	Нет роста	10 ± 1,2
Почва (10^4 м.к. <i>Y. pestis</i> на 1 г почвы)	Внесение в почвенную суспензию	<i>Y. pestis</i> EV	5	2 ± 0,8*	20 ± 1,5*
	Нанесение на поверхность агаровых пластин	<i>Y. pestis</i> EV	5	3 ± 0,6*	18 ± 2,3*
	Контроль (без серотонина)	<i>Y. pestis</i> EV	5	Нет роста	6 ± 0,8

* Достоверность различий опытных проб с серотонином от проб без серотонина ($p < 0,05$).

При исследовании контаминированного сопутствующей микрофлорой материала, в первую очередь объектов внешней среды и, особенно, при малом содержании в нем чумного микроба, наблюдается, как правило, поздняя визуализация колоний *Y. pestis* (через 48–96 ч). На примере искусственно инфицированной *Y. pestis* природной почвы, нами установлено, что обработка серотонином перед посевом либо исследуемого материала, либо агаровых пластин позволяет значительно сократить (до 24 ч) сроки биологического накопления возбудителя чумы и увеличить в 3–5 раз число КОЕ чумного микроба. С применением серотонина нами разработан способ выделения чумного микроба бактериологическим методом из исследуемого материала (заявка на патент № 2007142840, приоритет от 19.11.2007), который не требует больших материальных затрат и дорогостоящего оборудования, легко воспроизводим и может быть реализован как в стационарных, так и полевых условиях.

По данным Н.В.Бренево и соавт. [1] адаптация *Y. pestis* к длительному персистированию в окружающей среде выражается в образовании некультивируемых форм (НФ). В эксперименте для реверсии НФ чумного микроба в вегетативную форму ими был использован метод, основанный на добавлении в бульон Хоттингера и казеиново-дрожжевой агар 10 % фетальной сыворотки, которая также является обязательным стимулирующим пролиферацию компонентом среды для культивирования эукариотических клеток. Зарубежными исследователями установлено, что 10 % фетальной сыворотки, добавляемой в сре-

ду для культивирования клеток, содержит $2,4 \cdot 10^{-6}$ М серотонина, способного к проявлению своих модулирующих свойств, а его селективное удаление приводит к их ингибированию [15]. В этой связи разработанный нами способ имеет перспективу применения для выделения некультивируемых форм *Y. pestis*.

Механизм действия серотонина на чумной микроб не изучен. С. Helene *et al.* [8] с использованием протонно-магнитного резонанса, физико-химических и стереохимических методов показана способность серотонина комплексоваться с ДНК, выделенной из эукариотических (тимус телят) и прокариотических (*Micrococcus lysodeikticus*) клеток. Вследствие связывания индольного кольца серотонина с основаниями ДНК происходит изменение конформационной структуры последней. Установлена связь биогенного амина серотонина с субклеточными структурами, в частности с митохондриями, и функционально важными компонентами клетки (АТФ, белками, липидами) [4]. Все это свидетельствует о возможности непосредственного влияния серотонина на систему регуляции микробного метаболизма, в том числе синтез ДНК.

Нами обнаружено, что обработка взвеси клеток *Y. pestis* EV серотонином в конечной концентрации 10^{-5} М в течение 30 мин при комнатной температуре приводит к достоверному двукратному увеличению доли клеток с повышенным содержанием ДНК, регистрируемой методом проточной цитометрии (рис. 1). Ранее А.В.Олескиным и соавт. было отмечено, что ростостимулирующий эффект серотонина на *E. coli*, *Rsp. rubrum* не зависел от того, добавляли ли серо-



Рис. 1. Влияние серотонина на характер распределения *Y. pestis* EV по клеточному циклу

А – распределение клеток *Y. pestis* EV без обработки бактериальной взвеси серотином; Б – распределение клеток *Y. pestis* EV с обработкой бактериальной взвеси 10^{-5} М серотонина

тонин однократно в момент посева культуры или вносили многократно [5]. По-видимому, биогенный амин серотонин действует на определенный «пусковой механизм», инициируемый на ранней стадии развития культуры.

Следующим этапом наших исследований явилось сравнительное изучение электрофоретических профилей белков лизатов клеток *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных при 28 °С в течение 24 ч на агаре Хоттингера, агаре Хоттингера с лизированной кровью как с предварительной обработкой серотином агаровых пластин, так и без нее. Обнаружено, что культивирование *Y. pestis* EV на агаре Хоттингера, обработанном 10^{-5} М серотонина, приводило почти к исчезновению на тестируемых протеинограммах мажорного белка с молекулярной массой 22 кДа, выявляемого в лизатах культур *Y. pestis* EV, выращенных на этой же среде, но без серотонина (рис. 2). Присутствие серотонина в среде культивирования также индуцировало значительное снижение синтеза полипептидов с молекулярными массами 34–35 и 70–72 кДа. Следует отметить близкое сходство электрофоретических профилей белков лизатов культур *Y. pestis* EV, выращенных на агаре Хоттингера с серотином и на агаре Хоттингера с лизированной кровью без серотонина, что очевидно обусловлено присутствием в препаратах лизированной крови серотонина в связи с высвобождением его из разрушенных тромбоцитов. Обработка серотином агара Хоттингера с лизированной кровью приводила через 24 ч культивирования к еще более выраженным изменениям на протеинограммах лизатов культур *Y. pestis* EV. Так, большинство выявляемых на предыдущих электрофореграммах мажорных белков, в настоящей обнаруживались в виде минорных полос. Регистрировалось выраженное снижение продукции полипептидов с молекулярными массами 23–24, 34–35, 45, 55, 70–72 кДа.

Согласно исследованиям С.П.Задновой [3], выделенный из клеток штамма *Y. pestis* EV белок с молекулярной массой 22 кДа принимает участие в формировании поверхностного заряда клеток, проявлении адгезивных свойств и рассматривается как

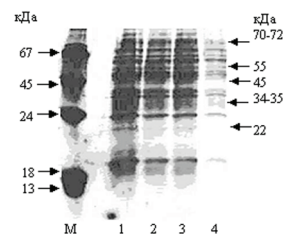


Рис. 2. Электрофореграмма цельноклеточных лизатов клеток *Y. pestis* EV, выращенных при 28 °С в течение 24 ч

М – маркеры (белки с известной молекулярной массой); 1 – бактерии выращены на агаре Хоттингера; 2 – бактерии выращены на агаре Хоттингера с серотином; 3 – бактерии выращены на агаре Хоттингера с лизированной кровью; 4 – бактерии выращены на агаре Хоттингера с лизированной кровью и серотином

дополнительный фактор, обеспечивающий контакт патогена с клетками макроорганизма. Утрата полипептида 22 кДа клетками *Y. pestis* EV ведет к снижению захвата и поглощения их макрофагами, обуславливает картину незавершенного фагоцитоза. Выявленный нами ингибирующий эффект серотонина на синтез полипептида с молекулярной массой 22 кДа имеет, по-видимому, немаловажное значение для адаптации и реализации патогенного потенциала чумного микроба на начальных этапах инфекционного процесса.

Не исключено также, что данный эффект может быть реализован в условиях биопленки *Y. pestis* в блохах, так как клетки чумного микроба, выделенные из биопленки, обладают повышенной резистентностью к фагоцитозу полиморфноядерными лейкоцитами крови человека именно на стадии захвата, а внеклеточный матрикс, образующий оболочку биопленки *Y. pestis*, включает форменные элементы поглощенной блохой крови [9], в состав которых входят тромбоциты, депонирующие серотонин. Вследствие разрушения и агрегации тромбоцитов происходит высвобождение серотонина, способного к реализации своего модулирующего действия. В пользу высказанного предположения свидетельствует также факт отсутствия продукции чумным микробом при нахождении в блохе таких антифагоцитарных факторов, как капсульный антиген F1 и секретируемые белки Yop [9].

Таким образом, полученные в результате проведенных исследований новые сведения о влиянии серотонина на рост и электрофоретический профиль белков чумного микроба свидетельствуют о реальной возможности использования возбудителем чумы в качестве триггера ускоренного развития биогенного амина серотонина, являющегося компонентом микроокружения в месте входных ворот чумной инфекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бренева Н.В., Марамович А.С., Климов В.Т. Клональная структура популяций *Yersinia pestis* в экспериментальных почвенных экосистемах. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 1:12–6.

2. Бурлакова Е.Б., Губарева А.Е., Архипова Г.В., Рогинский В.А. Модуляция перекисного окисления липидов биогенными аминами в модельных системах. *Вопр. мед. химии*. 1992; 2:17–20.
3. Заднова С.П. Влияние полипептида с молекулярной массой 22 кД на свойства клеточной поверхности штаммов возбудителей чумы [автореф. дис. ... канд. биол. наук]. Саратов; 1998. 20 с.
4. Ноздрачев А.Д., Пушкарёв Ю.П. Характеристика медиаторных превращений. Л.: Наука; 1980. 230 с.
5. Олескин А.В., Кировская Т.А., Ботвинко И.В., Лысак Л.В. Действие серотонина (5-окситриптамина) на рост и дифференциацию микроорганизмов. *Микробиология*. 1998; 67(3):305–12.
6. Пинчук Л.М. Молекулярная мимикрия как фактор патогенности микроорганизмов. *Усп. совр. биологии*. 1992; 1129(2):225–37.
7. Щуковская Т.Н., Назарова Л.С., Тараненко Т.М. Модуляция биогенными аминами колониеобразующей функции стволовых кроветворных клеток в условиях иммунизации капсульным антигеном (Ф1) чумного микроба. *Пробл. особо опасных инф.* 1999; 79:131–7.
8. Helene C., Dimicoli J. L., Brun F. Binding of tryptamine and 5-hydroxytryptamine (serotonin) to nucleic acids. Fluorescence and proton magnetic resonance studies. *Biochemistry*. 1971; 10(20):3802–09.
9. Jarret C.O., Deak E., Ishewood K.E., et al. Transmission of *Yersinia pestis* from an infectious biofilm in the flea vector. *J. Infect. Dis.* 2004; 190(4):783–92.
10. Korsukov V.N., Shchukovskaya T.N., Kravtsov A.L., Popov Yu. A. The application of the flow cytometry for determination of DNA amount in *Yersinia pestis* cells under the influence of serotonin (5-hydroxytryptamine). *Proc. SPIE*. 2002; 4707:337–42.
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(15):680–5.
12. Lyte M. Microbial endocrinology and infectious disease in the 21 st century. *Trends Microbiol.* 2004; 12(1):14–20.
13. Munoz-Bellido J.L., Munoz-Griado S., Garcia-Rodriguez J.A. Antimicrobial activity of psychotropic drugs: selective serotonin

- reuptake inhibitors. *Int. J. Antimicrob Agents*. 2000; 14(3):177–80.
14. Steen H.B., Boye E. *Escherichia coli* growth studied by dual-parameter flow cytophotometry. *J. Bacteriol.* 1981; 145(2):1091–94.
15. Sternberg E.M., Trial J., Parker C.W. Effect of serotonin on murine macrophages: suppression of Ia expression by serotonin and its reversal by 5-HT₂ serotonergic receptor antagonists. *J. Immunol.* 1986; 137(1):276–82.
16. Visidou I., Lyte M., van Diemen P.M., Hawes P., Monaghan P., Wallis T.S., Stevens M.P. The Neuroendocrine Stress Hormone Norepinephrine Augments *Escherichia coli* O157:H7-Induced Enteritis and Adherence in a Bovine Ligated Ileal Loop Model of Infection. *Infect. Immun.* 2004; 72(9):5446–51.

T.N.Schukovskaya, S.N.Klueva, A.L.Kravtsov, O.A.Volokh,
Yu.A.Aleoshina, V.V.Kutyrev

Influence of Serotonin Biogenic Amine on Plague Microbe Growth and Profile of its Proteins in Conditions of Cultivation on Solid Mediums

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

New data on stimulating effect of serotonin biogenic amine on the growth of plague microbe were obtained. A new method for *Yersinia pestis* isolation from material under consideration, contaminated with concomitant microflora, including environmental objects, by means of bacteriologic method was worked out using serotonin. This method allows reducing the periods of biological accumulation of plague etiological agent down to 24 hours, and increasing the number of colony-forming units (CFU) of plague microbe. Serotonin inhibitory effect to the synthesis of polypeptide with molecular mass of 22 kD was recognized in conditions of cultivating on Hottinger's agar (pH 7.2) at 28 °C during 24 hours.

Key words: *Y. pestis*, serotonin, environmental objects, growth, electrophoretic profile of proteins.

Поступила 22.02.08.

ИММУНОЛОГИЯ, БИОТЕХНОЛОГИЯ, ДИАГНОСТИКА

УДК 616.981.51:616-097

В.Ю.Долматов¹, А.В.Дробкова¹, А.Г.Лютов³, О.В.Мальцева¹, А.Н.Шевцов², Д.В.Боровской², Г.Д.Елагин², М.В.Карпова¹, О.А.Вершинина¹, Е.А.Блинова¹, С.Л.Шарыгин¹

ВОЗМОЖНОСТЬ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОТИВОСИБИРЕЯЗВЕННОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ

¹ФГУ «Кировский НИИ гематологии и переливания крови Росмедтехнологий»;

²ФГУ 48 ЦНИИ Минобороны РФ; ³ЗАО «Иммуно-Гем», Киров

Впервые из плазмы крови доноров, иммунизированных комбинированной сибиреязвенной вакциной, получен специфический иммуноглобулин, удовлетворяющий нормам качества, предъявляемым к внутривенным иммуноглобулинам, и содержащий антитела к протективному антигену *Bacillus anthracis* в титре 1:1600 – 1:3200. Лечебная и профилактическая эффективность экспериментально-производственных серий препарата показана в экспериментах на животных.

Ключевые слова: сибирская язва, профилактика, иммуноглобулин человека.

Сибирская язва – особо опасное зоонозное антропоургическое инфекционное заболевание, вызываемое спорообразующей бактерией *Bacillus anthracis*. Она может возникнуть у человека после контакта с зараженным животным, его трупом или с контаминированной спорами сибирской язвы почвой. Возможно заражение человека воздушно-пылевым путем [9]. По мнению ряда ученых, возбудитель сибирской язвы является одним из наиболее вероятных агентов биологического оружия из-за способности

спор этого возбудителя проникать через дыхательные пути, высокой смертности при легочной форме сибирской язвы и стабильности спор во внешней среде [3, 7]. Угроза применения сибиреязвенного микроба в споровой форме в качестве средства биотерроризма нашла практическое воплощение в 2001 г. на территории США [15].

Эффективность комплексной терапии больных сибирской язвой, особенно легочной формой болезни, несмотря на применение современных лекарственных

ных препаратов и высокотехнологичного медицинского оборудования, недостаточна [3, 13]. Введение высоких доз антибактериальных препаратов, основного средства лечения сибирской язвы, связано с возникновением неблагоприятных побочных эффектов; разрушение клеток возбудителя может привести к развитию токсического шока и гибели больного [14]. Применяемый в нашей стране антитоксический препарат – противосибирезвенный лошадиный иммуноглобулин – предназначен для внутримышечного введения. Такой способ введения иммуноглобулина (ИГ) не позволяет добиться быстрого нарастания концентрации антител в крови реципиента до эффективного уровня [10], в связи с чем разрабатывается инфузионная форма гетерологичного ИГ, расщепленного до Fab-фрагментов [4]. Вместе с тем гетерогенные препараты способны вызывать у людей тяжелые реакции анафилактического типа [10].

Мировой опыт разработки и применения целевых (или специфических) внутривенных иммуноглобулинов человека (ВВИГ) свидетельствует об их высокой эффективности и безопасности при лечении тяжелых инфекционных болезней различной этиологии [10, 11, 12], поэтому создание аллогенного антитоксического противосибирезвенного ИГ, пригодного для внутривенного введения, весьма актуально.

Технологические варианты получения отечественных ВВИГ предусматривают либо ферментативную обработку раствора иммуноглобулина [8], либо его инкубацию при кислом значении pH [1], что снижает так называемую «антикомплементарную активность», обеспечивая внутривенную переносимость ИГ, позволяет сохранить высокое содержание мономерного IgG, распределение подклассов, близкое к таковому в плазме крови человека, и обеспечить сохранность специфической активности антител к ряду антигенов бактериальной и вирусной природы [6].

Целью настоящего исследования было изучение возможности получения противосибирезвенного иммуноглобулина человека для внутривенного введения, определение его иммунохимических параметров и защитных свойств.

Материалы и методы

Кадровых доноров ФГУ «Кировский НИИ гематологии и переливания крови Росмедтехнологий», давших письменное информированное согласие на участие в исследовании и прошедших медицинский осмотр (61 человек), иммунизировали однократно подкожно в объеме 0,5 мл вакциной сибирезвенной комбинированной сухой и жидкой для подкожного применения серии 1/02 или 5/02 производства 48 ЦНИИ Минобороны РФ. Содержание антител к протективному антигену (ПА) *B. anthracis* в крови доноров определяли каждые две недели в течение 20 недель методом непрямого гетерогенного иммуноферментного анализа (ИФА) с применением

тест-системы иммуноферментной для определения титров антител к протективному антигену сибирезвенного микроба в сыворотке крови человека, разработанной сотрудниками 48 ЦНИИ Минобороны РФ. За титр образца принимали наибольшее разведение, оптическая плотность которого в 2,1 раза превышала таковую отрицательного контрольного образца.

Иммунную плазму заготавливали методом плазмафереза и хранили при температуре не выше минус 20 °С. После карантинизации и формирования пулов плазму фракционировали этиловым спиртом до стадии получения раствора иммуноглобулина. ВВИГ получали с использованием пепсина [8] или инкубацией при кислом значении pH [1] и контролировали в соответствии с нормативными документами [5].

Профилактическая эффективность экспериментально-производственных серий препарата изучена на 18 беспородных морских свинках обоего пола массой от 250 до 300 г. Животным опытной группы вводили подкожно по 4 мл исследуемого ВВИГ, морским свинкам группы сравнения – по 2 мл противосибирезвенного лошадиного ИГ, животных контрольной группы оставляли интактными. Через 24 ч животных всех трех групп заражали 50 LD₅₀ культуры тест-штамма 71/12 *B. anthracis* в объеме 1 мл. Срок наблюдения составил 10 сут от момента заражения.

Лечебную эффективность экспериментально-производственных серий препарата оценивали на 38 беспородных кроликах обоего пола массой от 2,0 до 2,5 кг. Животных заражали подкожно 1 мл (10 LD₅₀) культуры тест-штамма Ч-7 *B. anthracis*. При исследовании эффективности ВВИГ в качестве средства монотерапии животным через 24 ч вводили по 2,4 мл раствора ВВИГ внутривенно (опытная группа) или по 1,2 мл противосибирезвенного лошадиного ИГ внутримышечно (группа сравнения). При исследовании эффективности ВВИГ в комплексной терапии заражающая доза составила 50 LD₅₀. Через 24 ч животным вводили по 2,4 мл ВВИГ внутривенно и по 560 мг ампициллина внутримышечно (опытная группа), или по 1,2 мл противосибирезвенного лошадиного ИГ и по 560 мг ампициллина внутримышечно (первая группа сравнения), или только 560 мг ампициллина (вторая группа сравнения). Лечение продолжали в течение 5 сут, учет результатов проводили на 15-е сутки от момента заражения.

Результаты и их обсуждение

Мониторинг нарастания титров антител к ПА *B. anthracis* в сыворотке крови иммунизированных доноров показал, что гуморальный иммунный ответ на введение сибирезвенной вакцины имеет амплитудно-затухающий характер с периодом колебаний, равным четырем неделям. Данная математическая аналогия легла в основу разработанного графика-алгоритма обследования доноров с учетом реакции на вакцинацию. Алгоритм минимизирует количество исследований и позволяет дифференци-

ровать доноров в зависимости от их специфической иммунореактивности.

Учитывая отсутствие сведений о возможности концентрирования аллогенных антител к ПА *B. anthracis* в процессе фракционирования белков плазмы крови, первые порции иммунной плазмы были подвергнуты фракционированию в лабораторных условиях. Установлено, что целевые антитела являются достаточно стабильными, могут быть сконцентрированы в 4 раза, а минимальный расчетный титр исходной плазмы должен составлять не менее 1:400.

Оценка содержания целевых антител в сыворотке крови иммунизированных доноров позволила выявить целевые антитела в титре не менее 1:400 у 70 % обследованных, менее 1:400 – у 17 %; 13 % иммунизированных лиц не ответили активной антителопродукцией. Первое существенное снижение содержания целевых антител зарегистрировано через девять недель после иммунизации, продолжительность выявления антител к ПА в титре более 1:400 составила от 7 до 11 недель.

Из 172 л иммунной плазмы были сформированы три пула, из которых получены экспериментально-производственные серии ВВИГ: № 1 и 2 методом пепсинолиза, серия № 3 – с использованием инкубации в кислой среде. Физико-химические и иммунобиологические свойства полученных серий ВВИГ оценивали в соответствии с требованиями, предъявляемыми к внутривенным иммуноглобулинам. Все серии представляли собой прозрачные бесцветные стерильные апиrogenные нетоксичные растворы, свободные от маркеров основных гемотрансмиссивных инфекций.

В таблице представлены «критические» свойства полученных серий ВВИГ, связанные с внутривенной толерантностью и специфической активностью препарата иммуноглобулина. Антитела к ПА *B. anthracis* выявлены в титре не менее 1:1600 в сериях № 1 и 2 и 1:3200 в серии № 3, что свидетельствует об отсутствии негативного влияния основных производственных стадий получения внутривенного иммуно-

глобулина на специфическую активность препарата. Значительное содержание фрагментов IgG в сериях № 1 и 2 обусловлено особенностями снижения антикомплемментарной активности методом пепсинолиза, при котором происходит частичное расщепление белковой молекулы [6]. Достоинством альтернативного метода получения ВВИГ является более высокое относительное содержание мономеров IgG в конечном препарате.

Профилактическая и лечебная эффективность полученных экспериментально-производственных серий ВВИГ изучена в экспериментах на животных. Препаратом сравнения служил противосибирезвенный лошадиный ИГ, концентрация общего белка в котором составляла 10 %. Учитывая, что исследуемые ВВИГ содержали около 5 % белка, их вводили в объеме, в 2 раза превышающем таковой препарата сравнения.

Согласно результатам оценки профилактических свойств препаратов, введение ВВИГ обеспечило защиту 50 % морских свинок к концу срока наблюдения при гибели всех животных контрольной группы к 4-м суткам после заражения. Полученные данные сопоставимы с результатами профилактического действия лошадиного ИГ: в группе сравнения выжило 67 % животных. Несколько более высокая выживаемость в группе сравнения может быть связана с более высоким содержанием специфических антител в гетерогенном ИГ, полученном из крови гипериммунизированных лошадей.

Сходные результаты были получены в ходе экспериментальной оценки эффективности применения ВВИГ в качестве средства монотерапии. В опытной группе выживаемость составила 33 %, в группе сравнения – 50 %. Все животные контрольной группы погибли.

Комбинация специфических иммуноглобулиновых препаратов с антибиотиком, несмотря на более высокую заражающую дозу, обеспечила защиту от гибели 60 % кроликов, тогда как при использовании только ампициллина выжило 20 % живот-

Иммунохимическая характеристика противосибирезвенного внутривенного иммуноглобулина человека

Параметр	Метод получения иммуноглобулина		
	Серия № 1 (пепсинолиз)	Серия № 2 (пепсинолиз)	Серия № 3 (инкубация в кислой среде)
Титр антител к протективному антигену <i>B. anthracis</i>	1:1600	1:1600	1:3200
Концентрация белка, %	5,3	5,4	4,5
Антикомплемментарная активность	0 CH ₅₀ на 1 мг белка	0 CH ₅₀ на 1 мг белка	0 CH ₅₀ на 1 мг белка
Электрофоретическая чистота, %	100	100	100
Фракционный состав по результатам иммуноэлектрофореза	Интенсивная расщепленная дуга преципитации IgG		Интенсивная дуга преципитации IgG и одна дополнительная дуга
Относительное содержание			
полимеров IgG, %;	0	0	0
димеров IgG, %;	5,8	3,3	4,9
мономеров IgG, %;	79,7	84,9	94,7
фрагментов IgG, %	14,5	11,8	0,4

ных. Все животные контрольной группы погибли. Эффективность противосибирезвенного ВВИГ в данном эксперименте равна эффективности лошадиного ИГ. Возможно, отсутствие различий в применении ВВИГ и лошадиного ИГ, обусловлено хорошо известным и используемым для терапии тяжелых инфекционных болезней синергизмом действия ВВИГ и антибактериальных препаратов [2].

Результаты оценки профилактических и лечебных свойств противосибирезвенного ВВИГ, содержащего антитела к ПА в титре не менее 1:1600, свидетельствуют о достаточно высокой антитоксической активности препарата. Его эффективность сопоставима, а в комбинации с антибиотиком равна эффективности лошадиного ИГ, вводимого по эквивалентным схемам. Необходимо отметить, что применение ВВИГ людям допускается в максимальной разовой дозе – 2 г на 1 кг массы тела (более 2500 мл 5 % белкового раствора), в то время как допустимый объем введения лошадиного ИГ, лимитированный способом введения (внутримышечная инъекция) и, главным образом, гетерогенной природой препарата, может составлять не более 100 мл 10 % белкового раствора. Дальнейшая работа по получению противосибирезвенного ВВИГ, исследованию его протективных свойств и лечебной эффективности представляется перспективной.

Таким образом, получены экспериментальные образцы противосибирезвенного внутривенного иммуноглобулина человека с содержанием антител к протективному антигену *B. anthracis* в титре 1:1600 – 1:3200, основные параметры которого соответствуют требованиям, предъявляемым к ВВИГ. Лечебная и профилактическая эффективность экспериментально-производственных серий препарата подтверждена в экспериментах на животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алешкин В.А., Лютов А.Г., изобретатели. Препарат иммуноглобулина для внутривенного введения и способ его полу-

чения. Патент RU 2122864.

2. Козлов В.К. Сепсис: этиология, иммунопатогенез, концепция современной иммунотерапии. СПб; 2006.

3. Лобзин Ю.В., Волжанин В.М., Захаренко С.М. Клин. микробиол. и антимикробная химиотерапия. 2001; 2:104–27.

4. Маринин Л.И., Степанов А.В., Алешкин В.А. и др. Мониторинг сибирской язвы. М.; 1999.

5. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям: Методические указания МУК 4.1/4.2.588-96. М.; 1998.

6. Мостовская Е.В. Оптимизация технологии получения жидкой формы иммуноглобулина для внутривенного введения [дис. ... канд. биол. наук]. М.; 2004.

7. Рубинштейн Э. Клин. микробиол. и антимикробная химиотерапия. 2001; 4:290–300.

8. Сапожникова В.С., Шарыгин С.Л., изобретатели. Способ получения иммуноглобулина для внутривенного введения. Патент RU 2068695.

9. Черкасский Б.Л. Особо опасные инфекции: Справочник. М.; 1996.

10. Шарыгин С.Л. Препараты внутривенных иммуноглобулинов из донорской плазмы для терапии бактериальных и вирусных инфекций (получение и клиническое применение) [дис. ... докт. мед. наук]. Киров; 1997.

11. Шкуратова О.В. Разработка научно-методических основ технологии производства специфического препарата для лечения больных дифтерией [автореф. дис. ... канд. биол. наук]. Томск; 2002.

12. Arnon S.S., Schechter R., Maslanka S.E., et al. N. Engl. J. Med. 2006; 354:462–71.

13. Dixon T.C., Meselson M., Guillemin J., et al. N. Engl. J. Med. 1999; 341:815–26.

14. Hanna P. J. Appl. Microbiol. 1999; 87:285–7.

15. Spencer R.C. J. Clin. Pathol. 2003; 56:182–7.

V.Yu.Dolmatov, A.V.Drobkova, A.G.Lyutov, O.V.Mal'tseva, A.N.Shevtsov, D.V.Borovskoy, G.D.Yelagin, M.V.Karpova, O.A.Vershinina, E.A.Blinova, S.L.Sharygin

Possibility to Obtain Anti-Athrax Human Immunoglobulin for Intravenous Injection

FSO "Kirov RI of Hematology and Blood Trasfusion of Rosmedtechnologies"; FSO 48 CRI of the Russian Ministry of Defense; PC "Immuno-Gem", Kirov

For the first time specific Ig was obtained from blood plasma of donors immunized by combined anthrax vaccine. This Ig conforms to quality standards for intravenous immunoglobulins and includes antibodies to *Bacillus anthracis* protective antigen in titer 1:1600 – 1:3200. Therapeutic and prophylactic efficacy of experimental-production series of preparation was demonstrated in experiments with animals.

Key words: anthrax, prophylaxis, human immunoglobulin.

Поступила 24.03.08.

М.Н.Киреев, Т.А.Полунина, Н.П.Гусева, Н.А.Подборонова, Я.М.Краснов,
Т.М.Тараненко

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННЫХ СВОЙСТВ АНТИГЕНА Ф1 ЧУМНОГО МИКРОБА, КОНЬЮГИРОВАННОГО С НАНОЧАСТИЦАМИ КОЛЛОИДНОГО ЗОЛОТА И СЕРЕБРА

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

Изучено влияние наночастиц коллоидного золота (КЗ) и серебра (КС) на иммунобиологические свойства антигенов и возможности использования их в качестве адъювантов для стимуляции антителообразования. Показано, что капсульный антиген Ф1 чумного микроба, конъюгированный с наночастицами КЗ и КС, обладает более выраженными иммуногенными свойствами, чем исходный антиген Ф1, независимо от способа введения. Золи золота и серебра с антигенами стабильны, способны стимулировать выработку специфических антител при меньшей антигенной нагрузке, не вызывают общих и местных реакций, удобны в применении, что дает возможность их использования в иммунологической практике в качестве адъювантов при конструировании иммунобиологических препаратов.

Ключевые слова: капсульный антиген Ф1, наночастицы КЗ и КС, адъюванты.

В настоящее время одним из перспективных направлений в области профилактики чумы является создание препаратов нового типа на основе специфических протективных антигенов.

Капсульный антиген Ф1, являясь видоспецифическим антигеном и основным иммуногеном *Yersinia pestis*, играет ведущую роль в развитии противочумного иммунитета и до настоящего времени остается важной составной частью большинства современных чумных вакцинных и диагностических препаратов [3, 10]. В отечественной практике капсульный антиген как вакцинирующий препарат представлен в составе двух экспериментальных химических вакцин: комплекса Ф1 с основным соматическим антигеном (ОСА) гликопротеиновой природы и Ф1, депонированной на геле гидроокиси алюминия [10].

Золи металлов золота и серебра давно используются в иммуноанализе в качестве маркеров специфических антигенов (АГ) и антител (АТ) для диагностики острых кишечных инфекций, бруцеллеза, псевдотуберкулеза и чумы [2, 4, 5, 7, 11, 13]. Имеются сообщения, где коллоидное золото (КЗ) может быть успешно использовано при иммунизации животных как носитель для гаптенных [14], а также в качестве адъюванта и растворителя для таких биологически активных веществ, как бычий сывороточный альбумин и антиген клеточной стенки бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* [1, 13]. Сведений об адъювантных свойствах растворов коллоидного серебра (КС) в литературе нами не обнаружено.

Целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение иммуногенных свойств антигена Ф1 чумного микроба, конъюгированного с наночастицами коллоидного золота и серебра, а также возможности использования золей этих металлов в качестве адъювантов для стимуляции антителообразования.

Материалы и методы

В качестве антигенов в эксперименте использовали капсульный антиген Ф1, выделенный из центрифугата бульонной культуры вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, методом одноэтапной гель-хроматографии на АСА-22 в соответствии с Инструкцией по изготовлению и контролю капсульного антигена Ф1 чумного очищенного, сухого [6] и бычий сывороточный альбумин (БСА) («Serva», ФРГ).

Препарат Ф1 (сер. 44) представлял собой белок, гомогенный по данным ВЭЖХ и иммунодиффузии [8].

Коллоидное серебро (КС) с диаметром частиц 5–12 нм получали путем восстановления из 0,025 % раствора азотно-кислого серебра в деионизованной воде при добавлении равного объема 0,05 % раствора боргидрида натрия («Sigma», США) в деионизованной воде [11]. Золь серебра формировался при активном перемешивании на магнитной мешалке при комнатной температуре в течение 15 мин. «Серебряное число» (минимальное количество белка, защищающее золь против солевой агрегации) оказалось равным 100 мкг на 1 мл золя. В готовый золь (10 мл) добавляли водный раствор антигена Ф1 (1 мл) с концентрацией 1 мг/мл. Образование серебряного конъюгата Ф1 проводили при непрерывном перемешивании и комнатной температуре в течение 15–20 мин. В готовом растворе концентрация Ф1 составила 9 мкг / 0,1 мл КС (иммунизирующая доза на одну мышь). Аналогичным образом готовили конъюгат КС с бычьим сывороточным альбумином, исходная концентрация которого составляла 1 мг/мл, а в конъюгате с золем серебра – 90 мкг/мл.

КЗ с диаметром частиц 15 нм получали посредством добавления к 2,5 мл кипящего 1 % водного раствора золотохлористо-водородной кислоты 7,8 мл

1 % раствора цитрата натрия. Раствор кипятили в течение 20 мин при перемешивании [15]. «Золотое число» оказалось равным 7,8 мкг на 1 мл раствора коллоидного золота. Образование золотого конъюгата проводили следующим образом: к 3 мл раствора коллоидного золота добавляли 9 мкл 0,2 М раствора углекислого калия (для создания pH 7,2) и 23 мкл раствора Ф1 (исходная концентрация 1 мг/мл). Смесь тщательно перемешивали и выдерживали в течение 1 ч при комнатной температуре. Конечная концентрация Ф1 в золотом конъюгате составила 7,8 мкг/мл или 1,56 мкг / 0,2 мл. Аналогичным образом готовили конъюгат КЗ с БСА. К 3 мл раствора КЗ добавляли 9 мкл 0,2 М углекислого калия и 30 мкл раствора БСА (исходная концентрация 1 мг/мл). Конечная концентрация БСА в золотом конъюгате составила 10 мкг/мл или 1 мкг / 0,1 мл. Растворы конъюгатов антигенов с КЗ и КС оставались стабильными в течение 2 месяцев (срок наблюдения) в холодильнике при 4 °С.

Иммунизирующие препараты с неполным адъювантом Фрейнда (НАФ) готовили *ex tempore*, путем смешивания в объемном соотношении 1:1 адъюванта и растворов Ф1 или БСА с исходной концентрацией антигенов 180 и 300 мкг/мл соответственно.

В опытах использовали беспородных белых мышей массой 18–20 г из питомника РосНИПЧИ «Микроб».

Динамику образования специфических антител к БСА и Ф1 в мышиных сыворотках исследовали методом твердофазного иммуоферментного анализа (ТИФА) с использованием антимышиного пероксидазного конъюгата.

Результаты и обсуждение

Для сравнения адъювантных свойств наночастиц коллоидного золота и серебра был выбран стандартный слабый иммуноген – бычий сывороточный альбумин (БСА) [12], в качестве адъюванта сравнения использовали неполный адъювант Фрейнда (НАФ),

который стимулирует преимущественно гуморальный иммунитет [9].

В опыт было взято 15 беспородных белых мышей: четыре группы по 3 и 3 интактные в качестве отрицательного контроля. Иммунизацию проводили четырехкратно с интервалом в 2 недели по схеме (табл. 1), через 10 дней после последней иммунизации у животных забирали кровь декапитацией.

Из табл. 1 видно, что после 4-кратной иммунизации мышей БСА в дозе 30 мкг титр специфических АТ в контрольной группе (без адъювантов) был в 4 раза меньше, чем в опытной группе, иммунизированной БСА + НАФ. В группах, иммунизированных конъюгатами БСА + КЗ и БСА + КС, титр АТ был в 4 раза ниже и совпадал с контрольной группой, однако иммунизирующая доза БСА была также заметно ниже – в 30 и 3,3 раза соответственно.

Далее мы изучали возможность использования наночастиц КЗ и КС в качестве адъювантов при иммунизации белых мышей капсульным антигеном Ф1 различными способами введения.

В опыт было взято 75 беспородных белых мышей: восемь групп по 9 и 3 – интактные (отрицательный контроль). Иммунизацию проводили двукратно с интервалом в 2 недели, затем, через это же время, однократно реиммунизировали (только АГ), через 10 дней после каждой манипуляции забирали кровь методом декапитации у 3 животных (табл. 2).

В табл. 2 представлена определенная динамика нарастания титра специфических АТ к Ф1 чумного микроба в мышиных сыворотках. Как видно из приведенных данных, АТ появились у всех групп животных уже после первой иммунизации с дальнейшим

Таблица 1

Сравнение адъювантных свойств наночастиц КЗ и КС на примере БСА

Иммунизирующие препараты	Компоненты раствора для иммунизации	Доза БСА и способ введения препарата	Титр специфических антител в ТИФА
БСА + ФР	300 мкг БСА в 1 мл ФР	30 мкг в 0,1 мл, в/м	1:640
БСА + НАФ	1 мл НАФ + 300 мкг БСА в 1 мл ФР	30 мкг в 0,2 мл, п/к	1:2560
БСА + КЗ	10 мкг БСА / 1 мл КЗ	1 мкг в 0,1 мл, в/м	1:160
БСА + КС	90 мкг БСА / 1 мл КС	9 мкг в 0,1 мл, в/м	1:640

Примечания. Здесь и в табл. 2 приведены средние титры антигенов (АТ) по каждой группе животных. ФР – физиологический раствор 0,9 % NaCl; в/м – внутримышечно, п/к – подкожно.

Таблица 2

Использование наночастиц КЗ и КС в качестве адъювантов при иммунизации белых мышей Ф1 различными способами

Иммунизирующие препараты	Компоненты р-ра для иммунизации	Доза Ф1 и способ введения	Титр специфических антител в ТИФА		
			1-я иммунизация	2-я иммунизация	3-я иммунизация
Ф1 + ФР	180 мкг Ф1/мл	18 мкг в 0,1 мл, в/б*	1:32	1:320	1:1280
Ф1 + ФР	180 мкг Ф1/мл	18 мкг в 0,1 мл, в/м	1:16	1:320	1:1280
Ф1 + НАФ	1 мл (180 мкг Ф1) + 1 мл НАФ	18 мкг в 0,2 мл, в/б	1:64	1:640	1:5120
Ф1 + НАФ	1 мл (180 мкг Ф1) + 1 мл НАФ	18 мкг в 0,2 мл, п/к	1:64	1:320	1:5120
Ф1 + КЗ	7,8 мкг Ф1/мл КЗ	1,56 мкг в 0,2 мл, в/б	1:64	1:640	1:2560
Ф1 + КЗ	7,8 мкг Ф1/мл КЗ	1,56 мкг в 0,2 мл, в/м	1:64	1:320	1:2560
Ф1 + КС	90 мкг Ф1/мл КС	9 мкг в 0,1 мл, в/б	1:64	1:640	1:5120
Ф1 + КС	90 мкг Ф1/мл КС	9 мкг в 0,1 мл, в/м	1:64	1:320	1:5120

* в/б – внутрибрюшинно.

увеличением их титра при последующих введениях препаратов Ф1.

Необходимо отметить, что после 3-й иммунизации титр АТ в контрольной группе (без адъювантов) был в 4 раза ниже по сравнению с группами, где в качестве адъювантов использовали НАФ и КС. Однако иммунизирующая доза Ф1 с НАФ была одинаковой с контрольной и составляла 18 мкг, тогда как в конъюгате с КС – в 2 раза меньше (9 мкг). Кроме того, титр АТ контрольной группы был в 2 раза ниже по сравнению с группой, иммунизированной препаратом Ф1+КС, причем доза Ф1 была меньше примерно в 11 раз. При анализе результатов в опытной группе видно, что, по сравнению с НАФ, конъюгаты КЗ и КС стимулируют выработку сравнимо высоких титров противочумных антител при меньшей антигенной нагрузке Ф1 в 11 и 2 раза соответственно. Известно, что НАФ является масляной эмульсией и в смеси с антигеном дает расслоение фаз. Это затрудняет его введение и ведет к перерасходу антигена.

Таким образом, полученные результаты подтверждают, что конъюгаты КЗ и КС с антигенами проявляют более высокие иммуногенные свойства, чем исходные антигены, не обладают вязкостью, стабильны, не вызывают местных и общих реакций, способны стимулировать выработку специфических антител при меньшей антигенной нагрузке и перспективны в иммунологической практике в качестве адъювантов при конструировании иммунобиологических препаратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дыкман Л.А., Богатырев В.А., Староверов С.А., Семенов С.В., изобретатели. Адъювант. Патент RU 2218937. 25 декабря 2003.
2. Дыкман Л.А., Богатырев В.А. Применение дот-анализа и иммунозолотых маркеров для экспресс-диагностики острых кишечных инфекций. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1999; 4:93–4.
3. Дальвадяц С.Н., Дубровин М.Ю., Бывалов А.А., Додонов Н.П., Чичерин Ю.В., Евстигнеев В.И., Пименов Е.В., Еремин С.А., Дятлов И.А., Кутырев В.В. Исследования по иммунизации против чумы. Сообщение 3. Ревакцинирующие свойства живой чумной вакцины и препаратов чумных химических вакцин для павианов гамадрилов. Пробл. особо опасных инф. 2005; 89(1):62–7.
4. Загоскина Т.Ю., Марков Е.Ю., Калиновский А.И.,

Голубинский Е.П. Использование специфических антител, меченных частицами коллоидного золота, для обнаружения антигенов бруцелл методом дот-иммуноанализа. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1998; 6:64–8.

5. Загоскина Т.Ю., Марков Е.Ю., Калиновский А.И., Голубинский Е.П. Обнаружение антигенов бруцелл с помощью частиц коллоидных металлов в качестве маркеров специфических антител. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2001; 3:65–9.

6. Инструкция по изготовлению и контролю капсульного антигена (Ф1) чумного микроба очищенного сухого. Саратов; 1990. 65 с.

7. Киреев М.Н., Гусева Н.П., Подборонова Н.А. и др. Тест-система для выявления антител к Ф1 чумного микроба у лабораторных животных. В кн.: Матер. VI Межгос. науч.-практ. конф. Волгоград, 2005. С. 246–247.

8. Киреев М.Н., Тараненко Т.М., Храмченкова Т.А. и др. Структурно-функциональные свойства препаратов капсульного антигена Ф1 в процессе хранения. Биотехнология. 2005; 5:41–3.

9. Медуницин Н.В. Вакцинология. М: Триада-Х; 2004. 448 с.

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

11. Полтавченко А.Г., Караваева В.С., Тузиков В.Ф. Использование золы серебра как маркеров иммуноанализа на микротитровальных планшетах. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1998; 2:108–11.

12. Петров Р.В. Иммунология. М.: Медицина; 1983. 368 с.

13. Староверов С.А., Ермилов Д.Н., Щербаков А.А. и др. Получение антител к антигенам *Yersinia pseudotuberculosis* с использованием в качестве адъюванта частиц коллоидного золота. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2003; 3:54–7.

14. Dykman L.A., Matora L.Yu., Bogatyrev V.A. Use of colloidal gold to obtain antibiotin antibodies. J. Microbiol. Meth. 1996; 24(3):247–8.

15. Frens G. Controlled nucleation for the particle size in monodisperse gold suspensions. Nature Phys. Sci. 1973; 241:20–2.

M.N.Kireev, T.A.Polunina, N.P.Guseva, N.A.Podboronova,
Ya.M.Krasnov, T.M.Taranenko

Studying the Immunogenic Properties of Plague Microbe Capsule Antigen F1 Conjugated with Nanoparticles of Colloid Gold and Silver

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Influence of nanoparticles of colloid gold (CG) and silver (CS) on immunobiological properties of antigens and possibility of their application as adjuvants for antibody formation stimulation were studied. It was shown that F1 capsule antigen of plague microbe conjugated with nanoparticles of CG and CS possesses more strongly expressed immunogenic properties than original F1 antigen independently of the way of injection. Gold and silver sols with antigens are stable, capable to stimulate specific antibody generation subject to less antigen burden, comfortable for use, do not cause general and local reactions. All these facts give the opportunity to use them in immunologic practice as adjuvants when engineering immunobiological preparations.

Key words: F1 capsule antigen, CG and CS nanoparticles, adjuvants.

Поступила 14.02.08.

С.П.Ярков, И.В.Шиленко, С.Н.Скопинская, В.Н.Злобин

КОМПЛЕКТ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ТОКСИНОВ ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫМ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ АНАЛИЗОМ

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения», Москва

Разработан иммунохроматографический анализ с люминесцентной детекцией для выявления бактерий, вирусов, токсинов и аппаратура для его проведения. Предлагаемый подход превышает по чувствительности выявления микроорганизмов и токсинов традиционный иммунохроматографический анализ, основанный на реакции антител, маркированных коллоидным золотом в несколько раз. На основе разработки предложен комплект иммунохроматографического люминесцентного анализа (КИЛ-1), который может быть рассмотрен как техническое средство для экспресс-анализа образцов, взятых из объектов внешней среды, для индикации биологических поражающих агентов в случае возникновения чрезвычайных ситуаций, связанных с террористическими актами, на транспорте и местах массового скопления людей, при скрининге почтовой корреспонденции, либо для облегчения идентификации биопатогенов после этапа биологического обогащения отобранных проб.

Ключевые слова: иммунохроматография с люминесцентной детекцией, бактерии, вирусы, токсины.

Риск возникновения чрезвычайных ситуаций, включающий вспышки особо опасных инфекций, достаточно высок. Это обусловлено не только наличием естественных резервуаров патогенных микроорганизмов, трансграничным переносом инфекций, но и возможностью террористических актов с применением биологических средств, авариями в научно-исследовательских институтах и на предприятиях по производству вакцин и сывороток [3]. Система государственного санитарно-эпидемиологического надзора обязана своевременно выявить, идентифицировать и организовать ликвидацию вспышки инфекционного заболевания. Арсенал методов индикации возбудителей заболеваний, имеющийся в настоящее время в распоряжении эпидемиологов, достаточно широк – от традиционных бактериоскопических и бактериологических методов, постановки биопроб на животных, до метода флуоресцирующих антител (МФА), реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА), полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Перечисленные выше методы индикации и идентификации микроорганизмов хорошо зарекомендовали себя на практике, но в то же время не лишены известных недостатков они занимают много времени – с учетом предварительного культурального обогащения пробы время индикации может достигать от 72 ч и более. Проведение индикации, как правило, проводится в лабораторных условиях. Для проведения иммунохроматографического анализа также необходим высококвалифицированный персонал [4].

Чувствительным, быстрым и специфичным методом идентификации микроорганизмов и токсинов, пригодным для применения в условиях небольших стационарных и мобильных лабораторий, а также в полевых условиях, является иммунохроматографический анализ.

Этим методом можно выявлять бактериальные вегетативные клетки, споры, вирусы, токсины, при анализе неизвестных порошков, смывов из окру-

жающей среды [6, 9, 10], а также идентифицировать культуры микроорганизмов, выращенных в бактериологической лаборатории, при анализе проб пищевых продуктов. Известны иммунохроматографические экспресс-тесты Singlepath и Duopath производства фирмы Merck (Германия) для выявления бактерий рода *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia coli* O157:H7 и веротоксинов энтерогеморрагических штаммов *E. coli* в пищевых продуктах и продовольственном сырье, водных объектах окружающей среды и биоматериале человека. Чувствительность определения составила для бактерий *Listeria monocytogenes* – 10^4 – 10^6 м.к./мл, бактерий рода *Salmonella* – 10^4 – 10^7 м.к./мл, *E. coli* O157:H7 – 10^4 – 10^7 м.к./мл [2].

Выпускается отечественная укладка иммунохроматографических индикаторных элементов «УИХЭ-1» (разработчик и производитель ФГУП ГосНИИ биологического приборостроения Федерального медико-биологического агентства) для выявления возбудителей чумы, туляремии, сапа, сибирской язвы и ботулинического токсина типа А в смывах из объектов внешней среды. Чувствительность индикации составляет $1 \cdot 10^5$ – $1 \cdot 10^6$ м.к./мл и 250 нг/мл ботулинического токсина типа А. Длительность анализа без учета времени пробоподготовки – 25–30 мин. Перечисленные выше иммунохроматографические технические средства имеют колориметрический принцип регистрации и основаны на применении золь коллоидного золота, используемых в качестве маркера антител. Вывод о наличии или отсутствии в пробе искомого биологического агента делается визуально, по наблюдению оператором ярко окрашенной вишнево-красной полосы в тестовом поле иммунохроматографического индикаторного элемента (ИИХЭ). Чувствительность колориметрических иммунохроматографических тестов близка к чувствительности РНГА и ТИФА, однако исключает такие стадии анализа, как сенсibilизация полистирольных планшетов, разведения пробы, промывки, термостатированные инкубации, внесе-

ние хромогенных субстратов и меченных ферментной меткой антител.

В то же время описаны методологические приемы [7, 11, 12], позволяющие многократно повысить чувствительность иммунохроматографического анализа за счет люминесцентного метода детекции, сохраняя такие достоинства иммунохроматографического анализа, как отсутствие многостадийности процедуры, применение минимума реагентов.

Целью данной работы было создание экспериментального образца носимого комплекта для проведения люминесцентного иммунохроматографического анализа, позволяющего выявлять антигены возбудителей особо опасных инфекций, бактериальные и растительные токсины в объектах окружающей среды при проведении работ в лабораторных и полевых условиях.

Материалы и методы

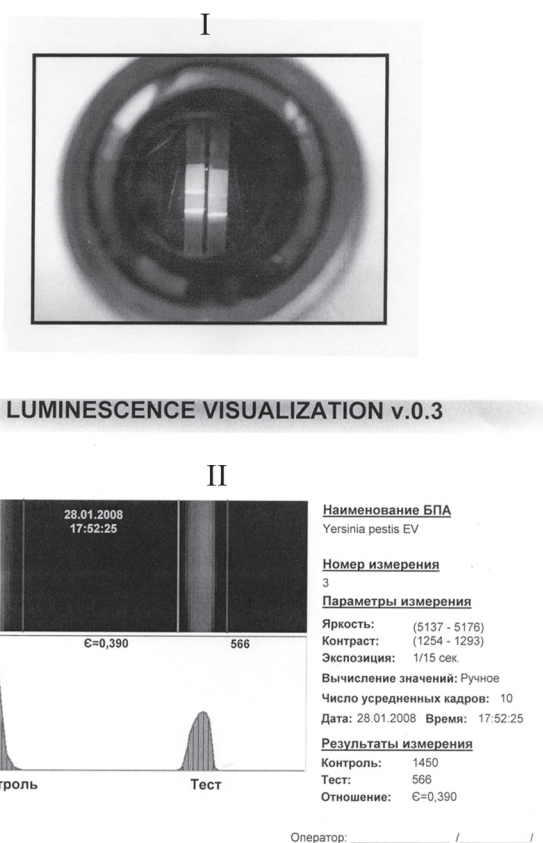
Принцип конструирования индикаторных иммунохроматографических элементов с люминесцентной детекцией сходен с таковым для иммунохроматографических индикаторных элементов с колориметрической детекцией [5]. Изготовление иммунохроматографических индикаторных элементов осуществляли согласно разработанной ранее схеме технологического процесса [1], с заменой подложки, пропитанной конъюгатом антител с коллоидным золотом, на подложку с конъюгатом антител с люминесцирующими латексами. Полученный мультимембранный композит помещали в пластиковые оправы и запаивали с осушителем в водогазонепроницаемые пластиковые пакеты. В качестве основы для получения конъюгата с поликлональными или моноклональными антителами против антигенов микроорганизмов использовали карбоксилированные латексы («Magsphere», США) диаметром 330 нм, окрашенные в массу флуоресцентным красителем. Конъюгаты люминесцирующих латексов с иммуноглобулинами получали химической сшивкой [8]. В работе использовали бычий сывороточный альбумин (БСА), калия карбонат, натрий фосфорнокислый однозамещенный безводный, калий фосфорнокислый 2-замещенный безводный и сахарозу («Sigma»), азид натрия («Merck»), твин-20 («Fluka»), антитела кроличьи антимышинные и антитела козы антикроличьи («Sigma»), мембраны для иммунохроматографии «Hi-Flow Plus HF120 или HF240» («Millipore»).

В качестве моделей возбудителей особо опасных инфекционных заболеваний использовали вакцинные штаммы возбудителя туляремии (штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ), чумы (штамм *Yersinia pestis* EV), спор сибирской язвы (штамм *Bacillus anthracis* СТИ), осповакцину, ботулинический анатоксин типа А, штаммы получены из ФГУН ГИСК им. Л.А.Тарасевича. Использовали также рекомбинантный антиген VP40 вируса лихорадки Эбола (штамм Заир), полученный из ГНЦ прикладной вирусологии и биотехнологии «Вектор»

Роспотребнадзора, стафилококковый энтеротоксин типа В, полученный из ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора и препарат рицина, выделенный из бобов *Ricinus communis* в ГосНИИ ОХТ Т.И.Новожиловой (Москва), препарат холерного экзотоксина и антисыворотка к нему были получены из РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов). В качестве моделей растворимых антигенов использовали внешние мембраны клеточных стенок, содержащих липополисахаридный антиген возбудителя туляремии штамм *F. tularensis* 543 (ЗАО «Институт инженерной иммунологии»), капсульный антиген Ф1 возбудителя чумы (РА «Эпидбиомед»). Моноклональные антитела и фракции иммуноглобулинов против указанных антигенов и клеток микроорганизмов получали в РА «Эпидбиомед» и ООО «Импакт», (Москва) ГНЦ «Вектор» Роспотребнадзора.

Для наблюдения результатов люминесцентного иммунохроматографического анализа нами сконструированы экспериментальные образцы приборов: регистратор люминесценции видеоцифрового «РЛВ-1» и устройство для визуализации люминесцентных иммунохроматограмм «УВ-1». В обоих приборах осуществляется освещение поля иммунохроматограммы светом светодиодов высокой яркости с максимумом длины волны 380 нм, более длинноволновая компонента излучения светодиода отсекается светофильтром УФС-5. Под действием ультрафиолетового излучения возбуждается люминесценция латексов в аналитической и контрольной зонах иммунохроматограмм. Свет эмиссии люминесценции проходит через стеклянный светофильтр ЖС-11 и поступает для последующей регистрации. В приборе УВ-1 люминесценция наблюдается визуально, при этом иммунохроматограммы анализируемой пробы и отрицательного контроля располагаются рядом, что облегчает сравнение оператором интенсивностей аналитических полос. В приборе РЛВ-1 применен видеоцифровой принцип получения изображения люминесцентной иммунохроматограммы с последующей обработкой сигнала специализированной программой LUM-VIS v 03, разработанной нами. Программа работает в среде операционной системы Windows XP на персональной ЭВМ типа «ноутбук». Электропитание прибора РЛВ-1 осуществляется от USB-порта компьютера, время непрерывной работы в автономном режиме не менее 2 ч. Общая масса прибора без компьютера составляет 545 г, габаритные размеры 120×80×96 мм. Интерфейс программы строит гистограммы люминесценции аналитической и контрольной зон, позволяет вычитать фоновые линии, сравнить интегральную интенсивность светимости этих зон и рассчитать отношение интегральной интенсивности люминесценции аналитической зоны к интегральной интенсивности люминесценции контрольной зоны ($Q = I_a/I_c$), при этом коэффициент вариации величины Q не превышает 1,5 %.

Для каждой партии люминесцентных иммунохроматографических элементов рассчитывали поро-



Люминесцентный хроматографический анализ:

I – внешний вид люминесцентных иммунохроматограмм клеток *Y. pestis* в концентрации 100 тыс. м.к./мл (иммунохроматограмма отрицательного контроля – справа), наблюдаемых оператором визуально, с помощью прибора УВ-1; *II* – распечатка результатов люминесцентного иммунохроматографического анализа клеток *Y. pestis* в концентрации 50 тыс. м.к./мл, осуществляемая регистратором люминесценции видеоцифровым – РЛВ-1

вое значение Q_n , которое характеризовало чувствительность данной партии по формуле:

$$Q_n = Q_{cp} + 2 \left[\frac{\sum (Q_i - Q_{cp})^2}{(n-1)} \right]^{0.5}$$

где: $Q_{cp} = \sum Q_i / n$ – среднее значение для иммунохроматограмм отрицательных контролей; Q_i – i -тое значение измеренного отрицательного контроля; n = 20–25 – количество измерений.

Если для образца, содержащего антигены микроорганизмов, измеренная величина

$Q > Q_n$, то результат анализа считали положительным, в том же случае, если $Q \leq Q_n$, то результат считали отрицательным.

Необходимо отметить, что при хорошей адаптации глаза оператора к условиям низкой освещенности результаты визуального и приборного методов наблюдения сигналов люминесценции при проведении иммунохроматографии практически не различались. На рисунке изображены результаты наблюдений люминесцентного иммунохроматографического анализа клеток возбудителя чумы штамм *Yersinia pestis* EV на приборах УВ-1 и РЛВ-1.

Результаты и обсуждение

Принцип достижения аналитического эффек-

та в иммунохроматографии на мембранах заключается в следующем. Жидкая проба, содержащая микроорганизмы, антигены или токсины наносится на пористую подложку, реагируя с антителами, конъюгированными с люминесцентными латексами. Образованный комплекс имеет люминесцентные свойства. Полученный иммунный комплекс под действием капиллярных сил током жидкости перемещается по нитроцеллюлозной мембране, достигает аналитической зоны, где происходит его иммобилизация на мембране за счет связывания с антителами аналитической зоны. В этой зоне образуется люминесцирующий «сэндвич» конъюгата люминесцирующих латексов, связанных с микробными клетками, и антител, иммобилизованных на мембране. Как правило, для аналитической зоны подбирают антитела к другим антигенным эпитопам инфекционного агента. Часть жидкой пробы продолжает перемещение по нитроцеллюлозной мембране, связываясь с антителами контрольной зоны. Наличие люминесценции в контрольной зоне косвенно указывает на иммунохимическую активность конъюгата. Это важно для валидации всего иммунохроматографического анализа, особенно после периода хранения ИИХЭ. Наличие на нитроцеллюлозной мембране двух люминесцирующих полос свидетельствует о присутствии в искомой пробе инфекционного агента. Наличие люминесценции лишь в контрольной зоне говорит об отсутствии искомого возбудителя и сохранности индикаторного реагента (конъюгата люминесцирующих латексов с антителами). Отсутствие люминесценции в обеих зонах указывает на непригодность ИИХЭ. Оптимум времени анализа достигался через 15–25 мин.

Нами созданы экспериментальные образцы люминесцентных ИИХЭ для выявления вегетативных и споровых форм микроорганизмов, растворимых антигенов, вирусов, токсинов. Сравнительная чувствительность люминесцентного и колориметрического иммунохроматографического анализа указанных объектов приведена в таблице. Для проведения корректного сравнения колориметрические ИИХЭ изготовлены из тех же партий антител и иммунохроматографических мембран, что и ИИХЭ с люминесцентной детекцией.

Люминесцентные ИИХЭ по чувствительности превосходили ИИХЭ с коллоидным золотом, особенно это хорошо видно на примере рицина, стафилококкового энтеротоксина типа В, растворимых антигенов микроорганизмов. Время анализа для обоих вариантов регистрации было примерно равным. ИИХЭ для возбудителей чумы, туляремии и сибирской язвы были специфичными по отношению к возбудителям особо опасных инфекционных заболеваний, а также по отношению к гетерологичным микроорганизмам (*Yersinia pseudotuberculosis* (I–IV серовара), *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Brucella abortus* 19BA, *Salmonella thyphi*, *Escherichia coli* HB101, *Vibrio cholerae* 569-B), взятым в концентрации 10^8 м.к./мл. ИИХЭ для выявления

**Сравнительная чувствительность ИИХЭ
с люминесцентной и колориметрической детекцией**

Наименование микроорганизма или токсина	Чувствительность иммунохроматографического анализа		Отношение чувствительностей люминесцентного и колориметрического анализа
	Люминесцентная детекция на приборе РЛВ-1	Колориметрическая визуальная детекция	
Возбудитель чумы, штамм <i>Y. pestis</i> EV, м.к./мл	$5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^5$	10
Ф1 антиген возбудителя чумы, нг/мл	0,5	5,0	10
Возбудитель сибирской язвы, штамм <i>B. anthracis</i> СТИ, м.к./мл	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$	10
Возбудитель туляремии, штамм <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ, м.к./мл	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	1
Внешние мембраны клеточных стенок <i>F. tularensis</i> , содержащие ЛПС-антиген, нг/мл	0,5	15,0	30
Вирус осповакцины, ООЕ/мл	$1 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$	5
Антиген VP40 вируса возбудителя лихорадки Эбола, нг/мл	100,0	250,0	2,5
Ботулинический анатоксин типа А, эквивалентный MLD ₅₀ /мл	150,0	300,0	2
Стафилококковый энтеротоксин типа В, нг/мл	10,0	30,0	3
Холерный экзотоксин, нг/мл	500,0	1000,0	2
Рицин, нг/мл	10,0	250,0	25

Примечание. MLD₅₀/мл – доза токсина, приводящая к 50 % смертности популяции белых мышей, пораженных токсином.

ботулинического анатоксина типа А не давали перекрестных реакций с дифтерийным и столбнячным анатоксинами, а также ботулиническими анатоксинами типов В, С, D, E. Наличие 1 мг/мл пыли в исследуемых суспензиях микроорганизмов и токсинов не влияло на чувствительность анализа. ИИХЭ были работоспособны при плюсовых температурах от 10 до 35 °С, и сохраняли свои свойства при комнатной температуре в течение года.

На основе сконструированных ИИХЭ с люминесцентной детекцией и приборов РЛВ-1 и УВ-1 создан экспериментальный образец комплекта иммунохроматографического люминесцентного – КИЛ-1. Иммунохроматографические индикаторные элементы помещены в водонепроницаемый корпус, изготовленный из ударопрочного поливинилхлорида размерами 400×450×190 мм, устойчивого к дезинфекции 70 % раствором этилового спирта, дезинфекционного средства «Тримецид», 3 % перекиси водорода в сочетании с 1 % раствором ПАВ типа «Лотос». Масса комплекта не превышает 6,0 кг.

Помимо люминесцентных ИИХЭ, для анализа проб, содержащих патогены, в комплект входит прибор РЛВ-1, портативный компьютер, буферы ана-

лиза, приспособления для отбора проб (стерильные тампоны, пробирки, 0,9 % раствор натрия хлорида), люминесцентные ИИХЭ для выработки навыков работы, пакеты для сбора биологических отходов и их автоклавирования, перчатки, ножницы, пинцеты. Как вариант комплектации прибор РЛВ-1 может быть заменен на прибор визуального наблюдения УВ-1. Комплект КИЛ-1 может быть перевозиться в транспортной таре любым видом транспорта.

Комплект иммунохроматографического люминесцентного анализа (КИЛ-1) может быть рассмотрен как техническое средство для экспресс-анализа образцов, взятых из объектов внешней среды, для выявления биологических поражающих агентов в случае возникновения чрезвычайных ситуаций, связанных с террористическими актами, на транспорте и местах массового скопления людей, при скрининге почтовой корреспонденции, либо для облегчения идентификации биопатогенов после этапа биологического обогащения отобранных проб.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бызова Н.А., Ярков С.П., Злобин В.Н. и др. Физиология и патология иммунной системы. 2005; 9(8):41–5.
2. Методы выявления патогенных микроорганизмов с использованием иммунохроматографических экспресс-тестов производства Merck (Германия): методические рекомендации. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России; 2004. 23 с.
3. Онищенко Г.Г., Кутиров В.В. Пробл. особо опасных инф. 2007; 94(2):5–10.
4. Онищенко Г.Г., редактор. Организация ликвидации медико-санитарных последствий биологических, химических и радиационных террористических актов: практическое руководство. М.: ФГУ «ВЦМК «Защита»; 2005. 328 с.
5. Ярков С.П., Третьяков С.И., Баширова Л.А. и др. Вестник РАМН. 2007; 12:22–6.
6. Aidoo S., Ampofo W.K., Brandful J.A.M., et al. J. Clin. Microbiol. 2001; 39(7):2572–75.
7. Alivisatos P. Nature Biotechnology. 2004; 22(1):47–52.
8. Birnbaum S., Uden C., Magnusson C. G. M., et al. Anal. Biochem. 1992; 206:168–71.
9. Chanteau S., Rahalison I., Rarsitorahina M., et al. J. Med. Microbiol. 2000; 290(3):274–83.
10. King D., Luna V., Cannons A., Cattani J., et al. J. Clin. Microbiol. 2003; 41:3454–55.
11. Linderfelt B.M., Matoussi H., Goldman E.R. Anal. Chem. 2003; 75:4043–49.
12. Niedbala R.S., Feindt H., Kardos K., et al. Anal. Biochem. 2001; 293(1):22–30.

S.P.Yarkov, I.V.Shilenko, S.N.Skopinskay, V.N.Zlobina

The Set for Detection of Etiological Agents of Particularly Dangerous Infectious Diseases and Toxins by Means of Luminescent Immunochromatographic Analysis

State Research Institute of Biological Instrument Construction, Moscow

Immunochromatographic analysis with luminescent detection for indication of bacteria, viruses and toxins and apparatus for its carrying out were developed. The suggested approach is several times more sensitive as regards microorganisms and toxins detection than the traditional immunochromatographic analysis which is based on the reaction of antibodies marked by colloidal gold. The set for immunochromatographic luminescent analysis (SIL-1) was offered on the basis of this elaboration. It can be considered as technical instrument for express analysis of environmental samples, for indication of biological affecting agents in case of emergency situations (terrorist attacks on transport and in populated area), for screening of mail, or facilitation of biopathogen identification after the stage of biological enrichment of selected samples.

Key words: immunochromatography with luminescent detection, bacteria, viruses, toxins.

Поступила 11.02.08.

Т.А.Кондратенко, Л.Ф.Дузь, Н.Г.Тютюнькова, Ю.А.Пономарева**СОСТОЯНИЕ И ТЕНДЕНЦИИ ОБЩЕЙ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ НАСЕЛЕНИЯ,
ПРОЖИВАЮЩЕГО В ГОРОДАХ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ***ГОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет
Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»*

Для реализации национального проекта «Здоровье» необходима четкая, объективная информация, отражающая состояние здоровья населения, проживающего на определенной территории. С этой целью изучено состояние здоровья населения, проживающего в городах РО для выявления приоритетных неинфекционных заболеваний, реально влияющих на показатели общей заболеваемости населения. Полученные результаты позволят скорректировать лечебно-профилактические мероприятия на догоспитальном этапе, разработать и принять управленческие решения, направленные на выявление, лечение больных с указанными патологиями на догоспитальном этапе и их профилактику у лиц, входящих в группы риска.

Ключевые слова: общая заболеваемость, неинфекционная патология.

В рамках национального проекта «Здоровье» поставлена задача улучшения состояния здоровья населения Российской Федерации – снижение смертности, инвалидности, заболеваемости, увеличение рождаемости. Для реализации национального проекта выделены три приоритетных направления: развитие первичной медицинской помощи; развитие профилактического направления медицинской помощи; обеспечение населения высокотехнологической медицинской помощью [3, 4].

С целью разработки управленческих решений, направленных на совершенствование системы здравоохранения в Ростовской области (РО), нами проведен анализ динамики общей заболеваемости населения, проживающего в городах (16 административных единиц) в территориально-временном аспекте.

Цель исследования – выявление приоритетных соматических заболеваний свойственных конкретной территории. Для решения поставленной задачи проведен анализ общей заболеваемости населения по 73 нозологическим формам за период с 1998 по 2006 год по данным медицинского информационно-аналитического центра МЗ РО.

Установлено, что за изучаемый период в среднем на долю неинфекционных заболеваний приходится до 98,0 % от общей заболеваемости, 2,0 % – инфекционной.

Неинфекционная патология является ведущей в структуре общей заболеваемости в городах РО, поэтому необходимо определить за счет каких заболеваний идет рост показателя общей заболеваемости в каждом городе области.

В результате анализа по 73 нозологическим формам выявлено, что в г. Азове отмечен достоверный рост показателей общей заболеваемости по 37 нозологическим формам, в Батайске – по 57, в Б. Калитве – по 32, в Волгодонске – по 43, в Гуково – по 30, в Донецке – по 40, в Зверево – по 49, в Каменск-Шахтинский –

по 23, в Кр. Сулин – по 34, в Миллерово – по 25, в Новочеркасске – по 41, в Новошахтинске – по 35, в Ростове-на-Дону – по 44, в Сальске – по 27, в Таганроге – по 39, а в Шахты – по 48 нозологическим формам.

При выявлении ведущей патологии установлено, что в 9 городах из 16 приоритетной патологией можно считать хроническую обструктивную легочную и бронхоэктатическую болезни. Так, за 9 лет (с 1998 по 2006 год) показатель общей заболеваемости (на 1000 нас.) по этой нозологии увеличился в городах: Новочеркасске в 10,0 раз (с 0,3 до 3,0), в Каменск-Шахтинский в 17,5 раза (с 0,04 до 0,7), в Кр. Сулин в 73,3 раза (с 0,03 до 2,2), в Азове в 83,3 раза (с 0,06 до 5,0), в Таганроге в 85 раз (с 0,1 до 8,5), в Зверево в 130,0 раз (с 0,08 до 10,4), в Шахты в 160 раз (с 0,09 до 14,4), в Миллерово в 200 раз (с 0,03 до 6,0), а в Новошахтинске в 406,7 раза (с 0,03 до 12,2).

В таких городах как Ростов-на-Дону и Гуково наиболее резко отмечено увеличение показателя общей заболеваемости за счет различных форм острой ишемической болезни сердца, в Ростове-на-Дону в 8,3 раза (с 0,4 до 3,3), а в Гуково в 70,0 раз (с 0,03 до 2,1). В Б. Калитва приоритетной патологией можно считать «патологию беременных, родов и послеродового периода», так как показатель по этой нозологии вырос в 5,4 раза (с 2,9 до 15,8). В Сальске наиболее резко вырос показатель общей заболеваемости по нозологии «хронический отит» в 12,5 раза (с 2,0 до 25,1). В Донецке наиболее резко увеличился показатель общей заболеваемости по нозологии «эпилепсией, эпилептический статус» выросли в 9,3 раза (с 0,3 до 2,8).

Показатель общей заболеваемости в Батайске вырос за счет заболеваний предстательной железы в 17,2 раз (с 0,6 до 10,3), а в Волгодонске – отмечается резкое увеличение показателя общей заболеваемости по отдельным нарушениям, вовлекающим иммунный

механизм в 175,6 раза (с 0,09 до 15,8).

Следующим этапом работы было определение тенденции течения эпидемического процесса общей заболеваемости за 9 лет в городах РО. Показатели общей заболеваемости в 1998 г. в городах РО были взяты за базовую основу.

В результате проведенного исследования установлено, что в 12 городах РО (Азов, Батайск, Б. Калитва, Волгодонск, Донецк, Зверево, Миллерово, Новочеркасск, Ростов, Сальск, Таганрог, Шахты) отмечена тенденция к росту показателей общей заболеваемости и лишь в 4 городах (Гуково, Каменск-Шахтинский, Кр. Сулин, Новошахтинск) – к снижению. В то же время по области в целом отмечена тенденция к росту показателей общей заболеваемости, причем в районах области рост показателей более существенный, что подтверждается тем, что в городах РО прирост показателей составил 125,66 %, а в районах области – 133,79 % за 9 лет.

Таким образом, в структуре общей заболеваемости на долю неинфекционной патологии в РО приходится 98,0 %. В 12 городах РО выявлена тенденция к росту общей заболеваемости и лишь в 4 – к сниже-

нию. Во всех городах РО отмечен достоверный рост показателей общей заболеваемости по 23–57 нозоформам. Приоритетным неинфекционным заболеванием, характерным для жителей городов РО, можно считать хроническую обструктивную легочную и бронхоэктатическую болезни, так как в 9 городах РО показатель общей заболеваемости по этой нозологии значительно вырос.

T.A.Kondratenko, L.F.Duz', N.G.Tyutyun'kova,
Yu.A.Ponomareova

**State and Tendencies of General Disease Incidence
of the Population Living in the Cities of Rostov Region**

Rostov-on-Don State Medical University

Health of the population living in the cities of Rostov region was studied to detect priority non-infectious diseases really influencing the characteristics of general disease incidence of the population. These findings allow to correct therapeutic and prophylactic measures in pre-admission stage, to work out and take administrative decisions aimed at detection and treatment of patients with stated pathologies in pre-admission stage and prophylaxis among people included in risk groups.

Key words: general morbidity, non-infectious pathology.

Поступила 01.10.07.

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 обзоров – 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