

# 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,  
в которых должны быть опубликованы  
основные научные результаты диссертаций*

**Выпуск 95**

**1 · 2008**

**САРАТОВ**

10005, Саратов,  
ул. Университетская, 46  
Тел. (845-2) 51-82-22  
Факс (845-2) 51-52-12  
E-mail: [microbe@san.ru](mailto:microbe@san.ru)  
[www.microbe.ru](http://www.microbe.ru)

**Зав. редакцией Л.С.Пронина**

Тел. (845-2) 51-82-22

Редактор *Л.С.Пронина*

Технический редактор  
*Т.К.Меркулова*

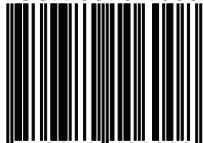
Перевод на английский  
*Е.В.Самойловой,*  
*Н.А.Савиновой*

Подписано в печать 25.03.08.  
Формат 60×88 1/8.  
Бумага офсетная.  
Печать офсетная.  
Гарнитура Таймс.  
Усл. печ. л. 8,9.  
Заказ 250

Подписной индекс – 24687

ISSN 0370-1069. Пробл. особо  
опасных инф. 2008. Вып. 95. 1–62

ISSN 0370-1069



9 770370 106008 >

Отпечатано в ООО «ИППОЛит-XXI век».  
410012, Саратов, Б. Казачья, 79/85

## 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,  
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 (Оболенск),  
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

## Обзоры

Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Антоненко А.Д., Бейер А.П., Грижебовский Г.М., Ковальчук И.В., Чумакова И.В., Сысолятина Г.В., Земцов Е.В., Ковалев Н.Г. Актуальные вопросы эпиднадзора за Крымской геморрагической лихорадкой ..... 5

Львов Д.К., Савченко С.Т., Алексеев В.В., Липницкий А.В., Пашанина Т.П. Эпидемиологическая ситуация и прогноз заболеваемости лихорадкой Западного Нила на территории Российской Федерации ..... 10

Попов Н.В., Безсмертный В.Е., Новиков Н.Л., Удовиков А.И., Кузнецов А.А., В.П. Попов, Шилова Л.Д., Кутырев В.В. Прогноз эпизоотической активности природных очагов чумы Российской Федерации на 2008 г. .... 13

## Эпидемиология

Андаев Е.И., Мельникова О.В., Титенко А.М. Санитарная охрана территории от завоза и распространения особо опасных вирусных инфекций. Сообщение 5. Лихорадка Ласса ..... 17

Москвитина Э.А. Современные тенденции в развитии седьмой пандемии холеры ..... 22

Никитин А.Я., Корзун В.М., Токмакова Е.Г., Базанова Л.П. Асимметрия в проявлении билатеральных морф как индикатор характера взаимоотношений блох с возбудителем чумы ..... 26

Попов Н.В., Санджиев В.Б.-Х., Сангаджиева Г.В., Удовиков А.И., Яковлев С.А., Караваяева Т.Б., Подсвиров А.В., Кутырев В.В. Влияние современного потепления климата на развитие нового межэпизоотического периода Прикаспийского Северо-Западного степного природного очага чумы ..... 31

## Микробиология и диагностика

Бактеева И.В., Дентовская С.В., Панферцев Е.А., Светоч Т.Э., Кравченко Т.Б., Платонов М.Е., Титарева Г.М., Комбарова Т.И., Иванов С.А., Анисимов А.П. Вирулентность для мышей рН 6<sup>+</sup> и рН 6<sup>-</sup> штаммов *Yersinia pestis* ..... 34

Ерошенко Г.А. Основные направления современных исследований биологии холерных вибрионов ..... 37

Малиукова Т.А., Костиукова Т.А., Головки Е.М., Ляпин М.Н., Щербаклова С.А., Плотникова Е.А., Найденова Е.В. Подготовка материала, отобранного в сопряженных очагах чумы и арбовирусных инфекций, к проведению иммунологического исследования. Сообщение 2 ..... 41

Терешкина Н.Е., Девдариани З.Л. Современное состояние проблемы иммунодетекции возбудителя сибирской язвы ..... 44

Чеботарев Е.В., Бывалов А.А., Зайцева Н.Н., Роман В.В., Кожемяко А.В. Кислородзависимое восстановление жизнеспособности *Yersinia pestis* ..... 46

## Review

Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Antonenko A.D., Beier A.P., Grizhebovsky G.M., Kovalchuk I.V., Chumakova I.V., Sysolyatina G.V., Zemtsov E.V., Kovalev N.G. Topical Questions Concerning Crimean Haemorrhagic Fever Surveillance

L'vov D.K., Savchenko S.T., Alekseev V.V., Lipnitsky A.V., Pashanina T.P. Epidemiological Situation and Prognostication of the West Nile Fever Morbidity in the Territory of the Russian Federation

Popov N.V., Bezsmertny V.E., Novikov N.L., Udovikov A.I., Kouznetsov A.A., Popov V.N., Shilova L.D., Kutyrev V.V. Prognostication of Epizootiologic Activity of Plague Natural Foci in the Russian Federation for 2008

## Epidemiology

Andayev E.I., Melnikova O.V., Titenko A.M. Sanitary Protection of a Territory from Importation and Dissemination of Particularly Dangerous Viral Infections. Communication 5. Lassa Fever

Moskvitina E.A. Current Trends in the Evolution of the Seventh Cholera Pandemics

Nikitin A.Ya., Korzun V.M., Tokmakova E.G., Bazanova L.P. Asymmetry in the Expression of Bilateral Morphs as an Indicator Showing the Character of Interrelations Between Fleas and the Plague Pathogen

Popov N.V., Sandzhiev V.-B.-Kh., Sangadzhieva G.V., Udovikov A.I., Yakovlev S.A., Karavaeva T.B., Podsvirov A.V., Kutyrev V.V. The Impact of the Present-Day Climate Warming upon the Evolution of the New Inter-Epidemic Period in the Pre-Caspian North-Western Steppe Natural Plague Focus

## Microbiology and Diagnostics

Bakhteyeva I.V., Dentovskaya S.V., Panfertsev E.A., Svetoch T.E., Kravchenko T.B., Platonov M.E., Titareva G.M., Kombarova T.I., Ivanov S.A., Anissimov A.P. Virulence for Mice of pH6<sup>+</sup> and pH6<sup>-</sup> *Yersinia pestis* Strains

Yeroshenko G.A. Main Trends of the Up-to-Date Research of Cholera Vibrios Biology

Maliukova T.A., Kostiukova T.A., Golovko E.M., Lyapin M.N., Shcherbakova S.A., Plotnikova E.A., Naidenova E.V. Preparation of the Materials, Sampled in Combined Foci of Plague and Arbovirus Infections, for Immunologic Assaying. Communication 2

Tereshkina N.E., Devdariani Z.L. Present Status of the Anthrax Pathogen Immunodiagnosis

Chebortaryov E.V., Byvalov A.A., Zaitseva N.N., Roman V.V., Kozhemyako A.V. Oxygen-Dependent Recovery of *Yersinia pestis* Viability

### Биотехнология

**Волох О.А., Шепелёв И.А., Заднова С.П., Крепостнова И.М., Еремин С.А.** Изучение биокинетических особенностей и оптимизация условий культивирования штаммов холерного вибриона – продуцентов протективных антигенов, перспективных для внедрения в производство ..... 52

**Горяев А.А., Щелканова Е.Ю., Лозовский Ю.В., Тучков И.В., Смирнова Н.И.** Конструирование штамма *Vibrio cholerae* биовара эльтор гиперпродуцента холерного токсина II типа и определение оптимальных условий для продукции этого белка ..... 56

### Краткие сообщения

**Наркайтис Л.И., Данилов А.Н., Яшечкин Ю.И., Куклев Е.В., Кожанова О.И., Минаева М.Е., Елисеев Ю.Ю.** Прогнозирование заболеваемости населения Саратова кишечными инфекциями с водным путем передачи ..... 59

### Юбилеи

К 65-летию со дня рождения Юрия Михайловича Федорова ..... 61

К 75-летию со дня рождения Любови Владимировны Самойловой ..... 61

### Памяти коллег

Памяти Евгения Павловича Голубинского (1934–2008) ..... 62

### Biotechnology

**Volokh O.A., Shepelev I.A., Zadnova S.P., Krepostnova I.M., Yeremin S.A.** A Study of Biokinetic Peculiarities and Optimization of the Conditions for Culturing *Vibrio cholerae* Strains Overproducing Protective Antigens Suitable for Use in the Production ..... 52

**Goryaev A.A., Shchelkanova E.Yu., Lozovsky Yu.V., Touchkov I.V., Smirnova N.I.** Construction of an El Tor Biovariant *Vibrio cholerae* Strain Capable of Type II Cholera Toxin Hyperproduction and Determining the Optimal Conditions for the Production of This Protein ..... 56

### Brief Communication

**Narkaitis L.I., Danilov A.N., Yashechkin Yu.I., Kouklev E.V., Kozhanova O.I., Minaeva M.E., Yeliseev Yu.Yu.** Forecasting of Morbidity of the Enteric Infections with Water-Borne Transmission for the Population of Saratov ..... 59

### Anniversaries

To the 65-th anniversary of Yuriy Mikhailovich Feodorov ..... 61

To the 75-th anniversary of Liubov Vladimirovna Samoilova ..... 61

### Revering the Memory of the Colleagues

Revering the memory of Eugeny Pavlovich Golubinskiy (1934–2008) ..... 62

УДК 616.988.26:616.9-036.2

А.Н.Куличенко<sup>1</sup>, О.В.Малецкая<sup>1</sup>, А.Д.Антоненко<sup>2</sup>, А.П.Бейер<sup>1</sup>, Г.М.Грижебовский<sup>1</sup>, И.В.Ковальчук<sup>3</sup>,  
И.В. Чумакова<sup>1</sup>, Г.В.Сысолятина<sup>3</sup>, Е.В.Земцов<sup>4</sup>, Н.Г.Ковалев<sup>3</sup>

## АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ЭПИДНАДЗОРА ЗА КРЫМСКОЙ ГЕМОМРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКОЙ

<sup>1</sup>Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт,

<sup>2</sup>Ставропольская государственная медицинская академия, <sup>3</sup>Управление Роспотребнадзора по Ставропольскому краю, <sup>4</sup>ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ставропольском крае»

В 2007 г. на территории Южного федерального округа отмечено дальнейшее увеличение заболеваемости КГЛ. Причиной этого является, прежде всего, увеличение численности клещей *H. marginatum*. Существующая эпидемиологическая ситуация позволяет считать прогноз по КГЛ на 2008 г. неблагоприятным. В статье изложены мероприятия, необходимые для обеспечения эпидблагополучия по КГЛ, прежде всего, проведение акарицидных обработок скота до начала массовой активности клещей и регистрации первых больных.

*Ключевые слова:* Крымская геморрагическая лихорадка, эпидобстановка, эпизоотологическое наблюдение, *Hyalomma marginatum*, профилактические мероприятия.

На территории Южного федерального округа (ЮФО) заболевания Крымской геморрагической лихорадкой (КГЛ) известны с конца 40-х гг. XX столетия [6, 12]. Нозоареал инфекции, этиологически связанный с вирусом Конго-Крымской геморрагической лихорадки (ККГЛ), практически полностью расположен в пределах ареала клещей *Hyalomma marginatum Koch, 1844*, хотя представители некоторых других видов семейства *Ixodidae* также принимают участие в циркуляции этого вируса [2, 4, 9, 16, 20, 27, 29, 34]. Так, например, на территории Ставропольского края антиген вируса ККГЛ обнаружен у девяти видов иксодид, тем не менее, наибольшие показатели инфицирования имеют *H. marginatum* и *Dermacentor marginatus*, что подтверждает их ведущую роль в сохранении потенциала природного очага [11]. Единый природный очаг КГЛ занимает обширную территорию ЮФО, находится в условиях амплитуды тепловых условий от 3000 до 5000 °С (по сумме эффективных температур) в зоне сухих степей восточно-европейского типа и примыкающих к ним полупустынных ландшафтах казахстанского типа, лесостепей и предгорий [2, 3, 7, 23, 25, 30, 31]. Активность природного очага поддерживается за счет циркуляции вируса между иксодовыми клещами и их теплокровными прокормителями (зайцы, ежи и т.п.). Установлена ведущая роль птиц семейства врановых (грачи) как прокормителей личиночных и нимфальных фаз клещей и их участие в распространении переносчиков на большие расстояния [5, 8, 15, 19, 21].

Проблема КГЛ приобрела особую актуальность для региона ЮФО с 1999 г. после активизации природного очага этой инфекции [25] с практически ежегодным ростом заболеваемости в отдельных субъектах.

Если в 1999 г. заболевания регистрировались на территории трех субъектов (Астраханская и

Ростовская области, Ставропольский край), то к 2004 г. случаи КГЛ имели место уже в Республиках Калмыкия, Дагестан и Ингушетия, а также в Волгоградской области. Заносы инфекции выявлены в Карачаево-Черкесской республике (из Ставропольского края) и в Москве (из Республики Ингушетия). В шести субъектах округа с 2001 г. (Республики Калмыкия и Дагестан, Астраханская, Ростовская и Волгоградская области, Ставропольский край) заболевания регистрируются ежегодно. К этому можно добавить, что антиген вируса ККГЛ в последние годы выявляется в полевом материале на территории Карачаево-Черкесской и Кабардино-Балкарской республик, а также Краснодарского края. Как следует из табл. 1, наиболее неблагополучными по количеству заболеваний являются Республика Калмыкия, Ставропольский край, Астраханская, Ростовская и Волгоградская области.

Всего за 9 лет (с начала активизации очага) заболели 1004 человека, у 48 (4,8 %) заболевание закончилось летальным исходом. В 2007 г. зарегистрированы 234 лабораторно подтвержденных случая КГЛ, что на 17 % больше по сравнению с 2006 г. Наибольшее количество больных выявлено в Республике Калмыкия (64), Ставропольском крае (63), Ростовской (53) и Волгоградской (30) областях. Однако по показателю на 100 тыс. населения заболеваемость КГЛ в Республике Калмыкия (22,0) существенно выше, чем в других неблагополучных по этой инфекции субъектах Российской Федерации, и превышает в 18,3 раза заболеваемость в Ростовской области (1,2), в 11 раз – в Астраханской области (2,0) и в 9,4 раза – в Ставропольском крае (2,35).

На фоне повышения заболеваемости повсеместно увеличилось количество клинических форм без геморрагического синдрома – 66,7 % (2006 г. – 56 %). В работах, посвященных изучению клиниче-

Заболееваемость Крымской геморрагической лихорадкой в субъектах РФ с 1999 по 2007 год

Субъект РФ	Количество случаев заболевания / летальных по годам									Всего / летальных
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	
Республика Калмыкия	–	8	3	13	23	15/2	38/2	69/2	64/1	233/7
Республика Дагестан	–	6/2	10	7	3	1	3	3	2	35/2
Ставропольский край	10/3	48/3	21/1	54/3	30/2	41/4	38	41/1	63	346/17
Астраханская область	1	5/1	11	13	9/1	4	37/1	16/1	20	116/4
Волгоградская область	–	18/2	9/2	3	3	2	6	16	30/1	87/5
Ростовская область	27/6	–	5	7	9	9	16/1	55/1	53/1	181/8
Республика Ингушетия	–	–	–	–	–	4/3	–	–	1/1	5/3
Карачаево-Черкесская республика	–	–	–	–	–	–	–	–	1	1
<i>Итого</i>	38/9	85/8	59/3	97/3	77/3	76/9	138/4	200/5	234/4	1004/45

ских особенностей КГЛ в прошлом столетии, отсутствие геморрагического синдрома наблюдали только у 10–15 % больных с лабораторно подтвержденным диагнозом [13, 17, 18, 32]. Поскольку циркулирующие на различных территориях Юга России географические варианты вируса ККГЛ (выделенные в 1967 и 2000 гг.) однотипны и очень близки генетически [28, 33], увеличение количества больных КГЛ без геморрагического синдрома может быть связано, скорее всего, с повышением диагностических возможностей лабораторной базы, а также готовности и настороженности медицинского персонала лечебно-профилактических учреждений к выявлению случаев заболевания.

В 2007 г. обострилась обстановка по КГЛ в Волгоградской области и Ставропольском крае, где произошло увеличение заболеваемости в 1,9 и 1,5 раза, соответственно, по сравнению с 2006 г. При этом сезонность заболеваемости во всех субъектах, эндемичных по КГЛ, в целом соответствовала многолетней. Пик заболеваемости пришелся на июнь (61,1 %). В апреле (0,4 %) и мае (15 %) количество больных было меньше, чем в эти месяцы предыдущего года (3,5 и 20,5 %), что связано, по-видимому, с холодной весной 2007 г., а с июня по сентябрь показатели заболеваемости были выше, чем в соответствующие месяцы 2006 г. Случаи заболевания отмечены и в первой декаде сентября (1,3 %) в отличие от предыдущего года, что обусловлено чрезмерно жарким и сухим летом. Таким образом, погодноклиматические условия в определенной мере влияют на распределение случаев заболевания КГЛ в течение эпидемического сезона.

Несомненен вывод, что значительную роль в увеличении статистических показателей заболеваемости КГЛ имеют повышение уровня организации и эффективности эпидемиологического надзора на территории природного очага [22], а также улучшение выявляемости больных за счет качественной диагностики и раннего обращения укушенных клещами людей в лечебные учреждения, благодаря активно проведенной информационно-разъяснительной работе. Так, если в Ставропольском крае в связи с

укусами клещами в 1999 г. обратился только 31 человек, то в 2007 г. их число достигло 8223. В пользу достаточно высокого квалификационного уровня специалистов и готовности лечебно-профилактической базы свидетельствует отсутствие летальных исходов в Ставропольском крае. В целом на территории округа количество летальных случаев в 2007 г. снизилось относительно 2006 г. и составило 1,7 %, в то время как в 1999 г., когда впервые после длительного перерыва вновь активизировался очаг КГЛ, летальность составляла 23,7 % в ЮФО и 33 % в Ставропольском крае [23]. Вполне обоснованы предположения о том, что уровень инфицирования населения вирусом ККГЛ на территории ЮФО ранее в действительности был выше официально регистрируемых показателей, поскольку в ряде случаев не удавалось лабораторными методами достоверно подтвердить диагноз и, следовательно, зарегистрировать заболевание [10]. Следует отметить также, что уменьшается доля тяжелых форм заболевания. В Ставропольском крае она составила 7,9 % в 2007 г. против 9,7 % в 2006 г. В целом по округу этот показатель в 2007 г. был 15,8 % против 26,5 % в 2006 г. Наибольшее количество тяжелых случаев заболевания в 2007 г. наблюдалось в Республике Калмыкия – 23,4 % (табл. 2), однако, доля тяжелых форм здесь несколько снизилась по сравнению с 2006 г. (26,1 %). В Ростовской области также удельный вес тяжелых форм относительно других субъектов был высоким (20,7 %), но ниже, чем в 2006 г. (25,4 %).

Своевременно проведенные противоэпидемические мероприятия в очагах КГЛ позволили практически не допустить повторных случаев и групповой заболеваемости. Лишь в Ставропольском крае и в Республике Калмыкия отмечены по одному очагу с двумя больными, во всех остальных случаях регистрировались по одному больному, преимущественно в семейных очагах (92,7 %).

Анализ эпидемиологической обстановки по КГЛ на примере Ставропольского края, проведенный специалистами ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» и Управления Роспотребнадзора по Ставропольскому

Таблица 2

Распределение больных КГЛ по клиническим формам и тяжести течения заболевания в субъектах РФ в 2007 г.

Субъект РФ	Число больных	Клинические формы				Тяжесть клинического течения					
		без геморрагического синдрома		с геморрагическим синдромом		тяжелая		средней тяжести		легкая	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Ростовская область	53	42	79,2	11	20,8	11	20,7	10	18,8	32	60,5
Астраханская область	20	8	40,0	12	60,0	2	10,0	18	90,0	0	0
Волгоградская область	30	19	63,4	11	36,6	2	6,6	27	90,0	1	3,3
Республика Калмыкия	64	43	67,2	21	32,8	15	23,4	49	76,6	-	-
Ставропольский край	63	42	66,7	21	33,3	5	7,9	54	85,7	4	6,4

краю, позволил прийти к выводу, что основными причинами этого являются увеличение численности клещей *H. marginatum*, вследствие благоприятных погодных-климатических условий в течение двух последних лет, а также несвоевременные и вследствие этого малоэффективные акарицидные обработки сельскохозяйственных животных общественного и особенно частного сектора и уменьшение площади земель, подлежащих распашке.

В марте – апреле 2007 г., когда наблюдается массовый выход имаго *H. marginatum*, заклещевленность скота ими, в частности, в Ставропольском крае и в Волгоградской области была выше в 1,3 раза по сравнению с прошлым годом, а средний сезонный показатель в 2007 г. в Ставропольском крае в 1,56 раз превысил показатель 2006 г. и был самым высоким за время наблюдения за природным очагом КГЛ в крае, а в Волгоградской области – выше на 18 % и самым высоким с 2001 г. (только в 2000 г. – показатель был выше и составил 1,4). В Астраханской области в марте заклещевленность скота была в 10 раз, а в апреле в 1,9 раз выше, чем в 2006 г., средний сезонный показатель превысил показатель предыдущего года в 1,7 раз. Все это свидетельствует о несвоевременности проведения акарицидных обработок.

Сроки проведения мероприятий по снижению численности переносчиков вируса ККГЛ являются одной из основных проблем в системе профилактических мероприятий. Хотя, по данным отдела ветеринарии Министерства сельского хозяйства Ставропольского края, акарицидными обработками были охвачены 150,3 % крупного и 60 % мелкого рогатого скота, в крае в 2007 г. произошло увеличение численности *H. marginatum* и заклещевленности скота по сравнению с предыдущим годом. Увеличение этих показателей отмечалось также в Астраханской области, где обработаны 36 % крупного и 8 % мелкого рогатого скота, на что были выделены 241,4 тыс. руб., и в Волгоградской области, где на проведение профилактических, агротехнических и акарицидных мероприятий были выделены значительные финансовые средства (11 млн 333 тыс. руб.) из областного и местных бюджетов.

Увеличение численности клещей повышает и возможность контакта людей с ними. Пик заболеваемости совпал с высокой численностью клещей

*H. marginatum* и интенсивной заклещевленностью сельскохозяйственных животных. Больные, как правило, заражались при укусе клещом или контакте с клещом при раздавливании незащищенными руками (67,1 % от всех заболевших в 2007 г.). Высокий риск заражения отмечался при работе с животными и при выполнении других сельскохозяйственных работ (27,3 %). В некоторых случаях заражение происходило и при отдыхе на природе (1,3 %).

На территориях, где мероприятия по снижению численности переносчиков возбудителя КГЛ были проведены именно в период массового выхода имаго *H. marginatum* (например, Кировский район Ставропольского края, где обработки проведены в марте), индекс обилия клещей на крупном рогатом скоте был ниже эпидемического порога опасности – от 1,4 до 2,0 (4,0–13,7 в других районах этой ландшафтной зоны), а заболеваемость людей не зарегистрирована.

Известно, что показатели вирусофорности имаго и преимагинальных фаз *H. marginatum* свидетельствуют об активности циркуляции вируса в эпидемический сезон и, как и показатель заклещевленности скота *H. marginatum*, пропорциональны уровню заболеваемости. Более 90 % всех больных в регионе Юга России составляют жители сельской местности, трудовая деятельность которых связана с животноводством или с полевыми работами в силу профессиональной ориентации или на личных подворьях. Результаты исследований клещей на выявление антигена вируса ККГЛ в Ставропольском крае показали высокую вирусофорность по отдельным административным районам (0,18–0,5 %), в которых регистрировались и максимальные показатели заболеваемости людей: в Степновском, Нефтекумском, Благодарненском.

Следует отметить, что во всех субъектах ЮФО, эндемичных по КГЛ, работа по организации и проведению профилактических и противоэпидемических мероприятий по КГЛ проводилась в соответствии с ежегодными в последнее время Постановлениями Главного государственного санитарного врача Российской Федерации «О мерах по совершенствованию профилактики Крымской геморрагической лихорадки в Южном федеральном округе». В результате обеспечено эпизоотологическое обследование терри-

тории природного очага, выявлены закономерности структурной организации его паразитарной системы, проведено эпидемиологическое районирование по степени риска заражения населения конкретных административных территорий. Были освоены и внедрены современные методы исследования полевого и клинического материала, в том числе генетические, предложены схемы лечения заболевания в зависимости от его тяжести, развернуты диагностические лаборатории, подготовлены квалифицированные специалисты в области диагностики и лечения КГЛ. Применяемый в настоящее время алгоритм лабораторной диагностики на основе значимости существующих методов исследования на различных этапах инфекционного процесса позволил обеспечить высокую эффективность выявления больных уже на ранних стадиях заболевания. Своевременное начало лечения и сформированные принципы ведения больных обусловили эффективность терапевтических мероприятий и снижение летальности. Для медицинских работников неблагополучных административных территорий ежегодно перед началом эпидемического сезона проводятся кустовые семинары по клинике, диагностике и профилактике КГЛ со сдачей зачетов, а специалистами Управлений Роспотребнадзора по субъектам ЮФО осуществляется проверка готовности лабораторно-клинической базы лечебно-профилактических учреждений.

Комплекс рекомендованных организационных, профилактических и противоэпидемических мероприятий изложен в методических рекомендациях «Организация и проведение мероприятий против Крымской геморрагической лихорадки на территории природных очагов России», утвержденных Главным государственным санитарным врачом РФ в 2001 г. [26]. В настоящее время проводится работа по переработке этого документа с учетом расширения зоны природной очаговости, накопленным научным и практическим опытом по проведению профилактических, противоэпидемических мероприятий и эпизоотологического обследования, совершенствованию лабораторно-диагностической базы.

Учитывая сложившиеся в последние годы на Юге России оптимальные природно-климатические условия для проявления активности основного переносчика и резервуара вируса ККГЛ – клеща *H. marginatum*, изменения, произошедшие в структуре сельскохозяйственной деятельности, в частности, в животноводстве, сокращение объемов агротехнических работ и акарицидных мероприятий, не представляется возможным устранить в ближайшие годы действия всех факторов, вызвавших активизацию природного очага КГЛ. Не следует ожидать самопроизвольного угасания эпизоотического и эпидемического процесса в данном очаге. Следовательно, необходимо в полном объеме осуществлять профилактические мероприятия по КГЛ. Профилактика и борьба должны предусматривать научно обоснованное планирование и четкое практическое выполнение

организационных, агротехнических, ветеринарно-санитарных, профилактических, диагностических, лечебных, противоэпидемических мероприятий, постоянное проведение эпизоотологического и эпидемиологического мониторинга.

Тактика борьбы с переносчиками разработана с учетом прогнозирования, фенологии вида и численности клещей *H. marginatum* и эпидемиологической ситуации. Поэтому представляется необходимым регулярное определение численности иксодовых клещей на контрольных группах животных и в природных станциях. Акарицидные мероприятия должны планироваться с учетом численности переносчиков вируса ККГЛ и сложившейся эпидемиологической ситуации. Многолетние наблюдения за природным очагом на Юге Российской Федерации свидетельствуют о том, что борьба с половозрелыми особями *H. marginatum* и другими видами клещей наиболее эффективна с третьей декады марта по третью декаду апреля, т.е. до начала массовой активности клещей и регистрации первых больных. В случае осложнения эпидситуации целесообразно повторное проведение акарицидных обработок животных в период массовой активности клещей (май – июнь) [1, 14].

В то же время наиболее проблемными моментами в борьбе с КГЛ в субъектах ЮФО являются недостаточные объемы ежегодного финансирования профилактических мероприятий и сроки поступления средств на счета специализированных служб и ведомств. Очевидно, что несвоевременное поступление финансовых средств снижает эффективность их вложения в связи с поздними сроками начала проведения противоклещевых обработок сельскохозяйственных животных. На эффективность проводимых мероприятий также оказывают негативное влияние недостаточные объемы агротехнических мероприятий и отсутствие планомерной борьбы с врановыми.

Результаты эпизоотологического обследования, проведенные в последние годы на стационарных участках в Ставропольском крае, расположенных в полупустынной и степной ландшафтно-географических зонах, свидетельствуют о сохранении высоких индексов обилия преимагинальных фаз *H. marginatum* на естественных прокормителях – птицах семейства врановых и куриных, зайцах и ежах (до 200–300 особей на объекте). Таким образом, численность резервуара и основного переносчика вируса ККГЛ – клещей *H. marginatum* – сохраняется высокой при благоприятных для перезимовки иксодовых клещей условиях в последние годы. Высокие показатели вирусофорности преимагинальных форм клещей ранней осенью (0,7 %) также свидетельствуют о неблагоприятном эпидемиологическом прогнозе на следующий год, поскольку, благодаря возможности трансфазовой и трансвариальной передачи, возбудитель находит в клещах устойчивые условия существования, а длительное сохранение вируса в голодных имаго обеспечивает выживание вирусной популяции в межэпизоотический период [16].



Полученные в результате полевых наблюдений в 2007 г. данные позволяют прийти к заключению, что прогноз эпидемиологической обстановки на 2008 г. по КГЛ на территории ЮФО следует признать неблагоприятным. При отсутствии адекватных профилактических мероприятий высокая заболеваемость на Юге России сохранится, и количество больных может даже превысить число заболевших в 2007 г.

В связи с изложенным, следует полагать, что первоочередными задачами в работе по обеспечению эпидемиологического благополучия по КГЛ в субъектах ЮФО являются:

1. Организация проведения акарицидных обработок скота до начала массовой активности клещей и регистрации первых больных (с третьей декады марта по третью декаду апреля) с учетом особенностей каждой конкретной местности.

2. Совершенствование нормативно-методической базы противоэпидемических и профилактических мероприятий, принимая во внимание современные социально-экономические условия и накопленный опыт работы в очаге.

3. Конструктивное и оперативное взаимодействие специализированных служб и ведомств (противочумных учреждений, Управлений Роспотребнадзора по субъектам, ФГУЗ «Центры гигиены и эпидемиологии», ветеринарной службы, министерств сельского хозяйства и органов исполнительной власти в субъектах округа) как в целях неотложных задач профилактики и борьбы с КГЛ, так и в выработке стратегических направлений этой работы.

4. Разработка и реализация комплексных программ по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения на уровне каждого субъекта, где имеет место активность природного очага КГЛ, с соответствующим их финансированием.

5. Выполнение комплексных профилактических мероприятий:

- обеспечение регулярного эпизоотологического обследования на территории природной очаговости КГЛ;

- контроль готовности лечебно-профилактических учреждений к приему и ведению больных КГЛ, а также лабораторно-диагностической базы;

- обеспечение лабораторной базы сертифицированными препаратами для диагностики КГЛ;

- совершенствование форм и активизация информационно-разъяснительной работы среди населения.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айдинов Г.Т., Швагер М.М., Кондратенко Т.А. и др. // Матер. IX съезда Всерос. науч.-практ. об-ва эпидемиол., микробиол. и паразитол. – М., 2007. – С. 146–147. – 2. Аристова В.А., Колобухина Л.В., Щелканов М.Ю., Львов Д.К. // Вопр. вирусол. – 2001. – № 4. – С. 7–15. – 3. Атлас распространения возбудителей природно-очаговых вирусных инфекций на территории Российской Федерации / Львов Д.К., Дерябин П.Г., Аристова В.А. и др. – М., 2001. – 4. Березин В.В., Лосев Г.И., Лисенков А.Н., Чумаков М.П. // Тр. ИПВЭ АМН СССР. – М., 1972. – Т. 20. – С. 139–149. – 5. Бируля Н.Б., Залуцкая Л.И., Перелатов В.Д. // Вирусные геморрагические

лихорадки: Тр. ИПВЭ АМН СССР. – М., 1971. – Т. 19. – С. 180–185. – 6. Боловина В.Н., Перелатов В.Д., Бадалов М.Е. и др. // Крымская геморрагическая лихорадка. – Ростов-н/Д, 1970. – С. 66–73. – 7. Бутенко А.М., Лещинская Е.В., Львов Д.К. // Вестн. РАЕН. – 2002. – Т. 2, № 2. – С. 41–49. – 8. Дятлов А.И., Котти Б.К. // Журн. микробиол. – 2005. – № 4. Приложение. – С. 98–102. – 9. Евченко Ю.М., Львов Д.К., Сысолятина Г.В. и др. // Вопр. вирусол. – 2001. – № 4. – С. 18–19. – 10. Ефременко В.И., Брюханова Г.Д., Бейер А.П. и др. // Журн. микробиол. – 2005. – № 4, Приложение. – С. 34–38. – 11. Ковалев Н.Г., Ковальчук И.В., Балабан О.А. и др. // Матер. IX съезда Всерос. науч.-практ. об-ва эпидемиол., микробиол. и паразитол. – М., 2007. – С. 180–181. – 12. Ковальский Г.Н., Рыбкина Л.Г. // Тр. Кубанского мед. ин-та. – Краснодар, 1957. – Т. 15. – С. 18–21. – 13. Колачев А.А. Крымская геморрагическая лихорадка (клиника и вопросы патогенеза): Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Черновцы, 1950. – 14. Кормиленко И.В., Айдинов Г.Т., Швагер М.М., Емельянова З.Н. // Совр. асп. эпидемиол. надзора за особо опасными инф. забол. на Юге России: Матер. науч.-практ. конф. – Ставрополь, 2007. – Ч. 1. – С. 198–200. – 15. Куйма А.У., Пак Т.П. // Мед. вирусол.: Тр. ИПВЭ АМН СССР. – М., 1975. – Т. 22, Вып. 3. – С. 107–113. – 16. Лебедев А.Д., Пак Т.П., Бируля Н.Б. и др. // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер.: Мед. география. – М., 1977. – Т. 9. – С. 185–224. – 17. Лещинская Е.В. Клиника Крымской геморрагической лихорадки и сравнение ее с геморрагическими лихорадками других типов: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 1967. – 18. Лещинская Е.В., Костюков М.А., Смирнова С.Е. // Арбовирусы и арбовирусные инф.: Тез. докл. ин-та вирусол. им. Д.И.Ивановского АМН СССР. – М., 1989. – С. 30. – 19. Львов Д.К., Ильичев В.Д. Миграции птиц и перенос возбудителей инфекций. – М., 1979. – 20. Мазрухо Т.В., Громашевский В.Л., Говорухина М.Ю. и др. // Вопр. вирусол. – 2001. – № 4. – С. 20–21. – 21. Москвитина Э.А., Водяницкая С.Ю., Пичурин Н.Л. и др. // Пробл. особо опасных инф. – 2004. – Вып. 1 (87). – С. 34–37. – 22. Онищенко Г.Г. // Эпидемиол. и инф. бол. – 2000. – № 4. – С. 4–8. – 23. Онищенко Г.Г., Ефременко В.И. // Журн. микробиол. – 2004. – № 4. – С. 86–90. – 24. Онищенко Г.Г., Ефременко В.И., Бейер А.П. Крымская геморрагическая лихорадка. – М.: ГОУ ВУНМЦ, 2005. – 269 с. – 25. Онищенко Г.Г., Ефременко В.И., Ковалев Н.Г. и др. // Журн. микробиол. – 2001. – № 6. Приложение. – С. 86–89. – 26. Организация и проведение мероприятий против Крымской геморрагической лихорадки на территории природных очагов России: Метод. рекомендации / Онищенко Г.Г., Федоров Ю.М., Жилина Н.Я. и др. – М., 2001. – 27. Санджиев В.Б.-Х., Подсвилов А.В., Князева Т.В. и др. // Пробл. особо опасных инф. – 2006. – Вып. 1 (91). – С. 28–30. – 28. Серегин С.В., Туманова И.Ю., Петрова И.Д. и др. // Вопр. вирусол. – 2006. – № 3. – С. 25–32. – 29. Тохов Ю.М., Сысолятина Г.В., Чумакова И.В., Попова Е.В. // Журн. микробиол. – 2001. – № 6. – С. 98–99. – 30. Чумаков М.П. // Мед. вирусол.: Тр. ИПВЭ АМН СССР. – М., 1974. – Т. 22, вып. 2. – С. 5–18. – 31. Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Москвина Т.М. и др. // Вопр. вирусол. – 2005. – № 5. – С. 9–15. – 32. Яровой Л.В. // Тр. ИПВЭ АМН СССР. – М., 1965. – Т. 7. – С. 31–34. – 33. Яшина Л.Н., Петров В.С., Вышемирский О.И. и др. // Вопр. вирусол. – 2002. – № 3. – С. 11–15. – 34. Hoogstraal H. // J. Med. Entomol. – 1979. – Vol. 15, N 4. – P. 307–417.

A.N.Kulichenko, O.V.Maletskaia, A.D.Antonenko, A.P.Beier,  
G.M.Grizhebovsky, I.V.Kovalchuk, I.V.Chumakova, G.V.Sysoyatina,  
E.V.Zemtsov, N.G.Kovalev

#### Topical Questions Concerning Crimean Haemorrhagic Fever Surveillance

Stavropol Anti-Plague Research Institute;  
Agency of Rospotrebnadzor for Stavropol Region;  
Center of Hygiene and Epidemiology in Stavropol Region

In 2007 further increase of Crimean haemorrhagic fever (CHF) morbidity was registered in the territory of the Southern federal district. The cause of this is primarily the increase of the population level of *H. marginatum*. In the light of present epidemic situation we inclined to believe the prognosis for CHF in 2008 is unfavorable. The necessary measures to assure epidemiologic well-being for CHF are stated in the article. Acaricidal treatment of cattle carried out before mass activity of ticks and registration of the first patients is considered to be the primary one.

**Key words:** Crimean haemorrhagic fever, epidemic situation, epizootiologic surveillance, *Hyalomma marginatum*, preventive measures..

Поступила 28.02.08.

Д.К.Львов<sup>1</sup>, С.Т.Савченко<sup>2</sup>, В.В.Алексеев<sup>2</sup>, А.В.Липницкий<sup>2</sup>, Т.П.Пашанина<sup>2</sup>**ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ И ПРОГНОЗ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ ЛИХОРАДКОЙ ЗАПАДНОГО НИЛА НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**<sup>1</sup>ГУ НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН, Москва;<sup>2</sup>Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

Рассмотрены вопросы распространения лихорадки Западного Нила (ЛЗН) на территории Российской Федерации и за рубежом. Представлены сведения об основных носителях и переносчиках этой инфекции и их взаимодействии с вирусной популяцией. Показана тенденция распространения вируса лихорадки Западного Нила в прогнозе для Российской Федерации и возможности его сохранения в межэпидемический период. Даны рекомендации по организации серологического мониторинга за ЛЗН в природных и антропогенных биоценозах.

**Ключевые слова:** лихорадка Западного Нила, носители и переносчики инфекции, вирус лихорадки Западного Нила, природные и антропогенные биоценозы, прогноз циркуляции арбовирусов.

Лихорадка Западного Нила (ЛЗН) – трансмиссивное природно-очаговое заболевание, вызываемое арбовирусом рода *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* (комплекс японского энцефалита) [8, 35]. Вирус впервые был изолирован в 1937 г. в провинции Западный Нил в Уганде от лихорадящего больного. Вирус обладает наиболее широким антигенным спектром и гипотетически считается наиболее древним представителем рода. Ареал вируса в России и за рубежом, занимает огромные территории в пределах экваториального, тропического и умеренного (южная часть) климатических поясов в Африке, Европе, Америке, Азии, Австралии [4, 5, 6]. К началу обострения эпидемической ситуации на юге России в 1999 г. в результате мониторинга выявлены потенциально опасные территории в отношении вируса Западного Нила и других арбовирусов [4, 6, 7, 9]. Наиболее угрожающими являются территории юга России, особенно в Астраханской области. В свете этих данных возникновение крупной эпидемической вспышки [1, 2, 3, 12, 16] (таблица) явилось вполне закономерным [4, 7]. Основные эпидемические события развернулись на юге Волгоградской области, где число только лабораторно подтвержденных случаев достигло около 400 человек при смертности порядка 10 %. По результатам серологического обследования населения до и после эпидемической вспышки истинное число больных было в 3–10 раз больше, а число инфицированных превысило 200 тыс. человек [11, 14, 16]. Заметим, что в Астраханской области циркуляция вируса и спорадическая заболеваемость установлена с 1963 г. [2, 3, 4]. Существенное превышение заболеваемости в Волгоградской области в сравнении с Астраханской объясняется высокой иммунной прослойкой среди населения территорий с наиболее высоким риском заражения в дельте Волги, особенно в среднем ее поясе, где антитела обнаружены в среднем в 27 %, а среди возрастной группы 41–50 лет – в 40 % [4].

В 1999 г. вирус был занесен на американский континент, по нашему мнению, «рукотворным» пу-

тем, вероятно с зараженными комарами, завезенными в трюмах кораблей из портов Средиземноморского [22] или Черноморского бассейнов [7]. Вирус с северо-востока США за 2–3 года распространился сначала по атлантическому миграционному руслу во Флориду, а затем по основным путям миграции птиц на остальную часть США, южную Канаду, Центральную и Южную Америку [4, 25, 30].

Секвенирование штаммов, изолированных в Волгоградской [13, 15] и Астраханской [15] областях, показало их различия со штаммами, изолированными в Астраханской области 20–30 лет назад в период отсутствия эпидемической ситуации, и сходство со штаммами из Израиля, Румынии и США [15, 19, 20, 26]. Эпидемическая ситуация последних лет, возможно, обусловлена изменением генетических свойств, абсолютно доминирующей вирусной популяции 1-го генотипа при единичных находках 2-го и вновь описанного 4-го генотипа [7, 15]. Основными переносчиками вируса являются комары различных видов в различных экологических условиях. В США вирус выделен от многих видов комаров родов *Culex*, *Coquillettidia*, *Culiseta*, *Aedes* [18, 25]. Одни виды рода *Culex* (*Cx. restuans*) являются абсолютными кровососами птиц, обеспечивая циркуляцию вируса в природных и антропогенных биоценозах, другие (*Cx. salinarius*, *Cx. tarsalis*) нападают на птиц, млекопитающих, в т.ч. на человека, являясь эпидемиологически значимыми переносчиками [4, 25]. На модели *Cx. tarsalis* показано влияние температуры внешней среды на эффективность передачи вируса [32, 36]. Сохранение вируса в межэпидемическом периоде в зимующих самках *Cx. pipiens* [10, 24, 27, 29] и *An. messeae* [10] может служить одним из механизмов существования стабильных очагов. Но гораздо большее значение в этом имеют в условиях Астраханской области клещи *Hyalomma marginatum*, зараженность всех фаз метаморфоза которых значительно выше, чем комаров [4, 10, 27]. В Астраханской области основное значение в циркуляции и заражении людей имеют комары *Cx. pipiens*, *An. messeae*, *An. hyrcanus*,

Опубликованные данные по заболеваемости лихорадкой Западного Нила в Волгоградской [16], Астраханской [3] и Ростовской [1, 12] областях

Территории	Лабораторно подтвержденные случаи по годам										
	1997–1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	Всего
Волгоградская обл.											
Волгоград	. <sup>х)</sup>	260	13	4	11	0	0	3	12	53	356
Волжский	. <sup>х)</sup>	95	15	11	2	0	0	0	0	8	131
Ленинск	. <sup>х)</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Районы											
Старополтавский	. <sup>х)</sup>	9	0	0	0	0	0	0	0	0	9
Светлоярский	. <sup>х)</sup>	7	1	0	1	0	0	0	0	0	9
Городищенский	. <sup>х)</sup>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	5
Октябрьский	. <sup>х)</sup>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Олоховский	. <sup>х)</sup>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Палассовский	. <sup>х)</sup>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Среднеахтубинский	. <sup>х)</sup>	0	2	0	1	0	0	0	0	1	4
Старополтавский	. <sup>х)</sup>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Всего</i>	. <sup>х)</sup>	380	32	15	15	0	0	3	12	63	520
Астраханская обл.	17	95	24	49	31	11	25	73	14	. <sup>х)</sup>	339
Ростовская обл.	. <sup>х)</sup>	. <sup>х)</sup>	7	5	0	3	7	18	. <sup>х)</sup>	. <sup>х)</sup>	40
<i>Итого</i>	17	475	63	69	46	14	32	94	26	63	899

.<sup>х)</sup> Опубликованные данные отсутствуют.

*Coq. richiardii* в антропогенных и лишь *An. hyrcanus* и *Coq. richiardii* в природных биоценозах [4, 10, 27]. Причем, зараженность одних и тех же видов в антропогенных биоценозах существенно выше в сравнении с природными.

Некоторые орнитофильные виды (*Cx. tarsalis*, *Cx. nigripalpus*) в конце лета охотно нападают и на млекопитающих [23, 34].

Основным позвоночным резервуаром вируса являются птицы. В США большое значение придается воронам *Corvus brachirostris*, среди которых наблюдается высокая гибель [21, 25, 31, 33]. В Астраханской области, несмотря на широкое вовлечение в циркуляцию вируса, среди местного вида *Corvus corone* смертность не наблюдается. Это можно объяснить адаптацией популяции этого вида в результате длительного взаимодействия с вирусной популяцией [4, 10, 27]. Перенос и длительное сохранение вируса в организме птиц может быть реализовано за счет персистенции вируса [7, 25].

Клинически лихорадка Западного Нила может протекать в различных формах: преобладающей (1:150) иннаппарантной [28], лихорадочной – до 80 % клинических случаев, менингеальной – 13 %, энцефалитической – 6 % [4, 11, 14]. Смертность наблюдается в пределах 14–2,7 %, в среднем 4 %. Длительность вiremии составила в среднем 7 сут, в ряде случаев до 10 и даже 28 сут [4].

Прогноз возможности циркуляции вируса [7, 9] базируется на изотерме сумм эффективных температур  $\geq 10$  °C внешней среды 1800–2500 °C [9]. Применительно к территории России ареал включа-

ет ландшафтные пояса пустынь, степей, лиственных лесов. По мере потепления климата ареал может расширяться к северу. Здесь, однако, мало вероятно существование стабильных очагов, в частности, из-за отсутствия клещей *Hyalomma marginatum*, ареал которых лимитируется изотермой сумм эффективных температур  $\geq 10$ –3000 °C [7, 9]. Сезонный занос вируса может осуществляться дальними мигрантами. С мест зимовки, в основном из Африки, и кочевками местных популяций из района стабильных очагов, например, из Астраханской области в Волгоградскую [7, 10, 27]. На юг Сибири [5] и Дальнего Востока [17] занос во время весенней миграции может реализовываться дальними мигрантами из Юго-Восточной Азии, Австралии. Обострению эпидемической ситуации на северной границе ареала может предшествовать увеличение мест выплода комаров за счет обильных дождей и повышения температуры внешней среды. При этом надо иметь в виду угнетающее действие высоких температур свыше 35 °C на активность комаров и репликацию в них вируса. Недаром в экваториальном климатическом поясе с постоянной в течение года температурой ( $27 \pm 1$ ) °C имеются оптимальные условия для круглогодичной циркуляции вируса [7]. Для своевременного обнаружения активности вируса необходимо проведение мониторинга и использование диагностических средств и методов для лабораторной дифференциальной диагностики Западного Нила и сопутствующих арбовирусных инфекций. Они разработаны в результате творческого содружества Головного противочумного института «Микроб» и Института вирусологии

им. Д.И.Ивановского РАМН.

При организации мониторинга следует использовать серологическое обследование людей, сельскохозяйственных животных и врановых птиц в антропогенных и бакланов в природных биоценозах. Сельскохозяйственные животные, прежде всего лошади, и врановые птицы являются маркеонными видами и амплификаторами эпизоотического процесса в антропогенных биоценозах, а бакланы несут те же функции в природных биоценозах. По данным шестилетнего (2001–2006) мониторинга в Астраханской области, в антропогенных биоценозах выявлена также активная роль в циркуляции зайцев и паразитирующих на них всех фаз метаморфоза клещей *H. marginatum*. В природных биоценозах, помимо бакланов, в циркуляцию вируса активно включаются лысухи, цапли, крачки, поганки, кулики, причем зараженность птиц в среднем поясе дельты существенно выше в сравнении с нижним поясом [4].

Таким образом, эпидемический эпицентр, по данным многолетнего обследования людей, комаров, клещей, птиц, сельскохозяйственных животных располагается в антропогенных биоценозах среднего пояса дельты Волги. Здесь также выявлены активные очаги арбовирусов, передаваемых клещами Крымской-Конго геморрагической лихорадки (*Bunyaviridae*, *Nairovirus*), Дхори (*Orthomyxoviridae*, *Thogotovirus*) и комарами – Синдбис (*Togaviridae*, *Alfivirus*), Батаи (*Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*). Эти вирусы способны вызывать у людей тяжелые, порой смертельные, заболевания [4, 9, 10, 27].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айдинов Г.В., Кормиленко И.В., Гайбарян К.С. и др. // Матер. расшир. пленума пробл. комиссии «Арбовирус» и научно-практ. конф. «Арбовирусы и арбовирусные инф.», Астрахань, 2006. – М., 2007. – С. 120–121. – 2. Бутенко А.М. // Там же. – С. 6–14. – 3. Ковтунов А.И., Юстратов В.Б., Никешина Н.Н. и др. // Там же. – С. 114–115. – 4. Колобухина Л.В., Львов Д.Н. Лихорадка Западного Нила. Руководство по медицинской вирусологии / Под ред. Д.К.Львова. – М.: МИА, 2008. – С. 514–522. – 5. Локтев В.Б. // Матер. расшир. пленума пробл. ком. «Арбовирус», науч.-практ. конф. «Арбовирусы, арбовирусные инф.», Астрахань, 2006. – М., 2007. – С. 14–24. – 6. Львов Д.К. // Вопр. вирусол. – 2000. – № 2. – С. 4–9. – 7. Львов Д.К. Экология вирусов. Руководство по медицинской вирусологии / Под ред. Д.К.Львова. – М.: МИА, 2008. – С. 101–118. – 8. Львов Д.К., Дерябин П.Г. Флавивирусы (*Flaviviridae*). Руководство по медицинской вирусологии / Под ред. Д.К.Львова. – М.: МИА, 2008. – С. 226–235. – 9. Львов Д.К., Дерябин П.Г., Аристова В.А. и др. Атлас распространения возбудителей природно-очаговых вирусных инфекций на территории Российской Федерации. – М.: НИЦ ГИЕГ МЗ РФ, 2001. – 193 с. – 10. Львов Д.К., Ковтунов А.И., Яшкулов К.Б. и др. // Вопр. вирусол. – 2004. – № 3. – С. 45–51. – 11. Львов Д.К., Писарев В.Б., Петров В.А., Григорьева Н.В. Лихорадка

Западного Нила по материалам вспышек в Волгоградской области в 1999–2002 гг. – Волгоград, 2004. – 102 с. – 12. Москвитина Э.А., Забашта М.В., Ломов Ю.М. и др. // Там же. – С. 124–127. – 13. Платонов А.Е. // Вести РАМН. – 2006. – № 2. – С. 25–29. – 14. Петров В.А., Краснова Е.М., Львов Д.К. и др. // Вопр. вирусол. – 2001. – № 4. – С. 22–26. – 15. Прилипов А.Г., Самохвалов Е.И., Львов Д.К. // Вопр. вирусол. – 2001. – № 1. – С. 8–12. – 16. Савченко С.Т., Лобанов А.Н., Краснова Е.М. и др. // Матер. расшир. пленума пробл. комиссии «Арбовирус» и научно-практ. конф. «Арбовирусы и арбовирусные инф.», Астрахань, 2006. – М., 2007. – С. 161–164. – 17. Щелканов М.Ю., Ананьев В.Ю., Львов Д.Н. // Вопр. вирусол. – 2007. – № 5. – С. 37–48. – 18. Bell J.A., Brewer E.M., Mickelson N.J. et al. // Emerg. Infect. Dis. – 2006. – Vol. 12, N 8. – P. 1245–1247. – 19. Brault A.C., Langevin S.A., Bowen R. et al. // Emerg. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 10. – P. 2161–2168. – 20. Brinton M.A. // Ann. Microbiol. – 2002. – Vol. 56. – P. 371–402. – 21. Caffrey C., Smith S.C., Weston T.J. // Condor. – 2005. – Vol. 107. – P. 128–132. – 22. Dauphin G., Zientara S., Zeller H., Murgue B. // Comp. Immunol., Microbiol. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 27. – P. 343–355. – 23. Edman J.D., Taylor D.J. // Science. – 1968. – Vol. 161. – P. 67–68. – 24. Farajollah T.A., Crans W.J., Bryant P. et al. // J. Med. Entomol. – 2005. – Vol. 42. – P. 4890–4894. – 25. Hayes E.B., Komar N., Nasci R.S. et al. // Emerg. Infect. Dis. – 2005. – Vol. 11. – P. 1174–1179. – 26. Lanciotti R.S., Roehrig J.T., Deubel V. et al. // Science. – 1999. – Vol. 286. – P. 2333–2337. – 27. Lvov D.K., Butenko A.M., Gromashevsky V.L. et al. // Arch. virol. – 2004. – Vol. 18. – P. 1–12. – 28. Mostashari F., Bunning M., Kitsutoni P. et al. // Lancet. – 2001. – Vol. 358. – P. 261–264. – 29. Nasci R.S., Savage H.M., White D.J. et al. // Emerg. Infect. Dis. – 2001. – Vol. 7. – P. 742–744. – 30. Reisen W., Brault A.C. // Pest. Manag. Sci. – 2007. – Vol. 63. – P. 641–646. – 31. Reisen W., Fang Y., Lothrop H.D. et al. // J. Med. Entomol. – 2006. – Vol. 43. – P. 344–355. – 32. Reisen W., Fang Y., Martinez Y.M. // J. Med. Entomol. – 2006. – Vol. 43. – P. 309–317. – 33. Reisen W., Fang Y., Martinez Y.M. // J. Med. Entomol. – 2005. – Vol. 42. – P. 367–375. – 34. Tempelis C.H., Reeves W.C., Bellamy R.E., Lofy M.F. // Amer. J. Trop. Med. Hyg. – 1965. – Vol. 14. – P. 170–177. – 35. Thiel H.-J., Collett H.S., Shape R.E. et al. // Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / Ed. by Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J. et al. – Elsevier Academic Press, 2005. – P. 981–998. – 36. Turrell M.J., Dohm D.J., Sardeles M.R. et al. // J. Med. Entomol. – 2005. – Vol. 42. – P. 57–62.

D.K.L'vov, S.T.Savchenko, V.V.Alekseev, A.V.Lipnitsky,  
T.P.Pashanina

#### Epidemiological Situation and Prognostication of the West Nile Fever Morbidity in the Territory of the Russian Federation

Research Institute of Virology by name D.I.Ivanovskiy, Moscow;  
Volograd Anti-Plague Research Institute

The questions of spreading of West Nile fever in the territory of the Russian Federation and abroad are considered. The information on the main carriers and vectors of this infection and their interaction with virus population is presented. The tendency of spreading of the West Nile fever virus in the Russian Federation and the possibilities of its maintenance during the inter-epidemic period are shown. Recommendations are given on the organization of serologic monitoring of West Nile fever in natural and anthropurgic biocenoses.

**Key words:** West Nile fever, carriers and vectors of infection, West Nile fever virus, natural and anthropurgic biocenoses, prognostication of arboviruses circulation.

Поступила 03.03.08.

Н.В.Попов<sup>1</sup>, В.Е.Безсмертный<sup>2</sup>, Н.Л.Новиков<sup>2</sup>, А.И.Удовиков<sup>1</sup>, А.А.Кузнецов<sup>1</sup>, В.П.Попов<sup>2</sup>,  
Л.Д.Шилова<sup>1</sup>, В.В.Кутырев<sup>1</sup>

## ПРОГНОЗ ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ЧУМЫ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ НА 2008 г.

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

<sup>2</sup>Противочумный центр Роспотребнадзора, Москва

Обоснован краткосрочный прогноз эпизоотической активности 11 природных очагов чумы Российской Федерации на 2008 г. Проведен анализ состояния численности основных носителей и переносчиков чумы в природных очагах различного типа. Определены современные тенденции динамики эпизоотической активности природных очагов чумы различной биоценотической структуры.

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

В соответствии с краткосрочным прогнозом [1] в 2007 г. эпизоотии чумы выявлены на территории Центрально-Кавказского высокогорного (10 культур), Тувинского горного (26), Алтайского горного (66) природных очагов. На территории Дагестанского равнинно-предгорного природного очага наличие чумного микроба подтверждено результатами иммунодиагностических исследований; на территории Прикаспийского песчаного очага – результатами генной диагностики (ПЦР). Общая площадь эпизоотий в 2007 г. составила 1160,75 кв.км (в 2006 г. – 1077,11 кв. км). Эпизоотии, как и в 2006 г., выявлены в 28 секторах первичных районов природных очагов чумы. В 2007 г. от грызунов и их эктопаразитов изолировано 102 культуры чумного микроба (в 2006 г. – 161). При исследовании полевых материалов иммунологическими методами получено 199 положительных на чуму результатов (в 2006 г. – 105). Вследствие аномальных погодных условий 2007 г., обусловивших значительное сокращение фоновой численности носителей и переносчиков, прогноз на развитие локальных эпизоотий чумы в Прикаспийском песчаном и Волго-Уральском песчаном природных очагах не оправдался.

В условиях современного потепления климата в 2007 г. на большей части территории природных очагов чумы РФ отмечено развитие глубокой депрессии численности фоновых видов грызунов и эктопаразитов. Последнее способствовало, во многом, сохранению межэпизоотических периодов в Терско-Сунженском низкогорном, Дагестанском равнинно-предгорном, Прикаспийском Северо-Западном степном, Волго-Уральском степном, Забайкальском степном, Волго-Уральском песчаном природных очагах чумы. В 2007 г. на территории Прикаспийского песчаного природного очага, впервые с 1979 г., не зарегистрированы зараженные чумой животные. Высокие температуры летних месяцев также негативно отразились на состоянии популяций горных сусликов в Центрально-Кавказском высокогорном природном очаге. Ниже представлена общая харак-

теристика эпизоотического состояния 11 природных очагов чумы РФ в 2007 г.

*Центрально-Кавказский высокогорный природный очаг чумы (01).* В 2007 г. эпизоотии чумы зарегистрированы на общей площади 4,7 кв. км в Эльбрусском районе Республики Кабардино-Балкария (ур. Перк – 4,5 кв. км и ур. Автодром – 0,2 кв. км). Всего выделено 10 штаммов чумного микроба. Все штаммы чумного микроба изолированы от блох *Citellophilus tesquorum* (8 – от блох с очеса, 1 – от блох из гнезда, 1 – от блох из входов нор горного суслика). Зараженность блох составила 0,5 % (в 2006 г. – 0,2 %). На наличие антител исследовано более 2000 сывороток крови горного суслика и получено 132 положительных результата.

Средняя численность горного суслика в 2007 г. составила 19,5 экз. на 1 га при средней многолетней норме 20–25 экз. на 1 га. На территории различных ландшафтно-эпизоотологических районов численность горного суслика варьировала незначительно – от 21,7 до 18,0 экз. на 1 га. Климатические аномалии весенне-летнего периода, как и в 2006 г., вызвали повышенную смертность молодняка горного суслика. Отмечена тенденция дальнейшего сокращения площадей, заселенных сусликом. В 2007 г. общая площадь поселений этого грызуна не превышала 65 кв. км (в 1976 г. – 85 кв. км). Показатели численности обыкновенной полевки снизились до 3–5 % попаданий в орудия лова. Фоновая численность мышевидных грызунов в открытых биотопах и в населенных пунктах повсеместно низкая. В 2008 г. следует ожидать дальнейшего снижения численности горных сусликов и блох вида *Cit. tesquorum*. Численность мышевидных грызунов в открытых стациях природного очага чумы несколько возрастет. Прогнозируется развитие локальных эпизоотий чумы.

*Терско-Сунженский низкогорный природный очаг чумы (02).* С 1992 г. регулярное эпизоотологическое обследование очаговой территории не проводится. Последнее обследование очага выполнено в 2000 г. В 2008 г. обострение эпизоотической обста-

новки на территории очага маловероятно.

*Дагестанский равнинно-предгорный природный очаг чумы* (03). В 2007 г. возбудитель чумы не выделен. На территории Буйнакского района Республики Дагестан при исследовании малых сусликов иммунодиагностическими методами получены положительные на чуму результаты.

На всей территории очага отмечена тенденция увеличения численности малого суслика. В предгорной зоне средняя плотность этого зверька равнялась 10,6 экз. на 1 га, что выше нормы (5,8 экз. на 1 га) и показателя прошлого года (2006 г. – 9,7 экз. на 1 га). В равнинной зоне численность малого суслика увеличилась до 1 экз. на 1 га. Численность блох малого суслика в предгорной зоне сохранилась на уровне прошлого года и достигала 276 экз. на 1 га. В равнинной зоне численность блох малого суслика возросла до 14 экз. на 1 га. В осенний период численность гребенщиковой песчанки снизилась до 3,6 экз. на 1 га, что в 2 раза ниже среднееголетней нормы и в 2,5 раза показателя осенней численности 2006 г. Весенняя численность блох *Nosopsyllus laeviceps* сохранилась на уровне прошлого года и составляла 22,0 экз. на 1 га (среднееголетняя норма – 23,5). К осени численность блох песчанок снизилась до 9 экз. на 1 га. Популяции мышевидных грызунов продолжают оставаться в состоянии глубокой депрессии. В 2008 г. показатели численности малого суслика несколько снизятся. Прогнозируется сохранение низкой численности гребенщиковой песчанки и мышевидных грызунов. Развитие эпизоотий чумы маловероятно.

*Прикаспийский Северо-Западный степной природный очаг чумы* (14). В 2007 г. на территории очага сохраняется депрессия численности основного носителя чумы – малого суслика. На территории Кумо-Манычского ландшафтно-эпизоотологического района фоновая численность малого суслика снизилась в 12 раз. Поселения малого суслика носят мелкоочаговый характер, площадь заселенных зверьками участков варьирует от 3 до 136 га. Общая площадь поселений сусликов составляет здесь около 276 га при средней плотности зверьков 0,7 экз. на 1 га. Весенняя численность мышевидных грызунов в открытых биотопах достигала 11,9 % попадания в орудия лова. На территории Ергенинской возвышенности и Сарпинской низменности фоновая плотность малого суслика не превышала 5 экз. на 1 га. Популяции блох малого суслика продолжают оставаться в состоянии глубокой депрессии. Численность мышевидных грызунов в открытых биотопах на Ергенях составляла весной от 3,6 до 11,0 % попадания в орудия лова, осенью – до 14,3 %; на Сарпинской низменности – 9,6 и 19,0 % соответственно. Показатели численности мышевидных грызунов весной в населенных пунктах на Ергенях колебались от 1,3 до 7,5 %, на Сарпинской низменности не превышали 5,0 % попадания в орудия лова; осенью не превышали 3,5 и 4,6 % соответственно. На Черных землях численность малого суслика существенно не изменилась;

в низменной солонцеватой степи несколько снизилась. Численность блох малого суслика на Черных землях не превышала 150–300 экз. на 1 га. Осенние показатели численности гребенщиковой песчанки не превышали 2,3–3,7 % попадания в орудия лова. В 2008 г. на территории очага ожидается сохранение низкого уровня численности малого суслика и его блох. Численность мышевидных грызунов несколько возрастет. Прогнозируется дальнейшее сохранение межэпизоотического периода.

*Волго-Уральский степной природный очаг чумы* (15). В 2007 г. эпизоотии чумы не зарегистрированы. Фоновая численность малого суслика снизилась до 4,8 экз. на 1 га. Общий запас блох малого суслика увеличился до 72 экз. на 1 га. Индекс обилия блох в шерсти малого суслика составил 2,0 (*Neopsylla setosa* – 0,7; *Cit. tesquorum* – 0,97). Осенняя численность мышевидных грызунов в степных биотопах составляла 6,0 % попадания в орудия лова. В пойменных биотопах весной численность мышевидных грызунов достигала 28,1 % попадания в орудия лова. В населенных пунктах максимальная численность домовых мышей достигала 8,0 % попадания в орудия лова. В 2008 г. показатели численности малого суслика и его блох существенно не изменятся. Прогнозируется сохранение межэпизоотического периода.

*Тувинский горный природный очаг чумы* (37). В 2007 г. общая площадь эпизоотий составила 196 кв. км (в 2006 г. – 149 кв. км). Выделено 26 штаммов чумного микроба (2006 г. – 42 штамма). Фоновая численность длиннохвостого суслика возросла до 6,1 экз. на 1 га (2006 г. – 3,7 экз. на 1 га). На Каргинском участке очага численность длиннохвостого суслика составила 18,3 экз. на 1 га; численность монгольской пищухи – 1,5 жилых нор на га, а численность синантропных грызунов – 5,6 % попадания в орудия лова. Интенсивность размножения длиннохвостого суслика низкая. Сохранилась тенденция роста численности даурской пищухи. В 2007 г. индекс обилия блох на суслике составил весной 1,25 и осенью – 4,06; во входах нор 0,39 и 0,30 соответственно. В 2008 г. прогнозируется снижение численности длиннохвостого суслика и, как следствие, снижение уровня эпизоотической активности очага.

*Забайкальский степной природный очаг чумы* (38). В 2007 г. возбудитель чумы не выявлен. В последние два года климатические условия в Забайкалье характеризуются крайней суровостью и засушливостью, что неблагоприятно отразилось на жизнедеятельности носителей природно-очаговых инфекций. В 2007 г. отмечен самый низкий уровень численности грызунов и даурской пищухи за время наблюдения с 1942 г. Весенняя и осенняя численность даурского суслика была в 1,5–3 раза меньше чем в прошлом году и более чем в 45 раз меньше показателя 1942–1945 гг. Монгольский сурок в пределах очага встречается в виде небольших поселений с плотностью до 2 жилых нор на 1 га на участках, прилегающих к государственной границе с Китаем и Монголией.

Показатели численности даурского суслика не превышали 0,1–0,3 экз. на 1 га. В 2007 г. сохранилась депрессия численности даурской пищухи: единичные норы и небольшие поселения сохраняются лишь в местах оптимального обитания. В 2007 г. отмечен низкий уровень общего запаса блох *Cit. tesquorum* – основного переносчика чумы в Забайкалье. В 2008 г. ожидается повышение численности носителей и переносчиков возбудителя чумы. Прогнозируется сохранение межэпизоотического периода.

*Волго-Уральский песчаный природный очаг чумы* (16). В 2007 г. возбудитель чумы не выявлен. Показатели весенней численности песчанок (7,4 экз. на 1 га) несколько превышали уровень прошлого года (в 2006 г. – 5,4 экз. на 1 га). К осени фоновая численность песчанок снизилась до 6,5 экз. на 1 га. Общий запас блох песчанок в 2007 г. остался на низком уровне. Доминировали блохи *N. laeviceps*. Индекс обилия иксодовых клещей на основных носителях чумы в 2007 г. составил 0,33. Численность мышевидных грызунов в открытых стациях весной составила 5,3 %; осенью – 3,8 % попадания в орудия лова. В закрытых стациях численность мышевидных грызунов весной составила 2,8 %; осенью – 1,7 % попадания в орудия лова. Индекс обилия блох в шерсти второстепенных носителей чумы (мышевидные грызуны и др.) составил 0,07. В 2008 г. сохранится низкий уровень численности грызунов и блох. Обострения эпизоотической обстановки на территории очага не ожидается.

*Прикаспийский песчаный природный очаг чумы* (43). В 2007 г. эпизоотии чумы не выявлены. Наличие ДНК чумного микроба в 3 пробах полевого материала подтверждено ПЦР.

В зоне работы Астраханской ПЧС показатели фоновой численности песчанок сохранились на уровне прошлого года и достигали весной 3,3 экз. на 1 га; осенью – 6,3 экз. на 1 га. В Приморском районе численность песчанок в осенний период достигала 8,7 экз. на 1 га. В отловах преобладали гребенщикообразные песчанки (за исключением Черных земель). Запас блох песчанок в 2007 г. повсеместно, за исключением Черных земель, превышал среднесезонные показатели.

Показатели численности малого суслика, по сравнению с 2006 г., снизились до 2,7 экз. на 1 га. Численность блох малого суслика значительно уступает среднесезонным показателям. Численность мышевидных грызунов весной 2007 г. несколько превышала прошлогодний уровень. К осени показатели численности мышевидных грызунов снизились. Отмечено увеличение в сборах доли общественных полевок. В закрытых стациях численность домашних мышей остается на среднем уровне и колеблется в пределах 1,4–8,9 % попадания в орудия лова. Наиболее высокая численность мышевидных грызунов в населенных пунктах отмечена в Приморском районе.

На территории, обследуемой Элистинской ПЧС,

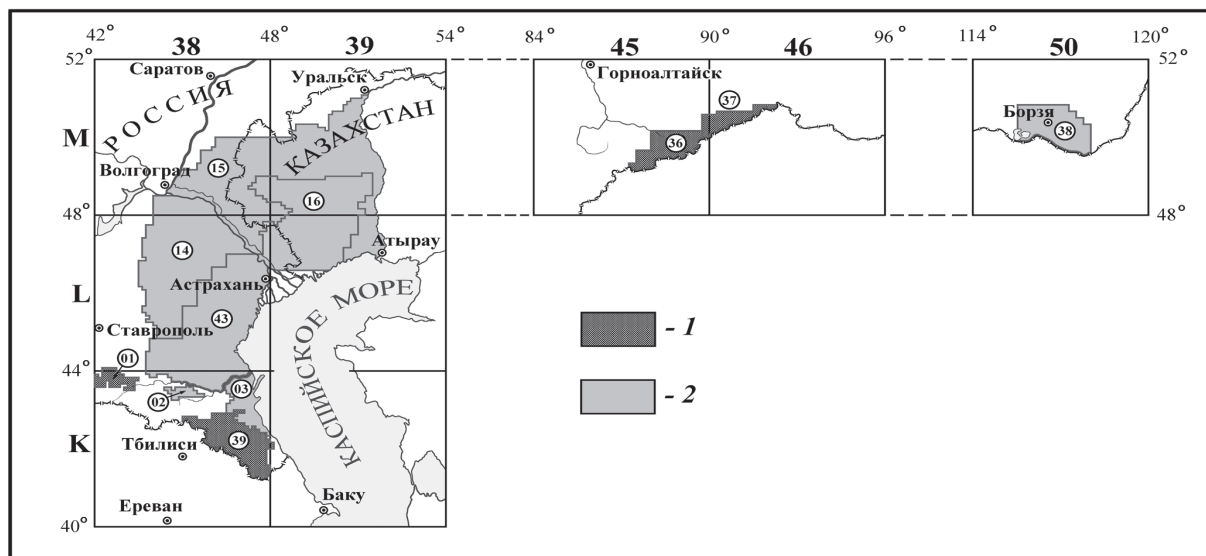
численность полуденной песчанки весной достигала в полужакрытых песках 3,4 % попадания в орудия лова, в закрытых песках – 3,1 %, в кустарниках – 1,0 %. К осени показатели численности полуденной песчанки возросли в полужакрытых песках до 5,0 %, в закрытых песках до – 7,4 %, в кустарниках до – 5,8 % попадания в орудия лова. Численность мышевидных грызунов в открытых стациях составляла весной 10,3 %, в закрытых биотопах – 2,8 %. Осенью в открытых стациях – 3,8 %, в закрытых биотопах – 4,5 % попадания в орудия лова. Фоновая численность малого суслика не превышала 5 зверьков на 1 га. Индексы обилия блох шерсти полуденной и гребенщикообразной песчанок составляли в первом полугодии 0,3; во втором – 0,4 и 1,2 соответственно. Индекс обилия блох шерсти малого суслика 0,9; входов нор – 0,04.

На территории, обследуемой Дагестанской ПЧС, популяции полуденной и гребенщикообразной песчанок продолжают находиться в состоянии депрессии. От весны к осени наблюдался спад численности песчанок до 1,0 экз. на 1 га (2006 г., осень – 1,3). Хотя в Кумо-Манычском междуречье от весны к осени численность песчанок увеличилась в 2 раза и составила 6,1 экз. на 1 га. Весенняя численность блох песчанок на территории Терско-Кумского междуречья оставалась на уровне прошлого года – 3,0 экз. на 1 га. К осени индексы обилия блох снизились до 1,1. На территории Кумо-Манычского междуречья численность блох составляла весной 11,7; осенью – снизилась до 5,5 экз. на 1 га.

Популяции малого суслика продолжают оставаться в состоянии глубокой депрессии. В Терско-Кумском междуречье средняя плотность составляет 0,1 экз. на 1 га; в Кумо-Манычском междуречье – 2,1 экз. на 1 га (2006 г. – 3,3). Численность мышевидных грызунов в открытых биотопах в Терско-Кумском междуречье повсеместно низкая. В Кумо-Манычском междуречье численность мышевидных грызунов весной составляла в среднем 2,5 %; осенью – 4,4 % попадания в орудия лова. В закрытых биотопах численность мышевидных грызунов колебалась от 2,1 до 3,6 % попадания в орудия лова. В 2008 г. сохранится низкая численность фоновых видов носителей и переносчиков чумы. Обострения эпизоотической обстановки на территории очага не ожидается.

*Восточно-Кавказский высокогорный природный очаг чумы* (39). В 2007 г. эпизоотии чумы не выявлены. В горной зоне сохраняется тенденция роста численности обыкновенной полевки. Средняя плотность обыкновенной полевки весной равнялась 23,4 экз. на 1 га, что значительно выше нормы и показателя весенней численности прошлого года (весна 2006 г. – 9,2, норма – 3,2). От весны к осени численность полевки увеличилась в два раза. Средняя плотность составила 57,1 экз. на 1 га (2006 г. – 50,4, норма 11,9).

В предгорной зоне очага популяции обыкновенной полевки продолжают находиться в состоянии депрессии: весной средняя плотность составила



Природные очаги чумы Российской Федерации, на территории которых в 2008 г. прогнозируется развитие локальных эпизоотий чумы (1) и сохранение межэпизоотического периода (2)

4,0 экз. на 1 га; осенью – 3,7 экз. на 1 га. Численность мышевидных грызунов весной была ниже нормы и уменьшилась по сравнению с прошлым годом до 1,3 % попадания (2006 г. – 1,6, норма 2,9). К осени численность мышевидных грызунов увеличилась до 5,5 % попадания (осень 2006 г. – 2,1, норма – 8,3). В предгорной зоне очага осенняя численность составляла 2,3 % попадания в орудия лова (2006 г. – 4,5, норма – 10,3). В закрытых биотопах численность мышевидных грызунов весной составляла 1,5 % попадания в орудия лова, осенью – от 1,0 до 3,2 %. Численность блох обыкновенной полевки в горной зоне весной составляла 166,0; осенью – 388,0 экз. на 1 га. В 2008 г. прогнозируется сохранение высокой численности полевки обыкновенной в горной зоне. Возможно развитие локальных эпизоотий чумы в поселениях обыкновенных полевок в высокогорной зоне очага.

*Алтайский горный природный очаг чумы (36).* В 2007 г. эпизоотии чумы выявлены на 11 участках. Общая площадь эпизоотий составила 611 кв.км, на которой выделено 66 культур чумного микроба в том числе: 8 – от монгольских пищух, 37 – от блох монгольских пищух, 2 – от блох даурских пищух, 3 – от блох из входов нор монгольских пищух, 1 – от плоскочерепной полевки, 2 – от блох с плоскочерепной полевки, 13 – от блох из гнезд монгольских пищух.

Зараженность основного носителя по всем пробам на эпизоотических участках колебалась от 0,87 до 4,76 %, зараженность блох – от 0,08 до 2,28 %. При исследовании полевых материалов иммунологическими методами получено 38 положительных на чуму результатов. По видам носителей антитела к Ф1 чумного микроба обнаружены в пробах от даурских пищух – 5, длиннохвостого суслика – 1, монгольских пищух – 8, плоскочерепных полевок – 24. На наличие капсультного антигена исследовано 214

погадок хищных птиц и получено 8 положительных результатов.

Показатели численности фоновых видов грызунов, по сравнению с прошлым годом, несколько снизились. Плотность основного носителя чумы – монгольской пищухи составляла весной 6,5, осенью – 7,7 жилых нор на 1 га. В весенний период фоновая численность даурской пищухи не превышала 0,6, осенью – 1,5 жилых нор на 1 га, что в два раза ниже прошлогоднего уровня. Численность длиннохвостого суслика весной составляла 3,5, осенью – 2,6 экз. на 1 га. Средняя плотность алтайского сурка весной и осенью составляла 0,6 жилых бутанов на 1 га. Численность плоскочерепной полевки весной достигала 12,4 % попадания в орудия лова. Общий индекс блох на монгольской пищухе снизился до 8,1. Из входов нор монгольской пищухи собрано 2039 экз. блох, годовой миграционный индекс составил 0,14 (в 2006 г. – 0,12). Общий индекс обилия блох на даурской пищухе возрос до 9,6, что намного выше среднемноголетнего значения этого показателя – 2,61. Общий индекс обилия блох на плоскочерепной полевке составил 2,9, что также выше уровня прошлого года – 1,83. В 2008 г. прогнозируется развитие эпизоотий чумы в различных частях очага. Сохранится высокий уровень численности основного носителя чумы – монгольской пищухи.

Итоговые прогностические данные по природным очагам чумы Российской Федерации, для территорий которых обоснован прогноз на развитие в 2008 г. эпизоотий чумы или сохранение межэпизоотического периода, представлены на рисунке.

*Краткосрочный прогноз.* В 2008 г. развитие локальных эпизоотий чумы ожидается на территории горных и высокогорных природных очагов – Тувинского горного, Алтайского горного, Центрально-Кавказского высокогорного, Восточно-Кавказского



высокогорного. Причем в 2008 г. эпизоотическая активность Тувинского горного и Центрально-Кавказского высокогорного природных очагов чумы несколько снизится. В равнинных и низкогорных природных очагах чумы – Прикаспийском Северо-Западном степном, Волго-Уральском степном, Забайкальском степном, Дагестанском равнинно-предгорном, Терско-Сунженском низкогорном, Волго-Уральском и Прикаспийском песчаных природных очагах – ожидается сохранение межэпизоотических периодов. Вместе с тем, учитывая данные сверхдолгосрочного прогноза эпизоотической активности природных очагов чумы России [2], ориентированные на возможность подъема эпизоотической активности Волго-Уральского песчаного и Прикаспийского песчаного природных очагов в 2008–2009 гг., следует учитывать вероятность находок на их территориях в 2008 г. единично зараженных чумой животных, по мере выхода из состояния депрессии популяций основных носителей и переносчиков этой инфекции.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Попов Н.В., Безсмертный В.Е., Новиков Н.Л. и др. // Пробл. особо опасных инф. – 2007. – Вып. 1 (93). – С. 11–16. – 2. Попов Н.В., Удовиков А.И., Кузнецов А.А. и др. // Пробл. особо опасных инф. – 2006. – Вып. 1 (91). – С. 24–27.

N.V.Popov, V.E.Bezsmertny, N.L.Novikov,  
A.I.Udovikov, A.A.Kouznetsov, V.N.Popov, L.D.Shilova, V.V.Kutyrev

**Prognostication of Epizootologic Activity  
of Plague Natural Foci in the Russian Federation  
for 2008**

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

A short-term prognosis of plague epizootic activity in 11 natural foci in the Russian Federation for 2008 is substantiated by the authors. The present situation with the numbers of the main carriers and vectors of plague infection in diverse types of natural foci was analyzed. Some modern tendencies were noted in the dynamics of epizootic activity of the natural plague foci varying in their biocenotic structures.

*Key words:* plague natural foci in the Russian Federation, epizootic activity.

Поступила 11.01.08.

## ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

УДК 578.833.26

Е.И.Андаев<sup>1</sup>, О.В.Мельникова<sup>2</sup>, А.М.Титенко<sup>3</sup>

**САНИТАРНАЯ ОХРАНА ТЕРРИТОРИИ ОТ ЗАВОЗА И РАСПРОСТРАНЕНИЯ  
ОСОБО ОПАСНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ. Сообщение 5. ЛИХОРАДКА ЛАССА**

<sup>1</sup>Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока;

<sup>2</sup>Всероссийский центр мониторинга и прогнозирования чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера, «Центр Антистихия» МЧС, Москва

В работе приведены результаты анализа лихорадки Ласса (ЛЛ) в соответствии с предложенными ранее признаками, критериями и категориями актуальных для санитарной охраны территории особо опасных вирусных инфекций (ООВИ). ЛЛ является контагиозной ООВИ I группы патогенности, способной к эпидемическому распространению. В случае завоза ЛЛ на неэндемичную территорию в отношении этой инфекции необходимо проведение противоэпидемических мероприятий в максимальном объеме, так как даже при выявлении единичного больного могут возникнуть эпидосложнения.

*Ключевые слова:* санитарная охрана территории, лихорадка Ласса.

Лихорадка Ласса (ЛЛ) – острое зоонозное заболевание с проявлениями геморрагического диатеза, фарингита, пневмонии, миозита и миокардита, название которого происходит от городка в Нигерии, где был впервые выделен вирус. Возбудитель – вирус Ласса (ВЛ) (*Arenaviridae, Arenavirus*) изолирован J.D.Frame *et al.* от больного в 1969 г. [25].

В данной работе приведены результаты анализа ЛЛ в соответствии с предложенными нами ранее признаками, критериями и категориями актуальных для санитарной охраны территории особо опасных вирусных инфекций (ООВИ) [8, 9]. Рассмотрим соответствующие признаки.

*Тяжесть заболевания и летальность.* В эндемичных районах Африки лихорадка Ласса является причиной значительной заболеваемости (до 200–300 тыс. в год [34]) и смертности, унося ежегодно по 5000 жизней [23]. Болезнь характеризуется лихорадкой, болью в мышцах, груди, горле, абдоминальными болями, тошнотой, рвотой [36]. У детей наблюдается «синдром раздутого младенца», названный так из-за обширных отеков, вздутого живота и кровоточивости [47]. Приблизительно у 80 % людей болезнь протекает в легкой форме или бессимптомно, 15–20 % больных, госпитализируемых с ЛЛ, умирают от этой болезни, и лишь 1 % от общего количества инфициро-

ванных составляют летальные исходы [36]. Данные по летальности сильно варьируют, отмечается связь географического расположения места вспышки с клиническими симптомами, вероятно, из-за различной вирулентности вируса. Однако роль штамма или генотипа в тяжести заболевания неизвестна [44, 45]. При некоторых вспышках смертность достигает 55 [44], 65 [22] и даже 76 % [44]. Особенно высок уровень смертельных исходов среди беременных женщин в третьем триместре беременности и у плодов, 95 % которых гибнет внутриутробно [34]. В тканях плаценты при этом обнаруживается вирус в большом количестве. Смерть может наступить от дыхательной или мультиорганной недостаточности, геморрагического шока [52]. Гепатит, вызываемый ВЛ, не является первичной причиной смерти [44]. Существуют штаммы ВЛ, персистирующие в центральной нервной системе и способные вызывать неврологические осложнения, патогенез которых пока малопонятен [30]. Частым осложнением бывает глухота [17], причем это никак не зависит от тяжести перенесенного заболевания. Другим серьезным осложнением являются спонтанные аборт [34].

Тяжелая форма ЛЛ может быть связана с подавлением иммунитета. Макрофаги, и в особенности, дендритные клетки, являются ключевыми мишенями для ВЛ и, вероятно, вовлечены в репликацию вируса на раннем этапе его попадания в организм [12].

Принципиальных половых, возрастных и этнических различий при анализе заболеваемости обычно не отмечается [14, 59]. При эпидемиологических исследованиях в Гвинее обнаружено несоответствие между встречаемостью ЛЛ и уровнем сероположительных находок среди населения [14], а также отсутствие корреляции между уровнем антител и исходом заболевания [23]. Иммунитет после перенесенного заболевания пожизненный [24].

*Контагиозность и способность к эпидемическому распространению.* Заболевание считается контагиозным, хотя сведения по этому поводу противоречивы. J.V.McCormic *et al.* [45] отмечают, что соотношение заболевших к инфицированным варьировало от 9 до 26 %. J.Knobloch *et al.* [41], наблюдая лишь два вероятно вторичных случая заражения среди 42 пациентов, делают вывод, что передача ВЛ от человека к человеку существенного эпидемиологического значения не имеет. C.G.Helmic *et al.* [31] не обнаружили свидетельств повышенного риска заражения для больничного персонала на эндемичных территориях: распространенность антител и сероконверсия по возрасту и полу среди медработников были практически равны таковым у населения близлежащих деревень. J.D.Frame *et al.* [26] обнаружили, что распространенность антител у медперсонала, имевшего непосредственный контакт с больными ЛЛ, и у не работавшего с ними, была одинаковой, большая часть случаев инфицирования медработников не связана с их работой в больнице. Другие авторы [59] полагают, что госпитальный персонал инфицируется как от па-

циентов, так и в своем окружении. Есть множество подтверждений, что передача ВЛ от человека к человеку в условиях госпиталя эффективно предупреждается с помощью простых методов защиты, доступных каждому медицинскому учреждению [31].

*Необходимый уровень защиты в зависимости от группы патогенности.* По действующим в РФ санитарным правилам ВЛ относится к I группе патогенности. Работа с ВЛ в лаборатории требует максимальной биологической защиты (P4) из-за высокой контагиозности, летальности, отсутствия надежных вакцин и низкой эффективности лечения [33]. При работе с больными, во избежание контакта с выделениями пациента, персонал должен пользоваться защитной одеждой, включая перчатки, халат и очки [34].

*Ареал инфекции, наличие очагов на территории России.* ЛЛ является эндемичной болезнью для части территорий Центральной и Западной Африки. Она зарегистрирована в Гвинее, Либерии, Сьерра-Леоне и Нигерии [34]. По всей вероятности, с ВЛ можно встретиться также в Гане, Кот-Д'Ивуаре и Буркина Фасо [29] и предположительно в северном Камеруне [28]. ВЛ обнаружен в Сенегале [51]. Антитела к ВЛ, среди прочего, выявлены у 1,1 % обследованных жителей Центрально-Африканской Республики [40]. Заболеваемость в отдельно взятых странах распределена неравномерно, о чем косвенно могут свидетельствовать результаты изучения иммунологической структуры населения. В Гвинее, к примеру, наибольшее количество сероположительных к ВЛ лиц обнаружено среди жителей, населяющих зоны вторичных тропических лесов и саванн (25–55 %) и гораздо меньше (4–7 %) – в горных районах [42]. В Либерии значительно больше «положительных» сывороток встречалось в деревнях, расположенных вблизи от дорог (6,4 %), чем в «буше» (1,9 %). В деревнях, где традиционное ведение хозяйства претерпело какие-то изменения, ЛЛ встречается часто и постоянно, тогда как в деревнях с неизменным ведением хозяйства – спорадически [59]. В западных провинциях Сьерра-Леоне глухота, связанная с заражением ВЛ, встречается чаще, чем в каких-либо других странах, где регистрируется ЛЛ [17].

*Механизмы, пути и факторы передачи, устойчивость возбудителя во внешней среде.* ЛЛ характеризуется множественностью механизмов передачи. Основной – контактный через повреждения на коже при непосредственном соприкосновении с выделениями или кровью больных, особенно в домашних условиях, в некоторых случаях – через слизистые, конъюнктиву. Грызуны рода *Mastomys (Praomys)*, живущие по соседству с домами или непосредственно в них, бывают хронически инфицированными [24], разносят зараженные экскременты по человеческому жилищу и продуктам питания, выделяя от 1000 до 10 тысяч инфекционных вирусных единиц на 1 мл мочи. Заражение может произойти при контакте или вдыхании мельчайших частиц из воздуха, контаминированного выделениями зверьков; капли мочи попадают

на поверхности, включая пол, столы, кровати и даже кухонную утварь. Кроме того, в бедных африканских деревнях, эти мелкие животные часто служат источником белка, и заражение может произойти во время разделки тушки и приготовления пищи [34]. J. Ter Meulen *et al.* [53] показали, что в разных местностях Гвинеи частота обнаружения антител к ВЛ сильно варьировала в зависимости от уклада домашнего хозяйства и употребления в пищу грызунов-носителей вируса: 2,6 % положительных сывороток крови было обнаружено в провинции, где этих крыс не употребляют в качестве продукта питания против 14–35 % в местностях, где более 90 % населения используют грызунов как источник белка. В Сьерра-Леоне *M. natalensis* составляли 50–60 % от всех грызунов, пойманных в домах, и лишь 10–20 % от отловленных на окружающих полях и в буше – результат, говорящий о том, что именно жилище является важнейшим местом, где может произойти заражение ВЛ. В среднем на деревенский дом приходится до 10 грызунов, 5–10 % из которых инфицировано, но в некоторых случаях в доме могут находиться до 50–75 зверьков, и половина из них распространяет ВЛ [45].

ЛЛ может передаваться от человека к человеку также при вдыхании частиц аэрозоля, выделяемых при кашле больного. Реализуется также вертикальный механизм передачи инфекции: ребенок может заразиться внутриутробно и, таким образом, приобретать врожденную ЛЛ [47]. Вирус передается через контаминированное медицинское оборудование, например, повторно используемые иглы (внутрибольничное заражение) [34]. Персонал больниц может заразиться и при экстренных хирургических операциях [22]. Высокую опасность представляет работа с вирусом в лаборатории. Ф.М. Фидаров с соавт. [10] изучали устойчивость ВЛ (штамм Джозия) к действию физико-химических факторов (прогревание при 50 °С, растворы мочевины и формалина в разных концентрациях и УФ-облучение). Выяснилось, что ВЛ довольно стабилен при воздействии температуры 50 °С: даже при прогревании в течение 90 мин полной инактивации вируса не наблюдали. Чувствительность к мочедине зависела от концентрации: полную инактивацию наблюдали через 20 мин при концентрации 1 М и через 15 мин при концентрации 2 и 3 М. Что касается формалина, то ВЛ чувствителен даже к незначительному его присутствию. Полной инактивации вируса удавалось добиться лишь через 24 ч выдерживания смеси в термостате при 37 °С, а при 4 °С – через двое суток (концентрация формалина 0,03 %). Воздействие УФ-лучами в течение 10 с полностью инактивировало инфекционную активность штамма Джозия. S.W.Mitchell и J.V.McCormic [46] инактивировали ВЛ разными способами (прогревание, изменение pH и гамма-излучение) с целью обезопасить работу с кровью больных людей в лаборатории. Выяснилось, что прогревание сыворотки в течение часа при 60 °С снижало титры вируса вплоть до утраты инфекционности. Разведение крови в 3 %

уксусной кислоте полностью инактивировало вирус. При воздействии гамма-излучением ВЛ плохо поддавался инактивации при 4 °С. Тем не менее, L.H.Elliott *et al.* [20] считают этот метод инактивации лучшим по сравнению с УФ-облучением и действием бета-пропиолактона.

*Длительность вирусемии, носительство (человек)*. Вирусемия длительная может продолжаться несколько недель. К.М.Johnson *et al.* [39] измеряли уровень вирусемии в пробах крови больных ЛЛ людей. Вирус был выделен из крови в 73 % случаев. Выяснилось, что вероятность летального исхода значительно возрастала при высоком уровне вирусемии. Кроме того, вирус в тканях из глотки больных с вирусемией обнаруживался в 39 % случаев по сравнению с 14 % у больных без вирусемии. H.Schmitz *et al.* [52], используя ОТ-ПЦР в реальном времени, наблюдали неуклонный рост количества вируса в крови по мере развития болезни с выходом на плато ( $10^8$ – $10^9$  копий генома в мл) за четыре дня до смерти больного. У другого пациента, наоборот, на поздней стадии болезни, также закончившейся летально, концентрация вируса понизилась с  $10^7$  до  $10^6$  копий генома в мл.

*Природный резервуар вируса на эндемичной территории (хозяева и переносчики)*. Резервуаром, хозяином ВЛ, являются грызуны, известные под обобщенным названием «многососковые крысы». Их систематика до сих пор остается спорной, виды трудноотличимы друг от друга. Эпидемиологическое значение имеют несколько видов – *Mastomys natalensis*, *M. huberty* и *M. erythroleucus*. В медицинской литературе их часто неправомерно объединяют под названием – *M. natalensis* [35]. По принятой в России классификации [7] эти зверьки относятся к роду *Praomys*, в американской литературе чаще встречается родовое название *Mastomys*. Некоторые специалисты считают, что таксон *Mastomys* является группой внутри рода *Praomys* [35]. Размеры их мелкие: длина тела 10–10,5 см, длина хвоста примерно 10–12 см, количество сосков у разных видов варьирует от трех до 12 пар, соответствуя максимальному количеству молодняка в помете. Размножаются в течение круглого года, давая в году несколько пометов. Беременность длится 26–27 дней, половозрелость наступает примерно в возрасте 2,5 месяцев [7]. Такая высокая репродуктивная способность объясняет их широкую известность как сельскохозяйственных вредителей. *M. natalensis* также играет важную роль в распространении чумы. Встречаются в Африке практически повсеместно к югу от Сахары. Населяют, в основном, дождевые леса; предпочитают вторичные насаждения около водоемов. *M. natalensis* приспособились к жизни в деревнях. Среди них имеются популяции с кариотипом в 32 и 38 хромосом; полагают, что именно первые адаптированы к синантропным очагам [38].

Контролировать численность зверьков в эндемичных по ЛЛ зонах в настоящее время не представляется возможным [21].

При вирусологических и серологических обследова-

дованиях этих видов зверьков на ВЛ большой процент из них являют положительный результат. L.E. Okogor *et al.* [48] обнаружили 46,79 % положительных сывороток при серологическом обследовании 218 особей *M. natalensis* в Нигерии. В Гвинее из 956 обследованных грызунов рода *Mastomys* у 11 % были обнаружены антитела к ВЛ и у 5 % – антиген. Распределение инфицированных зверьков по региону варьировало от 0 до 9 % и было самым высоким в саваннах и лесных зонах [18]. В Сьерра-Леоне инфицированность грызунов рода *Mastomys*, пойманных в жилище человека, колебалась в пределах от 0 до 80 % [45].

В Зимбабве антитела к вирусу Мозамбик, близкородственному ВЛ, обнаружены у 20 % *M. natalensis* и у 7,7 % золотистых крыс *Aethomys chrysophilus*, пойманных в окрестностях двух населенных пунктов. Отмечается, что все *Mastomys*, у которых обнаружен вирус или антитела, принадлежали к хромосомной форме  $2N = 32$  (*M. natalensis*). Эти данные свидетельствуют о расширении ареала географической встречаемости вируса, первоначально обнаруженного только в Мозамбике и который, по видимому, представляет из себя не аттенуированный вариант ВЛ в природе [38].

*Занос по путям естественной (сезонной) миграции хозяев и переносчиков.* По причине массового распространения грызунов-хозяев ВЛ повсеместно южнее Сахары, ЛЛ может распространиться и на другие части африканского континента, где эта болезнь пока не регистрируется [34].

*Занос в результате внешнеэкономических связей.* Со времени открытия ВЛ, он уже десятки раз пересекал границы эндемичных территорий, попадая в Европу, Азию, Америку [29, 32]. Совсем недавно завозы ЛЛ зарегистрированы в Германии, Нидерландах, Великобритании и США [27, 36]. К сожалению, завозные случаи ЛЛ чаще всего заканчиваются летальным исходом.

O. Armignacco *et al.* [11] считают, что к заносу геморрагических лихорадок в неэндемичные страны могут привести четыре причины: больные, прибывающие в результате плановой медицинской эвакуации; лица, заболевающие по пути к месту назначения; лица, у которых обнаружено заболевание при въезде в страну, например, при обычном обследовании в аэропорту; лица, которые заболели уже после прибытия. Представляет также опасность завоз инфицированных грызунов с грузами.

*Умышленный занос.* В связи с угрозой применения микроорганизмов в качестве биологического оружия ВЛ рассматривается как потенциальный поражающий биологический агент [56].

*Степень риска формирования вторичных очагов на неэндемичных территориях.* Поскольку ЛЛ до сих пор, несмотря на случаи завоза ее в другие страны, не образовывала вторичных очагов, вряд ли этого следует ожидать в будущем, если климатические условия на неэндемичных территориях радикально не изменятся. Резервуаром ВЛ является достаточно узкая

группа грызунов, которые, несмотря на обширное распространение по африканскому континенту, представляют собой угрозу как носители этого вируса на ограниченной территории. Для формирования очагов на других территориях вирус, как минимум, должен найти подходящего хозяина. Экспериментальное заражение животных разных видов пока не выявило подходящих для этого кандидатов. Кролики [5] и некоторые линии лабораторных мышей [4] нечувствительны к этой инфекции. У лошадей после введения вируса персистентная инфекция не развивается [3]. Наиболее информативной опытной моделью для изучения ЛЛ являются обезьяны. Экспериментально заражали разные виды нечеловекообразных обезьян – гамадрилов [1], макак-резусов [21], саймири [58] и др., но в литературе нет данных о заражении человека от обезьян в естественных условиях.

*Меры по предупреждению заноса и ликвидации последствий завоза инфекции на неэндемичные территории.* R.M. Zweighaft *et al.* [60] описали один из первых случаев завоза ЛЛ в США и меры предупреждения распространения заболевания. Больной был изолирован, выявлено 552 контактных, за которыми проводилось интенсивное наблюдение в течение 21 дня. Через месяц серологическое обследование 29 контактных, подвергшихся самому высокому риску заражения, не показало наличия у них инфекции. К концу периода наблюдения заболевание не развилось ни у кого из контактировавших с больным. С момента выделения ВЛ в 1969 г. по настоящее время в литературе нами не обнаружено сведений о случаях заболевания среди контактных при завозе вируса на неэндемичные территории.

*Особенности противоэпидемических мероприятий по отношению к больным, переболевшим и контактировавшим.* При попадании больных ЛЛ в неэндемичные страны, изоляция применяется как одна из первых мер профилактики распространения заболевания [6, 60]. В то же время некоторые исследователи [31] не считают необходимым помещать больных ЛЛ в изоляторы, даже на неэндемичных по этой инфекции территориях, при условии использования элементарных барьерных методов защиты.

*Целесообразность ограничений миграций населения и импорта.* Литературные данные о введении ограничения импорта отсутствуют.

*Наличие лечебно-профилактических средств.* Хороший эффект дает вовремя начатое (1–3-и сутки с момента заболевания) лечение рибавирином (виразолом), который является мутагеном РНК-содержащих вирусов и первичный антивирусный механизм действия которого – летальный мутагенез РНК вирусного генома [16].

Продолжаются поиски новых лечебных препаратов. Uckun *et al.* [56] на мышах показали потенциал стампидина как нового средства лечения ЛЛ. В.П. Краснянский и соавт. [3] на обезьянах показали возможность использования лошадиного иммуноглобулина против ВЛ для защиты от летальной

инфекции. Другие авторы отмечают, что плазма выздоравливающих от ЛЛJ людей [43] не дает значительного снижения смертности в группах высокого риска. Морских свинок удавалось защитить плазмой, взятой от людей на поздних, но не на ранних сроках выздоровления [37].

До настоящего времени нет лицензированной вакцины против ЛЛJ, и ни одна из экспериментальных вакцин полностью не защищает нечеловекообразных приматов от летального заражения [27]. ВЛ представляет собой группу генетически очень разнообразных штаммов, что затрудняет разработку вакцины [29]. При инфекции ВЛ отсутствует корреляция между уровнем антител и исходом болезни у человека; инактивированные вакцины продуцируют высокий уровень антител ко всем белкам вируса, но не предотвращают его репликацию и гибель нечеловекообразных обезьян [23]. Делаются попытки разработки вакцины на базе аттенуированного штамма Венесуэльского энцефалита лошадей [49]; рекомбинантного вируса осповакцины [24] или сальмонелл [19], экспрессирующих разные формы гликопротеинов ВЛ.

*Возможности клинической и лабораторной диагностики, включая субвидовое типирование для установления происхождения и уровня патогенности занесенного возбудителя.* Поскольку симптомы ЛЛJ очень разнообразны и неспецифичны, клиническая диагностика ее затруднительна [14, 34].

Серологические тесты являются наиболее простыми, безопасными и широко используемыми. Лабораторный диагноз традиционно устанавливается с помощью непрямого метода флуоресцирующих антител, хотя иммуноферментный анализ на антиген и иммуноглобулины М и G более чувствителен и специфичен [13]. Определяющим считается 4-кратный рост титров IgG или наличие IgG и/или IgM в совокупности с клиническими признаками [45]. Специфичность иммуноблоттинга составляет от 90,0 до 99,3 % в зависимости от происхождения проб [54]. В хорошо оснащенных современных лабораториях вирус изолируют на культуре клеток (чаще всего – Vero) и идентифицируют с помощью ОТ-ПЦР, в т.ч. непосредственно в материале от больного [29]. Исследование животных в очагах проводится с помощью иммуноферментного анализа как на антиген, так и на антитела [18]. Для более детального изучения ВЛ применяют электронную микроскопию [2].

Разная величина бляшек в культуре ткани под агаром дает возможность различать близкородственные вирусы Ласса и Мозамбик [55]. Перекрестная иммунофлуоресценция не позволяла различать штаммы ВЛ, но при перекрестной нейтрализации в культуре клеток получены положительные результаты [37]. С помощью моноклональных антител S.Ruo *et al.* [50] дифференцировали вирусы из Сьерра-Леоне, Либерии и Гвинеи от нигерийских.

S.Gunther *et al.* [29] секвенировали частично и полностью короткий фрагмент РНК некоторых штаммов ВЛ из Нигерии, Сьерра-Леоне и от паци-

ентки с ЛЛJ в Германии, обнаружив значительные генетические различия. S.Vieth *et al.* [57] провели анализ последовательности большого фрагмента РНК нескольких штаммов ВЛ разного географического происхождения (Нигерия, Гана, Кот-Д'Ивуар и Сьерра-Леоне) и сделали вывод о том, что вирусы семейства *Arenaviridae* генетически наиболее близки к представителям рода *Nairovirus*. Филогенетический анализ показал, что ВЛ представляет собой четыре эволюционных линии, три из которых обнаружены в Нигерии, а четвертая – в Гвинее, Либерии и Сьерра-Леоне. По сравнению с аренавирусами Нового Света, Ласса и другие аренавирусы Старого Света либо прошли более короткий период дивергенции, либо эволюционируют с меньшей скоростью [15].

Таким образом, при рассмотрении ЛЛJ на предмет соответствия критериям и категориям актуальности для санитарной охраны территории становится очевидным, что в отношении этой инфекции необходимо проведение ограничительных и противоэпидемических мероприятий, которые снижают возможность заноса и распространения ЛЛJ на неэндемичных территориях. При недостаточном контроле за истребительными мероприятиями в отношении переносчиков возможен завоз зараженных грызунов в аэропорты и порты неэндемичных стран. Последовательная и систематическая борьба в эндемичных районах с носителями возбудителя ЛЛJ; своевременная изоляция больных и контактировавших; контроль за транспортными средствами, прибывающими из эндемичных стран, могут полностью предотвратить или ограничить завоз инфекции международным транспортом и больными в неэндемичные страны.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Евсеев А.А., Дворецкая В.И., Богатиков Г.В. и др. // *Вопр. вирусол.* – 1991. – № 2. – С. 150–152. – 2. Илькевич И.Г., Лемешко Н.Н., Марьянкова Р.Ф. и др. // *Вопр. вирусол.* – 1988. – № 1. – С. 75–81. – 3. Краснянский В.П., Градобоев В.Н., Борисевич И.В. и др. // *Вопр. вирусол.* – 1997. – № 2. – С. 71–74. – 4. Лукашевич И.С., Орлова С.В., Марьянкова Р.Ф., Баркар Н.Д. // *Вопр. вирусол.* – 1985. – № 5. – С. 595–599. – 5. Орлова С.В., Годнева А.Т., Игнатьев Г.М., Быстрова С.И. // *Вопр. вирусол.* – 1990. – № 1. – С. 59–61. – 6. Санитарная охрана территории. Организация и проведение первичных мероприятий в случаях выявления больного (труппа), подозрительного на заболевание карантинными инфекциями, контактирующими вирусными геморрагическими лихорадками, малярией и инфекционными болезнями неясной этиологии, имеющими важное международное значение. Методические указания МУ 3.4.1028-01. – М.: Минздрав России, 2002. – 7. Соколов В.Е. Систематика млекопитающих (Отряды: зайцеобразных, грызунов). – М.: Высшая школа, 1977. – 494 с. – 8. Титенко А.М., Ботвинкин А.Д., Андаев Е.И. // *Пробл. особо опасных инфекций.* – 2003. – Вып. 85. – С. 41–49. – 9. Титенко А.М. // *Пробл. особо опасных инфекций.* – 2004. – Вып. 86. – С. 48–53. – 10. Фидаров Ф.М., Сурикова Л.Е., Ерофеева Н.И. и др. // *Вопр. вирусол.* – 1990. – № 4. – С. 326–329. – 11. Armignacco O., Lauria F.N., Puro V. *et al.* // *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* – 2001. – Vol. 15, N 3. – P. 314–321. – 12. Baize S., Kaplon J., Faure C. *et al.* // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 172, N 5. – P. 2861–2869. – 13. Bausch D.G., Rollin P.E., Demby A.H. *et al.* // *J. Clin. Microbiol.* – 2000. – Vol. 38, N 7. – P. 2670–2677. – 14. Bausch D.G., Demby A.H., Coulibaly M. *et al.* // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2001. – Vol. 1, N 4. – P. 269–281. – 15. Bowen M.D., Rollin P.E., Ksiazek T.G. *et al.* // *J. Virol.* – 2000. – Vol. 74, N 5. – P. 6992–7004. – 16. Crotty S., Cameron C., Andino R. // *J. Mol. Med.* – 2002. – Vol. 80, N 2. – С. 86–95. – 17. Cummins D., McCormic J.B., Bennett D. *et al.* // *JAMA.* – 1990. –

- Vol. 264, N 16. – P. 2093–2096. – 18. Demby A.H., Inapogui A., Kargbo K. *et al.* // Vector Borne Zoonotic Dis. – 2001. – Vol. 1, N 4. – P. 283–297. – 19. Djavani M., Yin C., Lukashovich I.S. *et al.* // J. Hum. Virol. – 2001. – Vol. 4, N 2. – P. 103–108. – 20. Elliott L.H., McCormic J.B., Johnson K.M. // J. Clin. Microbiol. – 1982. – Vol. 16, N 4. – P. 704–708. – 21. Fisher-Hoch S.P., McCormic J.B., Auperin D. *et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. – Vol. 86, N 1. – P. 317–321. – 22. Fisher-Hoch S.P., Tomori O., Nasidi A. *et al.* // BMJ. – 1995. – Vol. 311, N 7009. – P. 857–859. – 23. Fisher-Hoch S.P., Hutwagner L., Brown B., McCormic J.B. // J. Virol. – 2000. – Vol. 74, N 15. – P. 6777–6783. – 24. Fisher-Hoch S.P., McCormic J.B. // Rev. Med. Virol. – 2001. – Vol. 11, N 5. – P. 331–341. – 25. Frame J.D., Baldwin J.M., Gocke D.J., Tronp J.M. // Amer. J. Trop. Med. Hyg. – 1970. – Vol. 19, N 4. – P. 670–676. – 26. Frame J.D., Casals J., Dennis E.A. // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. – 1979. – Vol. 73, N 2. – P. 219–224. – 27. Geisbert T.W., Jones S., Fritz E.A. *et al.* // PLoS Med. – 2005. – Vol. 2, N 6. – P. 183. – 28. Gonzalez J.P., Josse R., Johnson E.D. *et al.* // Res. Virol. – 1989. – Vol. 140. – P. 319–331. – 29. Gunther S., Emmerich P., Laue T. *et al.* // Emerg. Infect. Dis. – 2000. – Vol. 6, N 5. – P. 466–476. – 30. Gunter S., Weisner B., Roth A. *et al.* // J. Infect. Dis. – 2001. – Vol. 184, N 3. – P. 345–349. – 31. Helmick C.G., Webb P.A., Scribner C.L. *et al.* // Lancet. – 1986. – Vol. 2, N 8517. – P. 1202–1205. – 32. Hirabayashi Y., Oka S., Goto H. *et al.* // Nippon Rinsho. – 1989. – Vol. 47, N 1. – P. 71–75. – 33. Hotta H. // Rinsho Biory. – 1998. – Vol. 46, N 7. – P. 651–655. – 34. <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dspages/lassaf.htm> – 35. <http://www.itg.be/itg/DistanceLearning/LectureNotesVandenEndenE/15-Hantavirusesp.htm> – 36. Imported Lassa fever – New Jersey, 2004 // MMWR Morb. Mortal Wkly Rep. – 2004. – Vol. 53, N 38. – P. 894–897. – 37. Jahrling P.B., Frame J.D., Rhoderick J.B., Monson M.H. // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. – 1985. – Vol. 79, N 3. – P. 380–384. – 38. Johnson K.M., Taylor P., Elliott L.H., Tomori O. // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 1981. – Vol. 30, N 6. – P. 1291–1293. – 39. Johnson K.M., McCormic J.B., Webb P.A. *et al.* // J. Infect. Dis. – 1987. – Vol. 155, N 3. – P. 456–464. – 40. Johnson E.D., Gonzales J.P., Georges A. // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. – 1993. – Vol. 87, N 5. – P. 530–535. – 41. Knobloch J., McCormic J.B., Webb P.A. *et al.* // Tropenmed. Parasitol. – 1980. – Vol. 31, N 4. – P. 389–398. – 42. Lukashovich I.S., Clegg J.C., Sidibe K. // J. Med. Virol. – 1993. – Vol. 40, N 3. – P. 210–217. – 43. McCormic J.B., King I.J., Webb P.A. *et al.* // N. Engl. J. Med. – 1986. – Vol. 314, N 1. – P. 20–26. – 44. McCormic J.B., Walker D.H., King I.J. *et al.* // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 1986. – Vol. 35, N 2. – P. 401–407. – 45. McCormic J.B., Webb P.A., Krebs J.W. *et al.* A prospective study of the epidemiology and ecology of Lassa fever // J. Infect. Dis. – 1987. – Vol. 155, N 3. – P. 437–444. – 46. Mitchell S.W., McCormic J.B. // J. Clin. Microbiol. – 1984. – Vol. 20, N 3. – P. 486–489. – 47. Monson M.H., Cole A.K., Frame J.D. *et al.* // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 1987. – Vol. 36, N 2. – P. 408–415. – 48. Okoror L.E., Esumeh F.I., Agbonlahor D.E., Umolu P.I. // Trop. Doc. – 2005. – Vol. 35, N 1. – P. 16–17. – 49. Pushko P., Geisbert J., Parker M. *et al.* // J. Virol. – 2001. – Vol. 75, N 23. – P. 11677–11685. – 50. Ruo S.L., Mitchell S.W., Kiley M.P. *et al.* // J. Gen. Virol. – 1991. – Vol. 72, Pt. 3. – P. 549–555. – 51. Saluzzo J.F., Adam F., McCormic J.B., Digoutte J.P. // J. Infect. Dis. – 1988. – Vol. 157, N 3. – P. 605. – 52. Schmitz H., Kohler B., Laue T. *et al.* // Microbes Infect. – 2002. – Vol. 4, N 1. – P. 43–50. – 53. Ter Meulen J., Lukashovich I., Sidibe K. *et al.* // Am. J. Trop. Med. Hyg. – 1996. – Vol. 55, N 6. – P. 661–666. – 54. Ter Meulen J., Koulemou K., Wittekindt T. *et al.* // J. Clin. Microbiol. – 1998. – Vol. 36, N 11. – P. 3143–3148. – 55. Tomori O., Johnson K. // Acta virol. – 1987. – Vol. 31, N 2. – P. 146–151. – 56. Uckun F.M., Petkevich A.S., Vassilev A.O. *et al.* // BMS. – 2004. – Vol. 4, N 1. – P. 1. – 57. Vieth S., Torda A.E., Asper M. *et al.* // Virology. – 2004. – Vol. 318, N 1. – P. 153–168. – 58. Walker D.H., Wulff H., Murphy F.A. // Am. J. Pathol. – 1975. – Vol. 80, N 2. – P. 261–278. – 59. Yalley-Ogunro J.E., Frame J.D., Hanson A.P. // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. – 1984. – Vol. 78, N 6. – P. 764–770. – 60. Zweighaft R.M., Fraser D.W., Hattwick M.A. *et al.* // N. Engl. J. Med. – 1977. – Vol. 297, N 15. – P. 803–807.

E.I.Andayev, O.V.Melnikova, A.M.Titenko

**Sanitary Protection of a Territory from Importation and Dissemination of Particularly Dangerous Viral Infections. Communication 5. Lassa Fever**

*Irkutsk Anti-Plague Research Institute for Siberia and the Far East, Irkutsk; All-Russia Center of Monitoring and Prediction of Emergency Situations of Natural and Technogenic Origin, Anti-Disaster Center, MES, Moscow*

Analysis of the situation with Lassa fever (LF) in accordance with the previously offered signs and characters, criteria and categories, actual for sanitary protection of territories from particularly dangerous viral infections (PDVI), showed LF to be a contagious PDVI classified as pathogenicity group I, capable of epidemic expansion. In case of LF import to a non-endemic territory, the maximal volume of anti-epidemic measures is recommended to be accomplished because epidemiologic complications may emerge even with the advent of an individual case of the disease.

*Key words:* sanitary protection of a territory, Lassa fever.

Поступила 30.08.06.

УДК 616.932

**Э.А.Москвитина**

**СОВРЕМЕННЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В РАЗВИТИИ СЕДЬМОЙ ПАНДЕМИИ ХОЛЕРЫ**

*Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт*

В работе приведены тенденции в динамике заболеваемости холерой в мире, Африке, Азии и Америке (1997–2006 г.). Тенденция к росту в динамике заболеваемости холерой в мире (темп прироста +12,817 %) определяется тенденцией заболеваемости в Африке (+7,886 %). Образование стойких эндемичных очагов холеры в Африке – одна из основных прогностически неблагоприятных тенденций в развитии седьмой пандемии в современный период. По официальным данным ВОЗ, в мире зарегистрировано 728 импортированных случаев холеры в страны Азии (62,4 %), Европы (22,1 %), Америки, США и Канаду (11,0 %), в Австралию с Океанией (4,1 %) и Африку (0,4 %). Завозной характер холеры в страны Азии и Африки подтвержден при изучении штаммов *V. cholerae* O1 на молекулярном уровне. В современный период отмечена тенденция не только к завозам холеры Бенгал из эндемичных очагов (Индия, Бангладеш) в страны различных континентов, но и ежегодная регистрация инфекции без завозов извне (Китай). Современные тенденции в развитии седьмой пандемии холеры в странах СНГ и России за анализируемый период определяются завозами с (или без) распространением инфекции. Седьмая пандемия холеры продолжается. Прогноз по холере в мире остается неблагоприятным.

*Ключевые слова:* холера, холерный вибрион, пандемия, эндемичные очаги, эпидемиологическая обстановка.

В 1961 г. началась седьмая пандемия холеры Эль-Тор, которая по продолжительности во времени, интенсивности эпидемий, охвату числа стран

при распространении по континентам превышает каждую из шести предшествующих. Семь пандемий холеры в мире начинались в Азии. J. Le Vignelloux

[13], рассматривая холеру в историческом аспекте, отмечает, что «эпидемии в Бенгалии – это удар гонга, эхом которого были вспышки почти по всему миру с 1817 по 1925 год». Но каждый раз, унося тысячи и миллионы жизней, «эта страшная старуха с косой» возвращалась на свою историческую родину. Незыблемым оставалось общепризнанное мнение, что единственным в мире эндемичным очагом холеры являются бассейны рек Ганга и Брахмапутры в Индии, где исторически сложились сочетания природных и социально-экологических условий, обусловивших формирование очага.

Анализ заболеваемости холерой Эль-Тор в мире за период седьмой пандемии свидетельствует о длительно действующих факторах на эпидемический процесс и явно демонстрирует связь между изменениями уровня заболеваемости и активности причинных факторов. Основным из них является периодическое вовлечение в пандемию новых континентов и стран (Азия – 1961 г.; Африка и Европа – 1970; Южная и Центральная Америка – 1991), вплоть до 2007 г. (Африка, Намибия – 2006 г.).

По интенсивности эпидемических проявлений уровень мировой заболеваемости в начале XXI века по-прежнему превышает таковой в 1970-е и 1980-е годы. В последнее десятилетие (1997–2006 гг.) зарегистрировано 1737239 больных холерой в 89 странах мира с максимальными показателями заболеваемости до  $5,967_{0/0000}$ . В структуре мировой заболеваемости за этот период 87,5 % больных холерой приходится на Африку, в 2006 г. – 98,8 % с поражением 36 и 25 стран соответственно. При этом тенденция к росту в динамике заболеваемости холерой Эль-Тор в мире (средний ежегодный темп прироста +12,817 %) определяется тенденцией заболеваемости этой инфекционной болезнью в Африке (+7,886 %).

Одним из ключевых моментов в эпидемиологии холеры, определяющих состояние седьмой пандемии на современном этапе, продолжает оставаться формирование стойких и временных вторичных эндемичных очагов с сезонными подъемами заболеваемости ежегодно и выносами на другие территории, откуда идет отсчет новых эпидемий. К 2007 г. с учетом официальных данных ВОЗ, а также других документированных источников информации в 5 странах Южной, Юго-Западной и Центральной Азии (Индия, Бангладеш, Иран, Афганистан и Китай), 20 странах Восточного (Бурунди, Замбия, Малави, Мозамбик, Танзания, Уганда, Кения, Руанда, Зимбабве), Центрального (Заир, Камерун) и Западного (Гана, Гвинея, Либерия, Нигер, Нигерия, Того, Сенегал, Кот-д-Ивуар и Мавритания) регионов Африки сформировались временные и стойкие эндемичные очаги, где холеру ежегодно регистрируют от пяти до десяти и более лет соответственно.

В этом плане безусловный интерес представляют данные E. Guevart и соавт. [9] о формировании эндемичного очага с 1971 г. на западе Центральной Африки, в Камеруне, на территории, прилегающей

к городу Дуала, расположенному в дельте р. Вури, впадающей в залив Камерун Атлантического океана. Как отмечают авторы, ряд условий и факторов способствуют здесь сохранению возбудителя холеры в объектах окружающей среды – песчано-глинистые почвы, загрязненные грунтовые воды, обширные заболоченные местности, дренажные каналы, заросшие водорослями. Характерны высокие температуры воздуха при низком количестве осадков и засухе в определенные периоды года. Немаловажную роль играют такие социальные факторы как недостаточно развитые системы водоснабжения (из трех миллионов населения только в жилищах 65 тыс. есть водопровод, остальные берут воду из 70 тыс. колодцев). Нечистоты скапливаются в реках и искусственных дренажных каналах, в сезон дождей переливаются на улицы, что при неадекватной системе контроля, малодоступной системе здравоохранения, по мнению авторов, затрудняет проведение эффективных профилактических мер и обуславливает эндемичность холеры в Дуале. К этому следует добавить сообщение Ndiokubwayo J.-B. и соавт. [17] о формировании эндемичного очага на востоке Африки, в районе Великих озер.

Приведенные данные подтверждают ранее установленные [3,4] предпосылки для формирования эндемичных очагов в некоторых странах Африки и Азии. Это географическое положение стран, климатические пояса с экваториальным, экваториально-муссонным, субэкваториальным, муссонным типами климата и определенные природно-климатические условия – показатели суммы эффективных температур, количество осадков, водонасыщенность территорий и другие. Начало сезона и пик дождей, сменяющихся большим количеством дней без осадков, когда, помимо водного, присоединяются другие факторы и пути распространения возбудителя холеры, являются предпосылками ежегодной активизации эпидемического процесса, что характерно для эндемичных территорий. Риск эпидемий, помимо концепции территориального риска, обусловлен также «временным риском», связанным с феноменом Эль-Ниньо, несущим в последние годы засухи и наводнения и как следствие – эпидемии холеры, а также играющим роль в активизации эпидемического процесса на эндемичных территориях Африки и Азии.

Следует отметить, что в некоторых ранее эндемичных странах Африки холеру не регистрируют в последние годы (Сомали, ЮАР, Бенин, Мали и др.). В то же время после семилетнего перерыва отмечены крупные эпидемии в Сенегале – 1227 больных холерой (2004 г.); Анголе – 60071 (2006 г.) и других странах, т.е. характерна периодическая активизация эпидемического процесса.

Удельный вес больных холерой в странах Африки с эндемичными очагами составил 70,5 % от выявленных на континенте. По данным Всемирной Организации Здравоохранения [6], для внедрения надзора за холерой, проведения противоэпидемиче-

ских мероприятий на континенте участвуют представители региональных бюро ВОЗ, ЮНИСЕФ, Красного креста, организаций «Врачи без границ» из Франции, Голландии, Испании и Швейцарии и «Врачи мира». Однако борьба с эпидемиями затруднена из-за нехватки воды, низкого санитарно-гигиенического уровня населения в городах и провинциях.

В Азии выявлена выраженная тенденция к снижению заболеваемости со средним ежегодным темпом –18,510 %. На долю заболеваемости в странах этого континента со стойкими (Индия, Бангладеш) и временными (Иран, Афганистан и Китай) эндемичными очагами приходится 85,0 % больных. Характеризуя тенденции проявления эпидемической и эндемичной холеры в Бангладеш за 33-летний период (1966–1998 гг.), I.M. Longini и соавт. [14] указывают, что, несмотря на почти 200-летнюю историю исследований, механизмы, способствующие сохранению эндемичной холеры и периодическим эпидемическим вспышкам, остаются до конца не изученными. Исследователи подчеркивают значимость наличия или отсутствия иммунитета у населения с учетом циркулирующих по серовару штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп. По мнению R.Colwell и соавт. [7], D.Sack [20], C.Matz и соавт. [15], L.Hall-Stoodley [10], S.M.Faruque и соавт. [8], безусловную и определяющую роль на эндемичных территориях играют экологические условия водных объектов, благоприятные для накопления и сохранения холерных вибрионов, в том числе за счет возможного формирования последними биопленки.

Обобщив приведенные материалы, нами установлено, что в структуре заболеваемости холерой в мире на долю инфекции в странах с эндемичными очагами Азии и Африки приходится 71,0 % больных. Это дает основание констатировать, что в мире в современный период складывается ситуация, обусловленная регистрацией холеры в основном в эндемичных очагах, формирование которых при холере Эль-Тор имеет тенденцию к закреплению не только в Азии, что было характерно для классической холеры, но и в ряде стран Африки.

Образование стойких эндемичных очагов холеры в Африке – одна из основных прогностически неблагоприятных тенденций в развитии седьмой пандемии в современный период. Здесь уместно напомнить, что в предшествующие пять пандемий (со второй по шестую) холера, вторгаясь в различные регионы этого континента, не укоренялась.

В современный период этапность, последовательность поражения стран, характерная для пандемического распространения холеры в странах Латинской Америки, прекратилась. Об этом свидетельствует выраженная тенденция к снижению в динамике заболеваемости в странах Америки со средним ежегодным темпом – 56,961 %. Так, за последние пять лет (2002–2006 гг.) в ВОЗ поступили сообщения о 53 больных из Гватемалы (2), Бразилии (26) и Эквадора (25) только в 2004 и 2005 г. За этот

период ВОЗ ежегодно информировала о завозах холеры в США и Канаду.

С 1997 по 2006 год в мире зарегистрировано 728 импортированных случаев холеры. В структуре завозов по континентам мира наибольший удельный вес приходится на страны Азии – 62,4 % (454), в Европе частота их составила 22,1 % (161), Америке, США и Канаде – 11,0 % (80), в Австралии с Океанией – 4,1 % (30) и в Африке – 0,4 % (3). Завозной характер холеры в страны Азии и Африки подтвержден при изучении штаммов *V. cholerae* O1 на молекулярном уровне [12, 19, 21].

Исходя из классического определения понятия, пандемия – это необычно широкое континентальное или глобальное распространение болезни на достаточно высоком уровне [1, 2], а также в соответствии с социально-экологической концепцией относительно территориальной дифференциации инфекционных болезней [5], согласно которой социально-экологическая система эпидемического процесса, состоящая из региональных соцэкосистем, аналогична традиционному понятию «пандемия», седьмая пандемия холеры продолжается.

Прогноз о возможном начале восьмой пандемии холеры, обусловленной *Vibrio cholerae* O139 серогруппы, не оправдался. С 1992 г. эпидемические проявления холеры Бенгал ежегодно отмечают в Индии и Бангладеш. Имели и продолжают иметь место заносы с распространением инфекции в страны Азии: Шри-Ланку (1993), Непал (1993), Китай (1993–1999, 2004–2006 гг.), Пакистан (1993, 2002–2003), Таиланд (1993, 1994, 1998), Малайзию (1993, 1998) и Бирму (1995). Зарегистрированы завозы холеры Бенгал в страны Европы – Эстонию, Германию, Великобританию, Данию, Францию, Россию; Азии – Киргизию, Узбекистан, Казахстан, Гонконг, Японию, а также в США [18, 22, 23].

Таким образом, холерные вибрионы O139 серогруппы пятнадцать лет вызывают различные по интенсивности эпидемиологические осложнения на исторической родине классических холерных вибрионов, которые в 1960-е годы были вытеснены холерными вибрионами эльтор. Некоторые штаты Индии и районы Бангладеш стали эндемичными по холере Бенгал, что подтверждено не только ежегодной регистрацией заболеваемости, а также экологическими исследованиями по обнаружению в объектах окружающей среды жизнеспособных, но некультивируемых форм вибрионов O139 в течение 10–12 мес. [11]. В современный период отмечена тенденция не только к завозам холеры Бенгал из эндемичных очагов в страны различных континентов, но и ежегодная регистрация инфекции без завозов извне (Китай).

Основные эпидемиологические аспекты холеры в современный период определяются распространением инфекции, вызванной *V. cholerae eltor* с выраженным полиморфизмом в структуре геномов различных штаммов, выделенных в различных географических регионах мира. Nair G.B. и соавт. [16]



сообщили об исчезновении классического биотипа *V. cholerae* O1 в южных штатах Бангладеш, Матлабе – последней нише, где он преобладал. Однако авторам удалось идентифицировать у больных с диареей разновидности *V. cholerae* O1 биовара эльтор – Матлабские – с фено- и генотипическими признаками классического биовара. A.Safa и соавт. [21] установили генетическое родство между матлабскими вариантами, как считают авторы, способными вызвать пандемию, и штаммами *V. cholerae* O1, выделенными во время эпидемии в Мозамбике, чем подтвержден завоз их в Африку.

Ключевым среди тенденций в развитии седьмой пандемии продолжает оставаться клональное разнообразие циркулирующих штаммов холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп. Это обуславливает особую актуальность работ молекулярно-генетического и экологического направления, раскрывающих механизмы адаптации холерных вибрионов в условиях окружающей среды, переживания в межэпидемический период. Указанное положение является базисом при эпидемиологическом анализе и выяснении генеза вспышек, характеристике особенностей эпидемического процесса с учетом свойств возбудителя как системообразующего фактора в популяции населения на различных иерархических уровнях – соэкологическом и экологическом (различные по интенсивности, типам, характеристике во времени эпидемии, вспышки, спорадические случаи с учетом социальной среды обитания), органном (клинические проявления – от алгидных форм до вибрионосительства), клеточном (различия изолятов по фенотипу) и молекулярном для установления генетических связей между холерными вибрионами со сходными фенотипическими свойствами, но с разным эпидпотенциалом.

Повышение адаптации токсигенных вибрионов эльтор в ходе эволюции к выживанию во внешней среде за счет генов, входящих в приобретенные острова пандемичности VSP-1 и VSP-2, и других биологических свойств может быть предпосылкой и обеспечивать формирование эндемичных очагов при соответствующих социальных и природных условиях.

Нельзя не отметить продолжающиеся тенденции в формировании антибиотикорезистентности (плазмидного и хромосомного происхождения) среди циркулирующих штаммов холерного вибриона в странах Азии, Африки и на других континентах. По мнению отечественных и зарубежных исследователей, необходим постоянный мониторинг антибиотикочувствительности/резистентности эпидемических штаммов как составной тактики и стратегии борьбы с холерой, в том числе для предотвращения формирования эндемичных очагов.

Мониторинг эпидемиологической ситуации в мире, в том числе странах СНГ и России, осуществляемый с использованием фактографических проблемно ориентированных баз данных «Холера Эль-Тор. Мир», «Холера Эль-Тор. Мир. Административные

территории», «Холера Эль-Тор. СНГ. Россия», созданных в РостНИПЧИ, является неотъемлемой частью эпидемиологического надзора за холерой на глобальном и других территориальных уровнях.

Современные тенденции в развитии седьмой пандемии холеры в странах СНГ и России за анализируемый период (1997–2006 гг.) определяются завозами инфекции с (или без) распространением инфекции.

В странах СНГ отмечена тенденция к снижению в динамике заболеваемости в 2006 г. относительно 1997 (средний ежегодный темп – 46,165 %). Вспышки и спорадические случаи отмечены в Казахстане (1997, 2005 г.), Туркменистане и Узбекистане (1997), в Азербайджане и Армении (1998) и на Украине (1999–2001, 2003).

Крупные вспышки в 1970-е годы, эпидемия холеры в Дагестане в 1994 г. и другие имевшие место эпидемические осложнения в начале XXI века определяют в целом неустойчивую эпидемиологическую обстановку в стране с тенденцией снижения в 2006 г. при темпе – 18,052 % (относительно 1997 г.).

Начало седьмой пандемии холеры в России и все последующие вспышки и спорадические случаи были связаны в основном с завозами холеры с последующим формированием эпидемических очагов. При анализе международной и внутригосударственной миграции населения (с 1990 г.) установлено 137 завозов в 25 различных по типам эпидемических проявлений холеры субъектов в основном из стран Азии – Индии, Сирии, Ирана, Пакистана, Шри-Ланки, Китая, стран СНГ – Казахстана и Таджикистана. Наибольшее число завозов отмечено в Центральном и Приволжском федеральных округах (70,1 %). В настоящее время продолжает существовать реальная угроза завоза холеры всеми видами международного транспорта. В России насчитывается 295 пунктов пропуска через государственную границу в 60 субъектах, в том числе в аэропортах – 67 (22,7 %), морских (речных) – 81 (27,5 %), автодорожных – 108 (36,6 %) и железнодорожных – 39 (13,2 %), связанных в том числе со странами, неблагополучными по холере.

С использованием сведений проблемно-ориентированной базы данных «Холерные вибрионы. Россия» установлено, что в период с 1997 по 2006 год на 41 административной территории страны из более чем 180 объектов окружающей среды, воды поверхностных водоемов в местах водозаборов, рекреационного водопользования, сброса сточных вод и др. выделено 749 штаммов холерных вибрионов O1 и 53 O139 серогруппы.

При этом удельный вес холерных вибрионов O1 серогруппы, биовара эльтор, содержащих гены основных факторов вирулентности – холерного энтеротоксина (ctxAB) и токсинорегулируемых пилей (tcpA), изолированных, как правило, в период эпидемических осложнений, составил 3,8 %. Доля атоксигенных, не содержащих ctx AB гена холерных вибрионов O1 серогруппы, – 89,4 %, атоксигенных холерных вибрионов O139 серогруппы – 6,8 %.

На основании характеристики современных тенденций в развитии седьмой пандемии прогноз по холере в мире остается неблагоприятным. Подтверждением этому являются крупные эпидемии и вспышки в более чем 30 странах Азии (Индия, Ирак и др.), Африки (Судан, Ангола, Заир, Руанда, Кения, Замбия, Зимбабве, Уганда и др.), завозы в страны Европы, США и Канаду в 2007 г. Прогноз для России, где обстановка по холере оценивается нами как неустойчивая, остается неблагоприятным в плане возможных завозов инфекции всеми видами международного транспорта. Основное и первостепенное значение имеет осуществление эпидемиологического надзора за холерой на всех этапах выявления больных с подозрением на инфекцию, начиная от пунктов пропуска через Государственную границу России, а также мониторинга за водными объектами I и II категорий, предусмотренного системой социально-гигиенического мониторинга и эпидемиологического надзора для предотвращения вспышек не только холеры, но и других инфекционных болезней.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бароян О.В. Судьба конвенционных болезней (*прошлое, настоящее, будущее*). – М.: Медицина, 1971. – 326 с. – 2. Бургасов С.П. Пандемия // БМЭ. – М.: Советская энциклопедия, 1982. – Т. 18. – Изд. 3-е. – С. 743–744. – 3. Москвитина Э.А., Беспалов И.А., Ломов Ю.М., Горобец А.В. // Холера и патоген. для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. – Ростов н/Д, 2001. – Вып. 14. – С. 10–12. – 4. Москвитина Э.А., Беспалов И.А., Прометной В.И. // Холера. Матер. VIII Росс. науч.-практ. конф. по проблеме «ХОЛЕРА». – Ростов н/Д, 2003. – С. 34–38. – 5. Черкасский Б.Л. Системный подход в эпидемиологии. – М.: Медицина, 1988. – 283 с. – 6. Wkly. Epidem. Rec. – 2006. – Vol. 81, N 31. – P. 297–307. – 7. Colwell R.R., Huq A., Islam M.S. *et al.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2003. – Vol. 100, N 3. – P. 1051–1055. – 8. Faruque S.M., Biswas K., Udden S.M. *et al.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol. 103, N 16. – P. 6350–6355. – 9. Guevart E., Noeske J., Solle J. *et al.* // Med. Trop. (Mars.). – 2006. – Vol. 66, N 3. – P. 283–291. – 10. Hall-Stoodley L., Stoodley P. // Trends Microbiol. –

2005. – Vol. 13, N 1. – P. 7–10. – 11. Jesudason M.V., Balaji V., Mukundan U., Thomson C.J. // Epidemiol. Infect. – 2000. – Vol. 124, N 2. – P. 201–206. – 12. Kam K.M., Luey C.K., Tsang Y.M. *et al.* // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41, N 10. – P. 4502–4511. – 13. Le Viguelloux J. Bull. Wlth. Org. – 1965. – Vol. 32. – P. 515–530. – 14. Longini I.M.Jr., Yunus M., Zaman K. *et al.* // J. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 186, N 2. – P. 246–251. – 15. Matz C., McDougald D., Moreno A.M. *et al.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 2005. – Vol. 102, N 46. – P. 16819–16824. – 16. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A. *et al.* // J. Clin. Microbiol. – 2002. – Vol. 40, N 9. – P. 3296–3299. – 17. Ndiokubwayo J.B., Niyongabo T., Ndayiragije A. *et al.* // Mol. Trop. (France). – 2001. – Vol. 61, N 3. – P. 266. – 18. Qu M., Xu J., Ding A. *et al.* // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41, N 6. – P. 2306–2310. – 19. Roy S., Dutta B., Ghosh A.R. *et al.* // Trop. Med. Health. – 2005. – Vol. 10, N 6. – P. 604–611. – 20. Sack D. // Glimpse. – 2005. – Vol. 27, N 1–2. – P. 2. – 21. Safa A., Bhuiyan N.A., Nusrin S. *et al.* // J. Med. Microbiol. – 2006. – Vol. 55, Pt. 11. – P. 1563–1569. – 22. Siddique F.J., Bhutto N.S., von Seidlein L. *et al.* // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. – 2006. – Vol. 100, N 5. – P. 476–482. – 23. Wkly. Epidem. Rec. – 1992–2006.

E.A.Moskvitina

#### Current Trends in the Evolution of the Seventh Cholera Pandemics

Rostov Anti-Plague Research Institute

The major trends were defined in the dynamics of cholera incidence over the world: in Africa, Asia, Americas (1997–2006). The tendency towards the increase in the dynamics of cholera morbidity in the world (rate of growth +12.817 %) was found to be dependent on the incidence trends in Africa (+7.886 %). Formation of stable endemic foci in Africa is nowadays a prognostically important unfavorable index of the 7<sup>th</sup> cholera pandemic evolution. According to WHO's formal information, 728 imported cases of cholera were reported worldwide from the countries of Asia (62.4 %), Europe (22.1 %), Americas, from the USA and Canada (11 %), Australia and Oceania (4.1 %), as well as from Africa (0.4 %). The imported character of cholera outbreaks in different countries of Asia and Africa was confirmed by molecular studies of *V. cholerae* O1 strains. Currently, Bengal cholera is not only registered to be imported to different continents from endemic foci of India and Bangladesh, but also there is a tendency to annually detect cholera infection with no reported importation cases (China). The current trends in the evolution of the seventh cholera epidemics in CIS states and Russia during the analyzed period are determined by the importation of the infection with or without its subsequent spread. The seventh cholera pandemic is still going on. Cholera forecast worldwide remains unfavorable.

*Key words:* cholera, *Vibrio cholerae*, pandemics, endemic foci, epidemiological situation.

Поступила 09.10.07.

УДК 616.981.452:595.775

А.Я.Никитин, В.М.Корзун, Е.Г.Токмакова, Л.П.Базанова

#### АСИММЕТРИЯ В ПРОЯВЛЕНИИ БИЛАТЕРАЛЬНЫХ МОРФ КАК ИНДИКАТОР ХАРАКТЕРА ВЗАИМООТНОШЕНИЙ БЛОХ С ВОЗБУДИТЕЛЕМ ЧУМЫ

Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока

Уровень флуктуирующей асимметрии (ФА) билатеральных признаков у блох отражает определенный характер их взаимоотношений с возбудителем чумы. ФА признаков хетотаксии выше у имаго с наблюдаемыми в преджелудке скоплениями микроба. Кроме того, при заражении блох из групп, исходно различающихся по уровню ФА, большая векторная способность характерна для особей с более высокими значениями этого показателя или собранных на участках природного очага чумы с регистрируемыми эпизоотиями. Эти особенности взаимоотношений проявляются на внутри- и межпопуляционном уровне у нескольких видов отряда *Siphonaptera*, а также у имаго, являющихся гибридами от скрещивания *C. tesquorum altaicus* и *C. t. sungaris*.

*Ключевые слова:* блохи, возбудитель чумы, блок преджелудка, флуктуирующая асимметрия, билатеральные признаки, эпизоотии, гибриды.

Оценка случайной изменчивости в проявлении билатеральных морф (онтогенетических шумов развития) широко используется в качестве чувствитель-

ного индикатора действия неблагоприятных внешних факторов. С одной стороны, она отражает реакцию особей на неоптимальные условия среды обитания,

с другой – определяется генотипической изменчивостью организмов, образующих популяцию, и интенсивностью давления отбора в соответствующей экологической обстановке [2, 9–13, 25, 29–31]. Паразито-хозяинные взаимоотношения характеризуются отрицательным влиянием паразита на хозяина. Как следствие, в нескольких таксономических группах животных выявлена связь уровня флуктуирующей асимметрии (ФА) в проявлении билатеральных признаков хетотаксии с зараженностью особей паразитами [10, 11, 13, 18, 22, 25, 31].

В работе обобщены материалы 10-летних исследований особенностей проявления признаков хетотаксии у представителей отряда *Siphonaptera* в зависимости от их взаимоотношений с возбудителем чумы (*Yersinia pestis*) [3, 16, 17, 20, 22, 29]. Являясь облигатными гематофагами, имаго многих видов блох играют роль специфичного вектора для микроба, который попадает в организм насекомых с кровью во время их питания на прокормителе с бактериемией или септицемией. В преджелудке и желудке блох происходит размножение микроба, отрицательно влияющего на жизнеспособность имаго. В наших исследованиях особое внимание уделено изучению насекомых, у которых в результате интенсивного размножения микроба происходит закупорка преджелудка. Считается, что заблокированные имаго более эффективны в качестве переносчика возбудителя чумы [5, 7, 8, 35]. Вместе с тем это не исключает факт участия в трансмиссивной передаче возбудителя и неблокированных блох [5, 8, 14, 15, 27].

Исследования выполнены на трех видах *Siphonaptera* (*Citellophilus tesquorum*, *Xenopsylla cheopis*, *Amphalius runatus*), один из которых представлен двумя подвидами (*C. tesquorum altaicus* и *C. tesquorum sungaris*), а также гибридных насекомых, полученных в лаборатории путем их скрещивания. Использованы имаго блох, собранные непосредственно из природных стаций в степях Забайкалья, Иркутской области (Усть-Ордынский бурятский национальный округ), Тункинской долины (республика Бурятия) и горно-степных районов Тувы (Мугур-Аксы), Горного Алтая (Кош-Агач), а также особи, полученные после длительного разведения насекомых в условиях инсектария. Уровень ФА характеризовали либо через показатель дисперсии разности в проявлении определенного билатерального признака с двух сторон тела, либо посредством оценки доли асимметричных имаго среди проанализированных особей [2, 13]. Более детальную информацию о проведенных экспериментах можно получить из ранее опубликованных работ [3, 16, 20, 22, 29].

Установлено, что между отдельными популяциями блох всех исследованных видов существуют фенотипические различия по ряду морфологических признаков, в том числе по уровню ФА билатеральных морф [3, 17, 18, 22, 29]. Эти особенности нередко можно трактовать как показатель гомеостатического потенциала особей, в связи с чем изучена связь между

уровнем ФА и характером взаимоотношений имаго насекомых с возбудителем чумы. Во всех лабораторных экспериментах использованы штаммы основного подвида возбудителя (*Y. pestis subsp. pestis*), который вирулентен для белых мышей и морских свинок, что является одним из критериев его патогенности для людей [1, 33]. Кроме того, проведен морфологический анализ блох, собранных в Горно-Алтайском природном очаге, в котором циркулирует *Y. pestis subsp. altaica* – более изменчивый подвида возбудителя с избирательной вирулентностью: высокой для белых мышей и низкой для морских свинок [1, 4, 28]. Последнее обстоятельство принято рассматривать в качестве свидетельства его меньшей опасности для человека.

При исследовании взаимоотношений блох с возбудителем чумы использовано три взаимодополняющих подхода. В первом случае проведено заражение насекомых из разных популяций, для которых выявлены различия по уровню ФА. Во втором – оценивали ФА билатеральных признаков блох, у которых при экспериментальном заражении сформировался или не сформировался блок преджелудка. В третьем – анализировали уровень ФА имаго, собранных с участков природного очага чумы, где зарегистрированы или не зарегистрированы эпизоотии.

Основные результаты проведенных исследований в аспекте возможности использования оценки уровня ФА билатеральных признаков насекомых для характеристики взаимоотношений переносчика и возбудителя можно свести к шести положениям.

1. В Тувинском природном очаге чумы основным носителем является длиннохвостый суслик, а основным переносчиком – его специфичная блоха *C. tesquorum altaicus* [6, 7, 25]. Имаго для экспериментов собраны из двух популяций с Каргинского и Барлыкского участков очага [6]. Заражение блох возбудителем чумы проводили на агонирующих сусликах. Различий по уровню инфицирования у двух групп насекомых не выявлено, их исходная зараженность составила 100 %. Имаго подкармливали через день на интактных длиннохвостых сусликах. Образование бактериальных «глубок» отмечено у особей обеих популяций на 10-е сутки. Однако среди насекомых с Каргинского участка доля имаго с размножающимся чумным микробом составила 9,3, а Барлыкского – 48,4 % (рис. 1, А). Различия по этому показателю достоверны ( $P < 0,01$ ), причем средний уровень ФА по четырем признакам хетотаксии у особей «Каргинской» популяции в два раза ниже, чем у имаго, собранных на Барлыкском участке Тувинского природного очага чумы [3, 22]. Доля заблокированных блох в обеих популяциях достоверно не различалась и составляла, соответственно, 2,3 и 6,5 % для особей из Каргинской и Барлыкской группировок.

2. В опыте с инсектарными культурами *C. tesquorum sungaris*, происходящими с двух удаленных неочаговых территорий (Тункинская долина в республике Бурятия и Усть-Ордынский бурятский нацио-

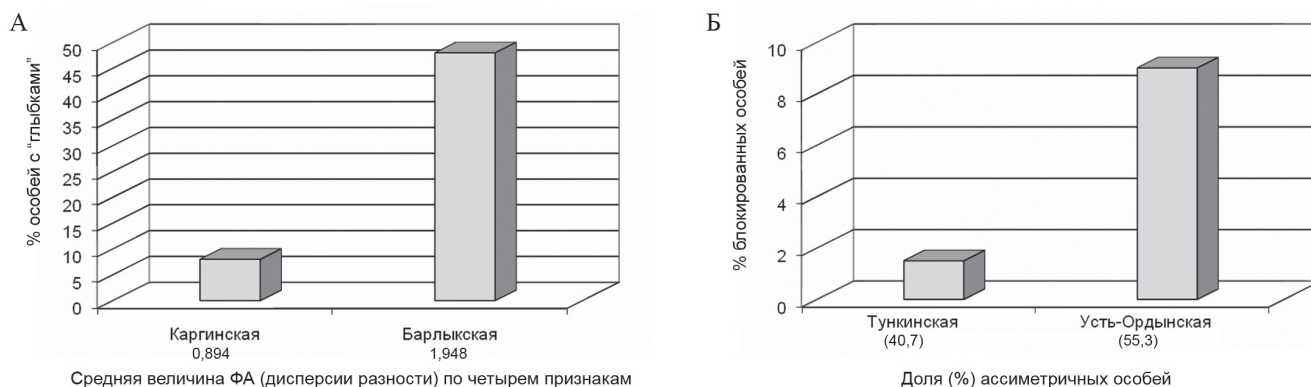


Рис. 1. Оценка характера взаимоотношений возбудителя чумы с имаго *C. tesquorum*, различающихся по уровню ФА:

А – интенсивность образования «глыбок» микроба в блохах из двух популяций Тувинского природного очага чумы;  
 Б – интенсивность образования микробом чумы полных блоков в блохах из двух популяций с неочаговых территорий

нальный округ в Иркутской области), показано, что уровень блокообразования выше у блох из группировки с большей долей ассиметричных имаго (рис. 1, Б) [17, 22]. Заражение и подкормки имаго проведены на белых мышах. Таким образом, насекомые из популяций, расположенных вне природных очагов чумы («Тункинская» и «Усть-Ордынская») так же, как и собранные с энзоотических территорий, способны к трансмиссии возбудителя [3, 23]. То есть у определенной доли особей формируются блоки преджелудка, а у животных, инфицированных укусами блох, развивается бактериемия и септическая форма заболевания. Следовательно, способность к трансмиссии является видовым признаком, а межпопуляционные различия по исследованным показателям у насекомых, собранных в пределах природных очагов чумы, и там, где эта инфекция никогда не наблюдалась, имеют количественный характер.

3. Особей Каргинской популяции *C. tesquorum* после их разведения в течение ряда поколений в инсектарии заражали возбудителем чумы на биомембране. В отдельных опытах с периодичностью 2–3 сут проведено от 7 до 19 подкормок блох на белых мышах. После каждой подкормки имаго со сформированным блоком преджелудка отделяли и фиксировали в растворе этанола. Сравнение уровня флуктуирующей асимметрии по четырем признакам хетотаксии у заблокированных и неблокированных самок (два независимых опыта) показало, что уровень ФА больше у заблокированных особей в шести случаях из восьми, при этом в двух – различия достоверны. На рис. 2, А приведены данные, обобщенные для обоих опытов, по всем исследованным признакам. В эксперименте с самцами (один опыт) достоверно больший уровень ФА зарегистрирован у заблокированных особей по сравнению с неблокированными по одному из четырех признаков при аналогичной тенденции в трех остальных случаях (рис. 2, Б) [17, 22].

4. Характер взаимоотношений имаго с возбудителем чумы у полученных в лаборатории гибридов от скрещивания двух подвидов блохи *C. tesquorum* изучали в трех поколениях (F1, F3 и F4). Имаго F1 получены путем гибридизации самок *C. t. sungaris* и

самцов *C. t. altaicus*, а особи F3 и F4 – из культуры от реципрокного скрещивания. Блох инфицировали возбудителем чумы на биомембране. Установлено, что у гибридов блоки преджелудка образуются чаще, чем у родительских подвидов, и они способны эффективно передавать возбудителя чумы белым мышам [24]. При этом в среднем по трем опытам уровень ФА у гибридов выше, чем у исходных форм (рис. 2, В) [22]. Кроме того, во всех вариантах опытов уровень ФА билатеральных признаков хетотаксии выше у заблокированных особей по сравнению с неблокированными (рис. 2, В). Эти различия достоверны для *C. t. altaicus* и гибридов, но у *C. t. sungaris* при общей той же тенденции не достигают статистически значимого уровня. Таким образом, гибриды, то есть насекомые, не имеющие эволюционной истории, характеризуются повышенным уровнем ФА, обладают способностью к трансмиссии возбудителя, и у них формируются бактериальные блоки преджелудка.

5. Исследовано блокообразование и проявление уровня флуктуирующей асимметрии у имаго инсектарной культуры *X. cheopis*, зараженных возбудителем чумы на биомембране [19]. С этим видом блох проведено два опыта. Уровень ФА оценивали по трем признакам. Показано, что у *X. cheopis*, как и у блохи суслика *C. tesquorum*, имаго с блоками и без блоков преджелудка характеризуются разным уровнем онтогенетических шумов по признакам хетотаксии: у заблокированных имаго уровень ФА достоверно выше (рис. 2, Г).

6. Вид *Amphalius runatus* в поливекторном Горно-Алтайском природном очаге чумы является одним из переносчиков возбудителя и характеризуется высокой численностью и способностью к передаче возбудителя чумы теплокровным животным, хотя возможность образования блоков преджелудка у него не подтверждена [14, 15, 21]. Имаго собирали с монгольской пищухи на различных участках эпизоотологического обследования. Анализировали среднюю величину уровня ФА по совокупности трех признаков хетотаксии самцов [20, 29]. Показано, что на участках, где эпизоотии чумы были зарегистрированы, уровень проявления асимметрии билатераль-

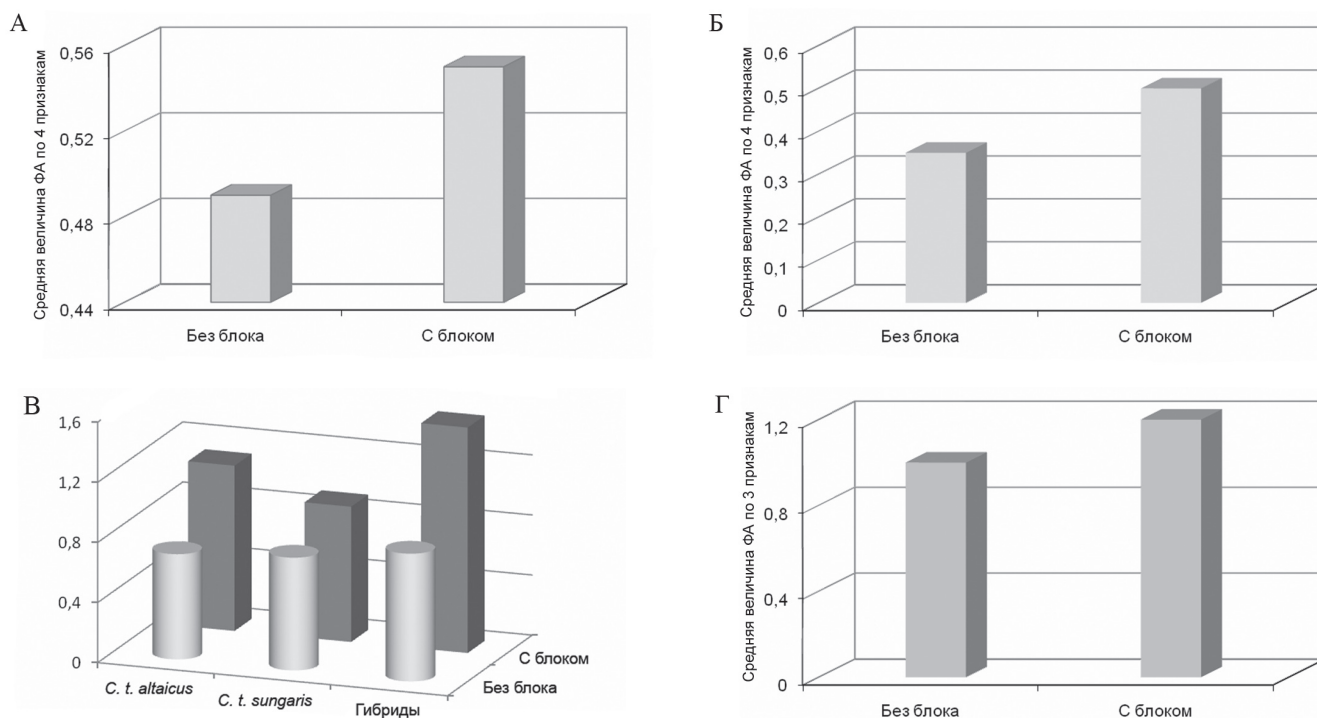


Рис. 2. Оценка уровня ФА у зараженных возбудителем чумы имаго с блоком и без блока преджелудка: Самки (А) и самцы (Б) *C. tesquorum* Каргинской популяции блох из Тувинского природного очага чумы; В – инсектарные культуры блох двух подвидов *C. tesquorum* и гибридов между ними; Г – имаго *X. cheopis*

ных признаков у имаго выше, чем у насекомых, паразитирующих на пищуках с территорий, где в этот период времени эпизоотий не наблюдали (рис. 3).

Вся совокупность полученных данных подтверждает принципиальную возможность использования уровня ФА блох как маркера определенного характера взаимоотношений в системе паразит – хозяин. С одной стороны, ФА признаков хетотаксии у заблокированных насекомых или имеющих в их преджелудке конгломерат (глыбки) возбудителя выше, чем у имаго без видимых скоплений микроба. С другой стороны, при заражении вирулентными штаммами возбудителя чумы имаго из групп, исходно различающихся по уровню ФА, большая векторная способность характерна для блох с более сильными онтогенетическими шумами в проявлении признаков хетотаксии. Кроме

того, она выше у насекомых с эпизоотических участков по сравнению с блохами, собранными с территорий, где эпизоотии в это время не регистрируются. Эти различия выявлены как на внутривидовом, так и на межвидовом уровне у нескольких видов отряда *Siphonaptera*, а также у гибридных особей. Показано, что для более объективной характеристики особей по уровню ФА предпочтительнее проводить анализ нескольких признаков [16].

Таким образом, оценка уровня ассиметрии в проявлении билатеральных морф имаго блох является достаточно универсальным индикатором трансмиссивной способности насекомых. Как уже указывалось [2, 9–13, 22, 30], повышенный уровень ФА билатеральных признаков отражает меньшую устойчивость организмов к неблагоприятным воздействиям факторов внешней среды, который может возникать вследствие разбалансированности генома. В нашем случае, по-видимому, имаго, восприимчивые к заражению *Y. pestis* и способные к его передаче животным-прокормителям, при высоком уровне онтогенетических шумов обладают меньшей физиологической резистентностью к микробу. Известно, что уровень флуктуирующей ассиметрии наследственно детерминирован и при сравнении разных групп особей, содержащихся в одинаковых условиях, возможно выявление генотипических различий по этому признаку [9, 13]. Следовательно, не исключено, что между группами блох с наличием и отсутствием блока преджелудка существуют некоторые генотипические различия, проявляющиеся и в уровне ФА. Однако для однозначного вывода об этом нужны до-

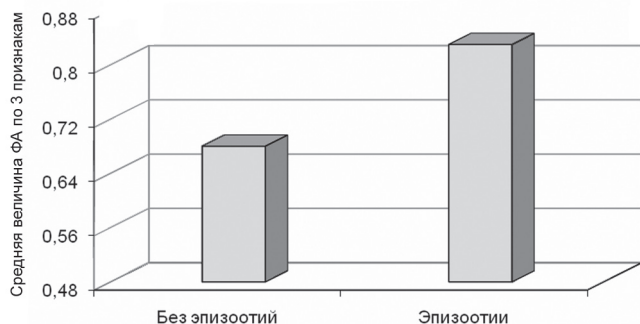


Рис. 3. Оценка уровня ФА у самцов *A. runatus*, собранных с монгольской пищухи на участках Горно-Алтайского природного очага чумы с эпизоотиями и без эпизоотий

полнительные исследования.

Данные молекулярно-генетических исследований возбудителя чумы последних лет указывают на относительно недавнее происхождение этого вида и, следовательно, о молодости самой паразитарной системы [26, 32–37]. Гораздо меньше информации по этому вопросу получено при исследовании других сочленов эпизоотической триады. Так, фактами, противоречащими представлениям о длительной коэволюции блох и *Y. pestis*, считают наличие в пределах одного рода *Siphonaptera* видов, существенно различающихся по эффективности передачи микроба; сходную эффективность передачи возбудителя блохами, принадлежащими к отдаленным родам; значительный «вред», который приносит возбудитель его эффективным переносчикам; относительно низкую эффективность трансмиссивного способа обеспечения циркуляции *Y. pestis* в природных очагах чумы; отсутствие преимуществ, которые микроб мог бы извлечь из эффективного способа передачи – заблокированными блохами, так как и вектор и реципиент при этом быстро погибают [34, 35]. К разряду подобных фактов можно отнести описанную в работе способность к эффективной трансмиссии и формирование блоков преджелудка у блох, происходящих с неочаговых территорий и у гибридов. Вместе с тем более высокая восприимчивость к возбудителю у насекомых с неустойчивым гомеостазом (повышенным уровнем ФА) не несет информации о возможном времени эволюции системы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Апарин Г.П., Голубинский Е.П. Микробиология чумы (руководство). – Иркутск; Изд-во Иркут. ун-та, 1989. – 91 с. – 2. Астауров Б.Л. Историко-биологические исследования. – М.: Наука, 1978. – С. 114–116. – 3. Базанова Л.П., Вержуцкий Д.Б., Никитин А.Я. и др. // Мед. паразитол. – 2004. – № 1. – С. 37–39. – 4. Балахонов С.В., Шестопалов М.Ю. // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – Иркутск, 2004. – Т. 2, № 1. – С. 34–38. – 5. Ващенко В.С. Блохи – переносчики возбудителей болезней человека и животных. – Л.: Наука, 1988. – 161 с. – 6. Вержуцкий Д.Б. // Паразитол. – 1999. – Т. 33, вып. 3. – С. 242–249. – 7. Воронова Г.А. // Эпидемиол. и профилактик. особо опасных инф. в МНР и СССР. – Улан-Батор, 1978. – С. 152–155. – 8. Воронова Г.А., Базанова Л.П. // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – Иркутск, 2004. – Т. 2, № 1. – С. 58–65. – 9. Гавриков Д.Е. Асимметрия билатеральных признаков природной популяции *Drosophila melanogaster* и ее сезонная динамика: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Иркутск, 2005. – 18 с. – 10. Галактионов Ю.К., Ефимов В.М., Николаева Н.Ф. и др. // Прогноз и интегрированная борьба с вредителями, болезнями и сорняками сельскохозяйственных культур. – Новосибирск, 1991. – С. 64–95. – 11. Евланов Е.А., Колокольникова С.Е. // Паразитол. – 1990. – Т. 24, вып. 4. – С. 309–314. – 12. Ефимов В.М., Галактионов Ю.К., Акимов А.А., Залозная Л.М. // Докл. АН УССР. Сер. Б. Геол., хим. и биол. науки. – 1987. – С. 65–67. – 13. Захаров В.М. Асимметрия животных. – М.: Наука, 1987. – 216 с. – 14. Иннокентьева Т.И. Особенности экологии *Yersinia pestis altaica*: Дис. .... д-ра мед. наук в виде

науч. докл. – Саратов, 1997. – 59 с. – 15. Иннокентьева Т.И., Корзун В.М., Машковский И.К. и др. // Паразитол. – 2004. – Т. 38, вып. 4. – С. 273–287. – 16. Корзун В.М., Никитин А.Я. // Мед. паразитол. – 1997. – № 1. – С. 34–36. – 17. Корзун В.М., Никитин А.Я., Базанова Л.П. и др. // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – Иркутск, 2004. – Т. 2, № 1. – С. 89–94. – 18. Корзун В.М., Никитин А.Я., Токмакова Е.Г. // Зоол. журн. – 1998. – Т. 77, № 2. – С. 209–215. – 19. Корзун В.М., Токмакова Е.Г., Базанова Л.П., Воронова Г.А. // Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане. – Алматы, 2000. – Вып. 2. – С. 122–127. – 20. Корзун В.М., Токмакова Е.Г., Машковский И.К., Михайлов Е.П. // Журн. инф. патол. – Иркутск, 1998. – Т. 5, № 4. – С. 35–37. – 21. Машковский И.К. Очерк популяционной экологии блох монгольской пищухи в Горно-Алтайском природном очаге чумы в связи с их эпизоотологическим значением: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 1987. – 28 с. – 22. Никитин А.Я. Динамика численности популяций членистоногих и совершенствование приемов борьбы с видами-переносчиками болезней человека: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Иркутск, 2006. – 47 с. – 23. Никитин А.Я., Базанова Л.П. // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – Иркутск, 2003. – № 3. – С. 152–155. – 24. Никитин А.Я., Базанова Л.П., Нечаева Л.К. и др. // Мед. паразитол. – 1995. – № 4. – С. 14–17. – 25. Попков А.Ф. Этиология, эпидемиология и диагностика инфекционных заболеваний Восточной Сибири. – Иркутск, 1992. – С. 151–157. – 26. Смирнова Н.И., Кутырев В.В. // Мол. генет. микробиол. и вирусол. – 2006. – № 2. – С. 9–19. – 27. Сулейменов Б.М. Трансмиссия возбудителя чумы «неблокированными» блохами: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Алматы, 1995. – 48 с. – 28. Тимофеева Л.А. // Изв. Иркут. гос. НИПЧИ Сибири и ДВ. – 1959. – Т. 22. – С. 10–16. – 29. Токмакова Е.Г. Динамика фенетической структуры населения блохи *Amphalius runatus* (J. et R., 1923) в Горно-Алтайском природном очаге чумы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Иркутск, 1998. – 21 с. – 30. Шадрин А.Е., Вольперт Я.Л., Данилов В.А., Шидрин Д.Я. Биоиндикация воздействия горно-добывающей промышленности на наземные экосистемы Севера: Морфогенетический подход. – Новосибирск: Наука, 2003. – 110 с. – 31. Яковлев В.Н., Изюмов Ю.Г., Касьянов А.Н. // Науч. докл. высшей школы. Биол. науки. – 1981. – № 2. – С. 95–101. – 32. Achtman M., Morelli G., Zhu P. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol. 101, N 51. – P. 17837–17842. – 33. Anisimov A.P., Linder L.E., Pier G.B. // Clin. Microbiol. Rev. – 2004. – Vol. 17, N 2. – P. 434–464. – 34. Duplantier J.M., Duchemin J.B., Chanteau S., Carniel E. // Vet. Res. – 2005. – Vol. 36. – P. 437–453. – 35. Hinnebusch B.J. // Curr. Issues Mol. Biol. – 2005. – Vol. 7. – P. 197–212. – 36. Wren B. // Microbiol. – 2003. – Vol. 1. – P. 55–64. – 37. Zhou D., Han Y., Song Y. et al. // J. Bacteriol. – 2004. – Vol. 186. – P. 5138–5146.

A.Ya.Nikitin, V.M.Korzun, E.G.Tokmakova, L.P.Bazanova

#### Asymmetry in the Expression of Bilateral Morphs as an Indicator Showing the Character of Interrelations Between Fleas and the Plague Pathogen

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

The level of fluctuating asymmetry (FA) of bilateral signs in fleas was shown to reflect a certain character of their interrelations with *Yersinia pestis*. Flea imagoes that had bacterial aggregations in their proventriculi demonstrated greater signs of FA chaetotaxy. Besides, in the experiments with groups of fleas originally differing in the intensity of FA expression, increased vector capacity was characteristic of individual fleas with higher levels of this index or those caught in the areas of the natural foci where epizootics had been registered. These peculiar interrelations manifested themselves both at intra- and inter-population levels in several species of *Siphonaptera* order, as well as in the imago hybrids originating from crosses between *C. tesquorum altaicus* and *C.t.sungaris*.

**Key words:** fleas, plague pathogen, proventriculus block, fluctuating asymmetry, bilateral signs, epizootics, hybrids.

Поступила 12.03.07.

Н.В.Попов<sup>1</sup>, В.Б.-Х.Санджиев<sup>2</sup>, Г.В.Сангаджиева<sup>2</sup>, А.И.Удовиков<sup>1</sup>, С.А.Яковлев<sup>1</sup>, Т.Б.Караваяева<sup>1</sup>,  
А.В.Подсвиров<sup>2</sup>, В.В.Кутырев

## ВЛИЯНИЕ СОВРЕМЕННОГО ПОТЕПЛЕНИЯ КЛИМАТА НА РАЗВИТИЕ НОВОГО МЕЖЭПИЗОТИЧЕСКОГО ПЕРИОДА ПРИКАСПИЙСКОГО СЕВЕРО-ЗАПАДНОГО СТЕПНОГО ПРИРОДНОГО ОЧАГА ЧУМЫ

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

<sup>2</sup>Элистинская противочумная станция, Элиста

Рассмотрено влияние климатических факторов на развитие двух глубоких депрессий численности малого суслика в 50–60-х и 80–90-х гг. XX столетия в регионе Северо-Западного Прикаспия. Установлена роль современного потепления климата в развитии межэпизоотического периода Прикаспийского Северо-Западного степного природного очага чумы. Отмечена перспективность поиска в межэпизоотический период чумного микроба в почве нор грызунов на участках стойкого проявления чумы.

*Ключевые слова:* малый суслик, динамика численности, климатические факторы, межэпизоотический период, потепление климата, почва нор грызунов.

В современных границах Прикаспийского Северо-Западного степного природного очага чумы на протяжении XX столетия имело место развитие двух крупных многолетних подъемов эпизоотической активности – 1913–1948 и 1972–1990 гг. [9], с последующим установлением длительных межэпизоотических периодов. Наступление нового длительного межэпизоотического периода (с 1991 г.), как и в середине прошлого столетия, совпало с периодом глубокой депрессии численности основного носителя чумы – малого суслика в регионе Северо-Западного Прикаспия и в Предкавказье. Естественная депрессия численности малого суслика в 50–60-х гг. прошлого столетия была значительно усилена проведением крупномасштабных, беспрецедентных в мировой практике, работ по борьбе с грызунами [1]. Именно в результате одновременного суммарного воздействия на популяции малого суслика нескольких неблагоприятных факторов (истребительные мероприятия, климатические условия) была достигнута очень высокая эффективность истребительных работ, численность сусликов повсеместно снизилась, и Прикаспийский Северо-Западный степной очаг стали считать полностью оздоровленным [8]. Напротив, развитие современной, аналогичной по масштабам, депрессии численности малого суслика на территории всего европейского Юго-Востока России проходило, в основном, под влиянием климатических факторов, в первую очередь потепления климата [10].

В настоящем сообщении обобщены материалы, полученные при проведении эпизоотологического обследования современной территории Прикаспийского Северо-Западного степного природного очага в 1945–2006 гг. Привлечены архивные материалы Астраханской, Дагестанской и Элистинской противочумных станций за период 1945–1976 гг., данные банка унифицированных данных РосНИПЧИ «Микроб» за 1977–1993 гг., литературные источники, авторские данные.

В результате выполненного анализа установлено, что в XX столетии первые признаки развития многолетней депрессии численности малого суслика в регионе Северо-Западного Прикаспия зарегистрированы в 1946 г. В период 1946–1964 гг. средние значения фоновой плотности сусликов сократились почти в три раза и в 1964 г. достигли 5,0 особей на 1 га [13]. Одной из основных причин этой глубокой депрессии численности сусликов, наряду с их истреблением, явились крайне неблагоприятные климатические условия, систематически повторявшиеся на протяжении 50–60-х гг. прошлого столетия. Суровые бесснежные зимы, резкие колебания температур в периоды пробуждения и гона сусликов, вызывавшие нарушения прохождения основных фаз жизнедеятельности сусликов, а также дефицит осадков в весенне-летние месяцы, сказывающийся на кормообеспеченности, а следовательно, и на упитанности зверьков – вот та сумма факторов, которая привела к снижению фоновой численности малого суслика на территории Прикаспийского Северо-Западного степного природного очага. В отдельные годы (1947, 1949, 1951, 1952, 1956, 1957, 1959 и 1962) этого неблагоприятного для малых сусликов периода зарегистрирована крайне низкая интенсивность размножения зверьков, равно как и высокий уровень гибели молодняка в весенние месяцы [6]. Аналогичная ситуация в этот период имела место и на территории Волго-Кумского, Терско-Кумского, Калаусско-Кумского, Волго-Уральского и Урало-Эмбенского междуречий, т.е., в широко распространенных в Северном и Северо-Западном Прикаспии полупустынных и пустынных ландшафтах, вымершие поселения сусликов стали обычным явлением. В климатических условиях 50–60-х гг. прошлого столетия наиболее жизнеспособные популяции сусликов сохранились в степной зоне, включающей западные и северные районы Прикаспийского Северо-Западного степного природного очага чумы, в первую очередь, в балочных системах Ергеней и на

Таблица 1

Распределение площадей поселений малого суслика с различной численностью зверьков на Ергенях в 1972–1995 гг.

Год	Обследовано, га	Распределение плотностей по числу особей на 1 га, %					
		0–1	1–5	6–10	11–20	21–30	свыше 30
1972	786700	-	6,4	25,5	28,4	23,2	16,5
1973	727500	-	31,7	26,5	27,1	7,4	7,1
1974	750000	-	50,9	33,8	12,2	2,1	1,0
1975	8992400	14,7	41,0	31,4	10,6	1,6	0,6
1976	1166435	17,2	47,2	28,1	5,7	1,1	-
1977	769770	9,0	41,8	22,5	22,8	3,9	-
1978	893300	2,8	16,5	43,5	24,9	7,1	5,2
1979	954890	2,5	11,3	22,4	44,9	14,3	5,6
1980	603340	-	10,9	40,4	40,9	7,7	-
1981	9114400	-	8,5	46,1	37,9	7,5	-
1982	880656	-	54,5	32,8	10,9	1,8	-
1983	857700	-	65,5	27,8	5,4	1,2	-
1984	826600	-	9,7	75,6	11,6	2,6	0,5
1985	1176220	-	84,3	12,7	2,7	0,3	-
1986	1097220	-	76,2	16,3	6,5	0,9	-
1987	574565	-	51,3	28,1	18,1	2,4	-
1988	943954	-	47,1	35,0	11,7	6,2	-
1989	1176448	-	33,0	37,7	21,0	8,3	-
1990	1315510	-	48,4	29,0	17,4	5,2	-
1991	1258633	-	46,3	42,7	8,0	3,0	-
1992	10691130	-	60,4	34,4	4,0	1,2	-
1993	833870	-	81,0	12,2	5,6	1,1	-
1994	1104518	-	86,0	11,4	2,6	-	-
1995	918270	-	82,0	13,7	4,3	-	-

территории Сарпинской низменности. В частности, в 1946–1955 гг. на Ергенях (в пределах восточной части Ростовской области и Калмыкии) площади, занятые поселениями сусликов с плотностью от 11 до 30 особей на 1 га, составляли до 52–90 %. Вплоть до 1949 г. в центральной и северной части Ергеней сохранялись плотности от 20 до 80 особей на 1 га; в западной - до 65 особей на 1 га. Однако к 1950 г. фоновые показатели плотности зверьков на Ергенинской возвышенности также снизились до 20, в 1952 г. – до 13, а в 1957–1959 гг. достигли своих минимальных показателей – 10 (и менее) особей на 1 га. По мере стабилизации погодных и кормовых условий обитания сусликов в 60-х гг. XX столетия численность зверьков стала вновь постепенно повышаться и в конце 60-х – начале 70-х гг. плотность популяций сусликов в оптимальных местах вновь достигла очень высокого уровня [6].

Однако беспрецедентная по своим масштабам весенне-летняя засуха 1975 г. крайне отрицательно сказалась на популяции сусликов, обусловив значительный спад показателей фоновой численности зверьков. В 1975 г., по сравнению с 1972, на Ергенях площади с высокой численностью сусликов (более

10 особей на 1 га) сократились почти в 5 раз. На территории Прикаспийской низменности снижение численности сусликов носило еще более катастрофический характер – в ложине Даван популяции их сократились примерно в 8; на Черных землях – более чем в 10 раз.

Существенно, что подъем численности малого суслика в начале 70-х гг. прошлого столетия совпал с началом нового эпизоотического периода Прикаспийского Северо-Западного степного природного очага. В 1972–1973 гг. эпизоотии чумы среди сусликов зарегистрированы на территории Ергенинской возвышенности и в Сарпинской низменности [6]. В последующие 1974–1990 гг. единичные проявления чумы зарегистрированы в Сарпинской низменности в 1987 (н.п. Ики-Манлан), 1988 (н.п. Эрдниевский); в ложине Даван – в 1990 (н.п. Сарпа); на Черных землях – в 1986 (н.п. Гашунский) и 1988 гг. (н.п. Кировский). С 1991 г. в Прикаспийском Северо-Западном степном природном очаге находки зараженных (переболевших) чумой животных не зарегистрированы.

Особо отметим, что в 1973–1979 гг. на территории Ергеней и Сарпинской низменности ежегодно проводили истребление сусликов с противозидемическими целями на площади от 42064 до 127130 га при технической эффективности работ 69,0–72,7 %. Кроме того, в окрестностях населенных пунктов ежегодно обрабатывалось наземным методом до 10–12 тыс. га ежегодно. Однако, несмотря на ежегодные авиаобработки, в том числе многократно на одних и тех же территориях, плотность популяций сусликов на истребучастках, как и на всей территории Ергенинской возвышенности, с 1976 г. стали также постепенно повышаться. Последнее подтвердило положение о том, что метод авиационного посева ядовитых приманок, обеспечивающий 70 % гибель сусликов, приводит к значительному снижению численности только в периоды депрессивного состояния их популяций. В отличие от истребительных мероприятий, проведенных на территории Прикаспийского Северо-Западного степного природного очага до 1960 г., работы по борьбе с сусликами 1973–1978 гг., проводимые в период общего подъема их численности, оказались менее эффективными. Однако этот последний подъем численности вновь был купирован в 1979 г., когда вследствие холодной весны в популяциях сусликов наблюдался чрезвычайно низкий приплод молодняка, наживровка которого проходила в условиях последовавшей засухи. Все это привело в 1980 г. к заметному сокращению удельного веса участков с повышенной плотностью сусликов (от 11 особей на 1 га и выше) на всей территории Северо-Западного Прикаспия (табл. 1).

В последующие 80–90-е гг. XX столетия на фоне роста увлажненности региона и повышения температуры зимних месяцев популяции малого суслика в регионе Северо-Западного Прикаспия так и не вышли из состояния глубокой депрессии. Начавшаяся в 1980 г.



Таблица 2

Сроки пробуждения малого суслика на Ергенинской возвышенности в 1969–1976 и 1996–2006 гг.

Год	Декада / месяц	Год	Декада / месяц
1969	2 / 03	1996	3 / 02
1970	3 / 03	1998	1 / 03
1971	2 / 03	1999	3 / 02
1972	2 / 03	2000	1 / 02
1973	2 / 02	2003	1 / 02
1974	1 / 03	2006	1 / 02
1975	3 / 02		
1976	3 / 03		

Примечание. Данные за 1997, 2001–2002 гг. отсутствуют.

очередная многолетняя депрессия численности малого суслика фактически предопределила последующую низкую эпизоотическую активность Прикаспийского Северо-Западного степного природного очага, в том числе и установление здесь нового межэпизоотического периода с 1991 г. В настоящее время фоновая плотность малых сусликов не превышает 5 особей на 1 га, сохраняется тенденция дальнейшего снижения численности этого грызуна. Последнее связано, во многом, с негативными последствиями действия климатических факторов, обуславливающих пробуждение малых сусликов в зимний период (январь, февраль), в условиях частого возврата холодов. Если в 70-х гг. прошлого столетия пробуждение популяций малого суслика на Ергенях проходило в основном в марте, то в последнее десятилетие сроки этого явления сдвинулись на 1 декаду февраля (табл. 2).

В юго-восточных районах очага, в зоне полупустыни (Черные земли), начало пробуждения сусликов в 2005–2006 гг. проходило еще в более ранние сроки – в 3 декаде января.

В настоящее время негативное влияние на состояние численности малого суслика в Прикаспийском Северо-Западном степном природном очаге оказывает также повсеместное увеличение проективного покрытия растительного покрова степных и полупустынных растительных комплексов, вследствие резкого сокращения поголовья скота на территории Калмыкии, Ростовской, Волгоградской и Астраханской областей. В условиях высокого травостоя популяции сусликов наиболее уязвимы для многочисленных дневных хищных птиц, что проявляется, в первую очередь, в значительном увеличении гибели молодняка. Кроме того, в последнее десятилетие здесь повсеместно возросла интенсивность добычи малого суслика населением, что привело в ряде районов к полному исчезновению их обитаемых поселений в окрестностях мелких населенных пунктов и кошар.

В заключение отметим, в XX столетии под влиянием климатических факторов на территории Прикаспийского Северо-Западного степного природного очага чумы имело место развитие двух глубоких депрессий численности малого суслика. Фоновое снижение численности зверьков как в 50–60-е, так

и в 80–90-е гг. прошлого столетия, сопровождалось установлением длительных межэпизоотических периодов. Учитывая, что глубокие естественные или искусственные депрессии численности малого суслика не приводят к ликвидации энзоотии чумы, в настоящее время необходима концентрация исследований в области изучения механизмов этого феномена. Тем более, что согласно сверхдолгосрочному эпизоотологическому прогнозу [12] в первые два десятилетия XXI столетия на территории России в состоянии межэпизоотического периода, наряду с Прикаспийским Северо-Западным степным, будут находиться практически все равнинные природные очаги чумы с аналогичной биоценотической структурой. Наличие выраженной цикличности в многолетней динамике численности малого суслика и эпизоотической активности Прикаспийского Северо-Западного степного природного очага [11] позволяет считать межэпизоотический период одной из основных фаз саморазвития его экосистемы и определяет актуальность выяснения основных механизмов перехода чумного микроба в персистентное состояние [7], равно и реверсии его некультивируемых форм [2, 5]. В настоящее время особый интерес представляет также изучение роли биопленок чумного микроба [14, 15], которые, подобно спорам бактерий, могут обеспечивать длительное сохранение возбудителя чумы во внешней среде. С этой точки зрения в межэпизоотический период необходимо вести направленный поиск чумного микроба в почве нор грызунов на участках стойкого проявления чумы. Полученные ранее положительные результаты таких исследований на территориях Волго-Уральского [4] и Прикаспийского Северо-Западного степных [3] природных очагов чумы однозначно указывают на перспективность такого поиска.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бочарников О.Н., Карпузиди К.С., Климченко И.З. // Природная очаговость и эпидемиол. особо опасных инф. забол. – Саратов, 1959. – С. 235–246. – 2. Бухарин О.В., Гинцбург – М.: Медицина, 2005. – 366 с. – 3. Гаранина С.Б., Самойлова Л.В., Подсвилов А.В. // Природно-очагов. особо опасные инф. на юге России, их профилактика и лаб. диагн. – Астрахань, 2001. – С. 324–327. – 4. Донская Т.Н., Попов Н.В., Бережнов А.З. // Эпизоотол. и профилактик. природно-очаговых инф. – Саратов, 1982. – С. 6–9. – 5. Иннокентьева Т.И. Особенности экологии *Yersinia pestis altaica*: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Саратов, 1997. – 59 с. – 6. Лавровский А.А., Варшавский С.Н., Герасимова Н.Г. // Пробл. особо опасных инф. – 1974. – Вып. 3 (37). – С. 5–17. – 7. Лавровский А.А., Попов Н.В. // Пробл. особо опасных инф. – 1978. – Вып. 2 (60). – С. 5–9. – 8. Миронов Н.П., Тинкер И.С., Ширанович П.И. // Природная очаговость и эпидемиол. особо опасных инф. забол. – Саратов, 1959. – С. 54–64. – 9. Попов Н.В. Дискретность – основная пространственно-временная особенность проявлений чумы в очагах сусликового типа. – Саратов: Изд-во СГУ, 2002. – 192 с. – 10. Попов Н.В., Куклев Е.В., Слудский А.А. // Противочумн. учред. России и их роль в обеспечении эпид. благополучия насел. страны. – М., 2004. – С. 27–31. – 11. Попов Н.В., Рогаткин А.К., Козлова Т.А. Цикличность эпизоотий чумы в регионе Северного и Северо-Западного Прикаспия и факторы ее определяющие. – Астрахань: ГУП ИПК «Волга», 1999. – 112 с. – 12. Попов Н.В., Удовиков А.И., Кузнецов А.А. // Пробл. особо опасных инф. – 2006. – Вып. 1. – С. 24–27. – 13. Ширанович П.И. // Зоол. журн. – 1968. – Т. 47, вып. 10. – С. 1539–1548. – 14. Darby G., Hsu J.W., Ghory N. // Nature. – 2002. Vol. 417. – P. 243. – 15. Jarret C.O., Deak E., Ishewood K.E. // J. Infect. dis. – 2004. – Vol. 190. – P. 783–792.

N.V.Popov, V.-B.-Kh.Sandzhiev, G.V.Sangadzhieva, A.I.Udovikov,  
S.A.Yakovlev, T.B.Karavaeva, A.V.Podsvirov, V.V.Kutyrev

**The Impact of the Present-Day Climate Warming  
upon the Evolution of the New Inter-Epidemic Period  
in the Pre-Caspian North-Western Steppe Natural Plague Focus**

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

The development of two deep depressions in the numbers of small  
sousliks, observed in the 50ths – 60ths and 80ths – 90ths of the twentieth

century, was shown to be significantly contributed to by the climatic factors  
in the North-Western Pre-Caspian region. The important role of the present-  
day climate warming upon the evolution of the inter-epidemic period in the  
North-Western Pre-Caspian steppe natural plague focus was ascertained, too.  
Search for *Yersinia pestis* strains in the rodent burrows soil in the areas of  
stable plague manifestations was recognized as a perspective surveillance  
measure to be practiced.

*Key words:* Small sousliks, number dynamics, climatic factors, inter-  
epizootic period, climate warming, rodent burrow soil.

Поступила 06.03.07.

## МИКРОБИОЛОГИЯ И ДИАГНОСТИКА

УДК 616.981.452+576.8.097.21:599.323.4

**И.В.Бахтеева, С.В.Денцовская, Е.А.Панферцев, Т.Э.Светоч, Т.Б.Кравченко, М.Е.Платонов,  
Г.М.Титарева, Т.И.Комбарова, С.А.Иванов, А.П.Анисимов**

### **ВИРУЛЕНТНОСТЬ ДЛЯ МЫШЕЙ РН 6<sup>+</sup> И РН 6<sup>-</sup> ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS***

ФГУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, Оболensk

С помощью сайт-направленного мутагенеза оперона *psa*, кодирующего синтез рН 6 антигена (пилей адгезии), и последующей транс-комплементации получено два изогенных набора штаммов *Yersinia pestis*, включающих штаммы дикого типа 231 и И-1996, их рН 6<sup>-</sup> неполярные мутанты с делециями структурного гена *psaA* или всего оперона, и штаммы, восстановившие способность к температурно- и рН-зависимому синтезу пилей адгезии или конститутивной продукции рН 6 антигена. Показано, что утрата способности к синтезу или конститутивная продукция рН 6 антигена не оказывают влияния на вирулентность и средние сроки жизни зараженных мышей при подкожном способе заражения.

*Ключевые слова:* вирулентность, *Yersinia pestis*, рН 6 антиген.

Поверхностный белок рН6 антиген синтезируется в клетках *Y. pestis* в диапазоне температур 35–41 °С и кислых условиях среды [7]. рН 6 антиген образует на клеточной поверхности *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* гомополимерные пилей адгезии [3, 13]. С одной стороны, рН 6 антиген обладает адгезивной активностью в отношении эритроцитов [6, 7] и культивируемых эпителиальных клеток млекопитающих за счет связывания с фосфатидилхолином [11]. С другой – он препятствует фагоцитозу [6], вероятно, путем экранирования бактериальной поверхности за счет способности связывать аполипопротеин В-содержащие липопротеины плазмы крови [14], фибронектин, муцин и ганглиозид [2], фосфатидилхолин легочного сурфактанта [11]. Была показана цитотоксичность рН 6 антигена для перитонеальных [7] и альвеолярных макрофагов [6], но рН 6 антиген не токсичен при подкожном введении кроликам (1000 мкг), морским свинкам (625 мкг) и мышам (100 мкг) [6].

Установлено, что *psa* оперон *Y. pestis* и *Y. pseudotuberculosis* устроен подобно другим оперонам, кодирующим пилей адгезины, субъединицы которых секретируются на поверхность бактерий с помощью системы секреции IV типа [15], и состоит из двух регуляторных генов *psaE* и *psaF*, отвечающих за температурную (37 °С) и рН (5,8–6,0) регуляцию транскрипции, а также структурного гена *psaA* и генов *psaB* и *psaC*, кодирующих соответственно периплазматиче-

ский шаперон и молекулярный ашер [12]. Методом сайт-направленного мутагенеза показано, что вирулентность *psaE* или *psaA* мутантов аттенуированного Pgm<sup>-</sup> штамма *Y. pestis* KIM5 при внутривенном заражении мышей снижалась на два порядка [12], а *psaF* мутанты штамма 231 «дикого» типа полностью утрачивали вирулентность для мышей и морских свинок при подкожном способе заражения [5].

В настоящей публикации описано получение  $\Delta psaA$  и  $\Delta psaEFABC$  мутантов вирулентных штаммов, последующая транскомплементация этих мутаций с помощью рекомбинантных плазмид, несущих полный (*psaEFABC*) или неполный опероны (локус *psaABC*), а затем сравнительная оценка вирулентности изогенных штаммов *Y. pestis*, отличающихся по способности синтезировать рН 6 антиген.

### **Материалы и методы**

*Бактериальные штаммы.* Искользованные в работе штаммы *Y. pestis* и плазмиды представлены в таблице. Бактерии выращивали на питательной среде на основе сердечно-мозговой вытяжки (ВНМ), рН 7,2 или 5,8.

В случае необходимости в питательные среды добавляли антибиотики: ампициллин – 100 мкг/мл, канамицин – 40 мкг/мл, хлорамфеникол – 10 мкг/мл, полимиксин В – 100 мкг/мл.

*Мутагенез.* Нокаутные мутанты получали с по-

Вирулентность экспериментальных штаммов возбудителя чумы при подкожном заражении мышей

Штаммы <i>Y. pestis</i>	Характеристика	LD <sup>50</sup> , КОЕ *	Средние сроки жизни, сут
231	Fra <sup>+</sup> Ymt <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> pH 6 <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup> **	1 (1–2)	5,4 ± 0,54
231ΔpsaEFABC	Fra <sup>+</sup> Ymt <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> pH 6 <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup>	2 (1–5)	4,7 ± 0,95
231ΔpsaEFABCpJG428	Fra <sup>+</sup> Ymt <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> pH 6 <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup>	3 (1–10)	4,9 ± 0,66
231ΔpsaEFABCpIG924Cm	Fra <sup>+</sup> Ymt <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> pH 6 <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup>	3 (1–10)	5,5 ± 1,50
И-1996	Fra <sup>+</sup> Ymt <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> pH 6 <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup>	1 (1–2)	6,2 ± 0,90
И-1996ΔpsaA	Fra <sup>+</sup> Ymt <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> pH 6 <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup>	4 (1–16)	5,7 ± 1,10
И-1996ΔpsaEFABC	Fra <sup>+</sup> Ymt <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> pH 6 <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup>	3 (1–13)	4,9 ± 1,20
И-1996ΔpsaEFABCpIG924Cm	Fra <sup>+</sup> Ymt <sup>+</sup> Lcr <sup>+</sup> pH 6 <sup>+</sup> Pla <sup>+</sup> Pgm <sup>+</sup>	1 (1–5)	7,1 ± 0,90

\* В круглых скобках представлен 95 % доверительный интервал.

\*\* Способность к продукции: Fra – капсульного антигена, Ymt – мышинового токсина, Lcr – Yop белков и V антигена, р Н6 – р Н6 антигена, Pla – активатора плазминогена; Pgm – сочетанная способность к сорбции гемина и чувствительности к пестицину.

мощью технологии одноэтапной инактивации хромосомных генов [8] или плазмид на основе суицидного вектора pCVD442 [9]. Верификацию замены генов проводили с помощью полимеразой цепной реакции. Отсутствие продукции рН 6 антигена подтверждали методом иммуноблоттинга.

Комплементацию нокаутных мутаций проводили с помощью плазмиды pJG428 (Ap<sup>R</sup>Tc<sup>R</sup>), включающей полный оперон *psaEFABC*, клонированный в составе вектора рНС79 [14] или плазмиды pIG-B924Cm (Cm<sup>R</sup>), несущей гены *psaABC* и ген *cat* из плазмиды pBR325 в составе вектора pBluescriptIKS (МБИ Fermentas).

Оценку вирулентности проводили на 6–8-недельных самках линейных мышей Balb/c. По пять мышей на одну дозу заражали подкожно введением 10-кратных разведений 28-градусных культур *Y. pestis* в изотоническом растворе NaCl в объеме 0,1 мл на животное. Наблюдение за зараженными животными проводили в течение 21 сут. Погибших животных вскрывали и подвергали бактериологическому исследованию. Выделенные культуры *Y. pestis* проверяли на наличие маркеров лекарственной устойчивости и способность к продукции рН 6 антигена. Вычисление величин LD<sub>50</sub> проводили по методу Kärber в модификации И.П.Ашмарина и А.А.Воробьева [1].

### Результаты и обсуждение

Учитывая значительное несовпадение данных по влиянию на вирулентность мутаций по различным генам *psa* оперона, полученных с использованием отличающихся по вирулентности и выделенных в географически удаленных природных очагах чумы штаммов *Y. pestis* при различных способах заражения [5, 12], мы выбрали для наших экспериментов два высоковирулентных штамма *bv. antiqua*, 231 и И-1996. Первый из них был ранее использован в аналогичных экспериментах [5], а нуклеотидная последовательность его *psa* оперона (номер доступа в GenBank – EF079883) полностью соответствует таковым в секвенированных геномах других штаммов *Y. pestis* (<http://www.ericbrc.org/portal/eric/yersiniapestis?id=enteropathogens&subid=yersiniape>

stis). Сайт-направленный мутагенез позволил получить на основе обоих штаммов производные с делециями полного оперона и вариант штамма И-1996, лишенный структурного гена *psaA*. Мутанты *Y. pestis* 231Δ*psaA* получить не удалось.

Передача плазмид pJG428 или pIG924Cm в штамм *Y. pestis* И-1996Δ*psaA* не приводила к восстановлению продукции рН 6 антигена. Передача плазмид pJG428 или pIG924Cm в клетки мутантов обоих штаммов чумного микроба, полностью лишенных *psa* оперона (Δ*psaEFABC*), обеспечивала восстановление синтеза рН 6 антигена. Аналогичные результаты были получены в серии предварительных экспериментов (данные не приводятся) – при передаче указанных плазмид в клетки Δ*psaEF* и Δ*psaA* мутантов аттенуированных штаммов *Y. pestis* и Δ*psaA* мутантов *Y. pseudotuberculosis* продукция рН 6 антигена не восстанавливалась. Однако экспрессия полного или укороченного *psa* оперона выявлена в клетках *Y. enterocolitica* с интактным *myfF* опероном. Как и в клетках *E. coli* (данные не приводятся), плаزمида pIG924Cm, лишенная регуляторных генов *psaE* и *psaF*, обеспечивала в клетках Δ*psaEFABC* мутантов *Y. pestis* конститутивный синтез рН 6 антигена в диапазоне исследованных температур выращивания от 28 до 37 °С при рН питательной среды от 5,8 до 7,2.

Двукратная анимализация штаммов *Y. pestis* 231Δ*psaEFABC*pJG428, 231Δ*psaEFABC*pIG924Cm и И-1996Δ*psaEFABC*pIG924Cm путем подкожного заражения мышей 10<sup>8</sup> КОЕ без их лечения антибиотиками позволила получить от некоторых животных культуры исследуемых штаммов, 100 % клонов которых сохранили маркеры лекарственной устойчивости и способность к продукции рН 6 антигена. Известно, что рекомбинантные плазмиды на основе репликона ColE1 (рНС79, pBR322) не способны стабильно наследоваться в клетках *Y. pestis* без селективного давления [10]. Однако аналогичную нашим данным картину стабилизации наследования плазмиды pFS1, кодирующей синтез другого пилевого адгезина *Y. pestis* – капсульного антигена F1 и сконструированной на основе того же космидного вектора – рНС79, наблюдала Т.А.Гремякова при пассировании через организм

мышей штамма *Salmonella enterica* bv. Typhimurium SL3261pFS1 [4]. Поскольку отбор рН 6<sup>+</sup> и/или F1<sup>+</sup> клонов в организме теплокровного хозяина свидетельствует о селективных преимуществах бактериальных клеток, продуцирующих пилевые адгезины, это послужило основанием для оценки вирулентности всех рекомбинантных штаммов без введения экспериментально зараженным животным антибиотиков.

Сравнительная оценка вирулентности исследуемых штаммов *Y. pestis* для лабораторных животных при подкожном способе заражения не выявила различий в величинах LD<sub>50</sub> штаммов «дикого» типа, а также всех сконструированных нами рН 6<sup>-</sup> и рН 6<sup>+</sup> вариантов (таблица). Средние сроки жизни мышей, погибших в результате заражения штаммами 231 и И-1996 или их изогенными производными, практически не отличались. Эти данные согласуются с результатами изучения влияния на вирулентность другого антигена *Y. pestis* – F1, который так же, как и рН6 антиген, относится к семейству пилевых адгезинов и обладает антифагоцитарной активностью. Сайт-направленные мутации, нарушающие продукцию капсульного F1 антигена не снижали вирулентность *Y. pestis* в отношении мышей и морских свинок [10]. Вероятно, в случае утраты любого из этих антигенов мутации функционально комплементировались усилением продукции одного или нескольких из восьми других пилевых адгезинов, опероны которых выявлены в геноме *Y. pestis*.

Представленные в настоящей работе данные о необязательности наличия рН 6 антигена в клетках чумного микроба для «полной» вирулентности *Y. pestis* противоречат данным более ранних исследований по оценке вирулентности рН 6<sup>-</sup> вариантов возбудителя чумы [5, 12]. Использование Lindler *et al.* [12] Pgm<sup>-</sup> штамма KIM5 позволяет нам предположить, что 200-кратное снижение вирулентности его рН 6<sup>-</sup> производного при внутривенном заражении мышей может быть связано именно со сниженной вирулентностью исходного штамма, способного вызывать генерализованную инфекцию с летальным исходом только при внутривенном заражении. На наш взгляд, накопление в штамме дикого типа мутаций, потенциально снижающих его способность эффективно размножаться в организме хозяина, до какого-то времени компенсируется наличием широкого набора факторов патогенности *Y. pestis*. Поэтапная элиминация этих факторов из микробной клетки на определенной стадии приводит к невозможности компенсации их утраты за счет сверхпродукции оставшихся, что проявляется в значительном снижении вирулентности.

Что же касается разительных отличий в вирулентности рН 6<sup>-</sup> мутантов, полученных на основе вирулентного штамма 231, то здесь возможно два объяснения. Не исключено, что в экспериментах Панферцева и соавт. [5] был использован субклон исходного штамма 231, в популяции которого вследствие неоднократных пересевов на искусственных

питательных средах без периодической анимализации произошло накопление неидентифицированных мутаций, потенциально снижающих его способность эффективно размножаться в организме хозяина. Утрата еще одного фактора патогенности привела к полной потере вирулентности при подкожном способе заражения. Также возможно, что мутация по гену *psaF* приводила не только к прекращению продукции рН 6 антигена [5], но и оказывала полярный эффект на опероны других пилевых адгезинов *Y. pestis*, что могло стать причиной угнетения их продукции и соответствующей утраты вирулентности. В пользу этого предположения свидетельствует невозможность транскомплементации  $\Delta psaeF$  и  $\Delta psaa$  мутаций *Y. pestis* с помощью генов *psaABC* или полного *psa* оперона (настоящая работа).

Таким образом, утрата способности продуцировать рН 6 антиген не влияет на вирулентность  $\Delta psaeF$  и  $\Delta psaeFABC$  мутантов *Y. pestis* при подкожном способе заражения мышей, что свидетельствует о неперспективности использования рН 6 антигена в качестве молекулярной мишени для терапии чумы.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях – Л.: Гос. изд-во мед. лит-ры, 1962. – С. 85–104. – 2. Водопьянов С.О., Атарова Г.Т., Олейников И.П. и др. // ЖМЭИ. – 1993. – № 3 – С. 6–12. – 3. Водопьянов С.О., Попова Г.О., Васильева Г.И. и др. // ЖМЭИ. – 1990. – № 3. – С. 3–6. – 4. Гремякова Т.А. Структурно-функциональная вариабельность антигенов *Yersinia pestis* и методология конструирования противочумных иммунопрофилактических препаратов: Дис. ... докт. мед. наук. – М., 2004. – 320 с. – 5. Панферцев Е.А., Черепанов П.А., Каримова Г.А. // Матер. XIV науч.-практ. конф.: Тез. докл. (21–23 мая 1991 г., Оболенск). – Оболенск, 1991 – С. 22–24. – 6. Степаншина В.Н., Гремякова Т.А., Анисимов А.П. и др. // ЖМЭИ. – 1993. – № 3. – С. 12–17. – 7. Bichowsky-Slomnicki L., Ben-Efraim S. // J. Bacteriol. – 1963. – Vol. 86. – P. 101–111. – 8. Datsenko K.A., Wanner B.L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 6640–6645. – 9. Donnenberg M.S., Kaper J.B. // Infect. Immun. – 1991. – Vol. 29. – P. 4310–4317. – 10. Drozdov I.G., Anisimov A.P., Samoilo-va S.V. *et al.* // J. Med. Microbiol. – 1995. – Vol. 42. – P. 264–268. – 11. Galván E.M., Chen H., Schifferli D.M. // Infect. Immun. – 2007. – Vol. 75. – P. 1272–1279. – 12. Lindler L.E., Klempner M.S., Straley S.C. // Infect. Immun. – 1990. – Vol. 58. – P. 2569–2577. – 13. Lindler L.E., Tall B.D. // Mol. Microbiol. – 1993. – Vol. 8. – P. 311–324. – 14. Makevichuk E., Cherepanov P., Lundberg S. *et al.* // J. Lipid. Res. – 2003. – Vol. 44. – P. 320–330. – 15. Pizarro-Cerda J., Cossart P. // Cell. – 2006. – Vol. 124. – P. 715–727.

I.V. Bakhteyeva, S.V. Dentovskaya, E.A. Panfertsev, T.E. Svetoch,  
T.B. Kravchenko, M.E. Platonov, G.M. Titareva, T.I. Kombarova,  
S.A. Ivanov, A.P. Anisimov

#### Virulence for Mice of pH6<sup>+</sup> and pH6<sup>-</sup> *Yersinia pestis* Strains

State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk

The technique of site-directed mutagenesis of *psa* operon encoding the synthesis of pH6 antigen (adhesion pili), followed by the trans-complementation procedure were used to construct two sets of isogenic *Yersinia pestis* strains including wild type strains 231 and I-1996, their non-polar pH6<sup>-</sup> mutants containing deletions in the structural *psa* gene or in the entire operon, as well as the strains which could recover their capability for temperature- and pH-dependent synthesis of the adhesion pili or the constitutive pH6 antigen production. The loss of the ability to synthesize the pH6 antigen and its constitutive production was shown to affect neither their virulence characteristics nor mean lifetime assessments for the subcutaneously infected mice.

Key words: virulence, *Yersinia pestis*, pH6 antigen.

Поступила 29.10.07.

Г.А.Ерошенко

**ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ СОВРЕМЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ  
БИОЛОГИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ***Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов*

Представлены материалы второй международной конференции по биологии вибрионов «Vibrio 2007» (Париж, 28 ноября – 1 декабря 2007 г.). Отражены основные направления современных исследований вибрионов, связанные с их биоразнообразием, особенностями организации генома, патогенностью, эпидемиологией и экологией.

*Ключевые слова:* вибрионы, биоразнообразие, организация генома, патогенность, эпидемиология, экология.

28 ноября – 1 декабря 2007 г. во Франции состоялась вторая международная конференция по биологии вибрионов «Vibrio 2007», которая собрала около 250 участников из 35 стран мира. Конференция «Vibrio 2007» проводилась в Париже в институте им. Л.Пастера, который является крупнейшим научно-исследовательским и методическим центром и имеет свои филиалы в 200 странах мира. Сам факт проведения в институте им. Л.Пастера международной конференции по вибрионам и большое количество участников, принявших участие в работе форума, свидетельствуют о большом значении этой группы бактерий для здоровья и хозяйственной деятельности человека. После успеха первой конференции по биологии вибрионов, состоявшейся в Генте (Бельгия) в ноябре 2005 г., в работе которой участвовало 130 ученых из 32 стран мира, ни у кого не возникло сомнения в необходимости проведения новых международных форумов, посвященных изучению вибрионов.

В настоящее время известно около 80 видов вибрионов, некоторые из них – *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* наносят значительный вред здоровью населения планеты. Не меньшее значение имеют и другие виды вибрионов, такие как *V. anguillarum*, *V. harvei* и *V. salmonicida*, которые вызывают заболевания морских животных, рыб и моллюсков, а также *V. shiloi*, *V. coralliilyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. rotiferianus*, *V. proteolyticus*, являющиеся причиной массовой гибели колоний кораллов на обширных пространствах водного мирового бассейна. На основе использования вибрионов в настоящее время ведутся многочисленные биотехнологические исследования – создание вакцин, производство биоактивных компонентов, а также проводится мониторинг окружающей среды.

Целью второй конференции по биологии вибрионов было обсуждение в кругу ведущих исследователей из различных стран достигнутых за последние годы результатов и выработки дальнейшей стратегии и тактики изучения вибрионов. В конференции приняли участие специалисты по таксономии и экологии бактерий, генетики, молекулярные биологи, а также работники здравоохранения, научная молодежь.

Условно все выступления на «Vibrio 2007» были разделены по 4 секциям – биоразнообразие, генетика/геномика, болезнь/эпидемиология, экология и прикладные аспекты. Отличительной чертой всех представленных докладов был высокий методический уровень и разносторонний многоуровневый анализ представляемого материала. Одним из главных достижений последних лет, безусловно, является определение полной последовательности геномов ряда видов *Vibrio*. Секвенированы полные геномы 7 видов вибрионов, а у 20 видов этих микроорганизмов работы по секвенированию близятся к завершению. В целом к настоящему моменту секвенировано более тысячи бактериальных геномов. Большинство работ по секвенированию бактерий выполнены по методу F.Sanger (1973), но уже разработаны новые методологии, которые позволяют достигнуть еще более высокой скорости секвенирования [17]. Среди них метод пиросеквенирования, с помощью которого можно секвенировать бактериальный геном в короткие сроки и с небольшими материальными затратами.

Сегодня через более чем десять лет от начала секвенирования первых бактериальных геномов можно сделать вывод о том, что бактерии обладают гораздо большим генетическим разнообразием (даже на уровне одного вида), чем можно было предположить ранее. Это разнообразие обеспечивается множеством механизмов, среди которых важную роль играют мобильные генетические элементы и фаги. R.Colwell (США) во вступительной лекции «Сравнительная геномика *Vibrio cholerae* и родственных таксономических единиц» провела анализ современных данных по организации геномов вибрионов и ее взаимосвязи с их жизненными циклами. В связи с большим количеством видов вибрионов, их генетическим разнообразием и мозаичностью структуры геномов R.Colwell были подняты вопросы о том, существуют ли в природе виды вибрионов, как четки границы между ними, и что такое на самом деле вид *V. cholerae*?

Ответы на часть поставленных в лекции R.Colwell вопросов прозвучали в докладе D.Usseri (Дания) «О происхождении бактериальных видов» [17]. По его данным, на секвенирование генома одной бактерии

в настоящее время необходимо потратить всего несколько часов работы и одну тысячу долларов США, а для того чтобы выполнить полный компьютерный анализ секвенированного генома, провести сборку последовательностей ДНК и определить возможные функции большинства генов понадобится несколько часов работы (в течение одной ночи) на мощном «суперкомпьютере». На основании анализа более чем тридцати последовательностей геномов ряда видов *Vibrio* выявлены кластеры генов, которые уникальны только для вида *V.cholerae*. Поскольку на сравнение этих 30 геномов между собой (равно как и геномов других бактерий) для выяснения сходства и различия между ними требуется очень много времени, D.Usseri с соавт. разработана новая программа «BLAST atlas» (<http://www.cbs.dtu.dk/services/GenomeAtlas/suppl/zoomatlas/>). С помощью этой программы показано, что, в среднем, геном *V.cholerae* включает около 3800 генов, а «пангеном» (все гены, которые содержатся во множественных геномах *V.cholerae*) почти в два раза больше и составляет около 7000 генов. Пангеном рода *Vibrio* содержит более 20000 генов, из которых консервативными «коровыми» генами рода *Vibrio* являются только 500 генов, в то время как «коровый» геном *V.cholerae* составляет 1800 генов.

Наряду с секвенированием полных геномов проводится поиск последовательностей генов, которые могут быть использованы для дифференциации вибрионов на основе метода мультилокусного секвенирования. В докладе F.Thompson с соавт. (Бразилия) была представлена стандартная схема для идентификации всех известных в настоящее время представителей рода *Vibrio* на основе мультилокусного секвенирования генов *pyrH*, *recA* и *rpoA* [16]. Эта схема может быть дополнена генами *ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB* и *topA*. На основе использования представленных генетических локусов штаммы, относящиеся к одному виду, будут иметь не менее 95% гомологии, а близкие между собой штаммы образуют четко отличимые филогенетические группы. Данные интернет-ресурсов TAXVIBRIO по секвенированию этих генов у различных видов *Vibrio* представлены по адресу: (<http://www.taxvibrio.incc.br/>).

Наряду с *V.cholerae*, патогенным для человека является вид *V.parahaemolyticus*. Вызываемые им заболевания связаны с потреблением сырых морепродуктов, а наблюдаемый рост заболеваемости обусловлен появлением и распространением пандемического штамма, вызывающего острые вспышки по всему миру. В докладе A. DePaolo с соавт. (США) предложена схема мультилокусного секвенирования штаммов *V.parahaemolyticus* на основе 7 генов, участвующих в жизнеобеспечении вибрионов (<http://pubmist.org/vparahaemolyticus>). Использование предложенной схемы выявило высокую генетическую гетерогенность этого вида и указало на наличие в геноме частых генетических рекомбинаций [4].

На конференции были представлены данные (E.Hjerde с соавт., Швеция) о полном секвенирова-

нии генома патогенного для рыб вида *V.salmonicida*, который вызывает в условиях низкой температуры вибриоз у морских аквакультур и является причиной деградации тканей, гемолиза и сепсиса *in vivo* [6]. Для установления механизмов патогенности *V.salmonicida* проведено секвенирование генома штамма LFI1238, которое показало, что этот вид содержит две хромосомы и 4 плазмиды с общим размером генома 4,6 млн п.н. Установлено, что геном *V.salmonicida* имеет высоко фрагментированную структуру, обусловленную внедрением почти 300 инсерционных последовательностей. Широкое распространение IS элементов и вызванные ими хромосомные перестройки, которые привели к утрате функций многих специализированных генов (утилизация хитина и другие), но не генов, необходимых для жизнедеятельности, свидетельствуют о том, что вид *V.salmonicida* претерпел смену занимаемой им эволюционной ниши благодаря приобретению новой генетической информации (возможно, плазмид). Выявлено несколько генов, которые могут вносить вклад в патогенность этого вида, в том числе кодирующих нескольких гемолизин, однако никаких классических факторов вирулентности не выявлено.

Установлено, что все члены семейства *Vibrionaceae* имеют 2 хромосомы. В ряде представленных на конференции докладов рассмотрены вопросы о механизмах взаимодействия двух хромосом в клетках вибрионов. В сообщении M.Waldor с соавт. (США) обсуждался механизм сегрегации хромосом *V.cholerae* и показано, что динамика разделения двух хромосом различна, что определяется различными Par системами (от англ. partitioning – расхождение), включающими два ортолога – белки ParA и ParB [19]. Par системы у *V.cholerae* функционируют независимым способом и обуславливают разные механизмы сегрегации двух хромосом. F.-X.Varee с соавт. (Франция) рассмотрел роль в сегрегации хромосом системы Xer/FtsK, которая состоит из двух сайт-специфических рекомбиназ XerC и XerD и ДНК транслоказы – FtsK и необходима для терминальной сегрегации хромосом [18]. Важность изучения Xer/FtsK системы терминальной сегрегации связана также с тем, что Xer система сайт-специфической рекомбинации широко используется различными филоментозными бактериофагами, в том числе CTXphi с генами холерного токсина, для интеграции их однонитевого генома в двунитевой геном вибрионов.

Включение новых последовательностей ДНК в геном вибрионов может происходить с помощью интегров. D.Mazel (Франция) указал на то, что эти элементы способны включать открытые рамки считывания и переводить их в функционально активные гены за счет обеспечения правильной экспрессии [10]. Интегроны играют главную роль в возникновении множественной лекарственной устойчивости у клинических штаммов грамотрицательных бактерий. Эти структуры также часто выявляют в геноме многих бактериальных видов, выделяемых из окру-

жающей среды, в том числе в большинстве видов *Vibrio*, где они могут собирать в суперинтегронах сотни кассет с генами, повышающими адаптационные свойства вибрионов.

С помощью суперинтегронного острова холерными вибрионами были приобретены системы секреции 3 и 6 типов (СС3Т и СС6Т). Недавно при секвенировании генома холерного вибриона не O1/не O139 серогруппы *V. cholerae* AM-19226, который изолирован от больного с острой диареей, установлено, что в состав суперинтегрона, расположенного на второй хромосоме *V. cholerae*, входит кластер генов, кодирующих функционально активную СС3Т [3]. В своей лекции «Актин как мишень систем секреции 3 и 6 типов» J.Mekalanos (США) рассказал о механизмах действия СС3Т и СС6Т. J.Mekalanos предложена модель того, как компоненты СС6Т могут собираться в пространстве между бактериальной клеткой и клеткой-мишенью. СС6Т обеспечивает попадание эффекторных белков семейства VgrG в клетку хозяина, что приводит к образованию перекрестных связей актина в макрофагах млекопитающих. Показано также, что эффектор СС3Т – белок VopF может также связывать актин у эукариотических клеток, как и другой бактериальный токсин – RTX, действие которого приводит к утрате трансэпителиальной устойчивости и образованию перекрестных связей с актином.

T.Iida с соавт. (Япония) сообщил о наличии у *V. parahaemolyticus* двух СС3Т, гены которой выявлены у этого вызывающего пищевые гастроэнтериты вида в результате секвенирования генома штамма RIMD2210633 [7]. Конструирование серии мутантов и сравнительная геномная гибридизация показали, что обе системы секреции (СС3Т1 и СС3Т2) являются функционально активными и могут играть роль в патогенности этого вида вибрионов.

В докладе J.H.Rhee (Южная Корея) обсуждалась роль токсина RTX в патогенезе *V. vulnificus* [9]. *V. vulnificus* вызывает быструю гибель клеток макроорганизма и фатальную септицемию. Этот вибрион является морской бактерией, но способен вызывать заболевания человека и животных. Летальный исход при первичной септицемии, вызванной *V. vulnificus*, составляет более 50 %, а скорость развития фатального исхода самая высокая среди всех возбудителей пищевых токсикоинфекций. J.H.Rhee с соавт. [9] показано, что мутация в гене *rtxA* вызывала дефект в цитотоксичности, в то время как мутации в генах гемолизина (*vvhA*) и металлопротеазы (*vvpE*) не приводили к значительному падению цитотоксичности. Экспрессия RtxA1 увеличивалась после контакта с клеткой, в которой этот эндотоксин приводил к перестройке цитоскелета, образованию пузырьков в плазматической мембране и, в конечном итоге, к некротической смерти клетки. RtxA1 вызывал агрегацию актина и гемолиз посредством образования пор (радиус 1,63 нм). Нуль-мутация в RtxA1 привела к более чем 100-кратному увеличению LD<sub>50</sub> при внутрижелудочном и внутрибрюшинном заражении

мышей. Из этого следует, что RTX является мультифункциональным токсином и необходимым фактором вирулентности *V. vulnificus*.

Таким образом, значительную роль в патогенности различных вибрионов играют недавно обнаруженные системы секреции – СС3Т и СС6Т, а также хорошо известный бактериальный токсин RTX. Роль и функции последнего оказались гораздо более широкими и важными, чем это считалось ранее. Выявлены и другие факторы патогенности вибрионов. В докладе J.D.Oliver (США) сообщалось о том, что патогенным для человека является биотип I *V. vulnificus*, который состоит из двух геновариантов: С (клинические источники) и Е (преобладает в устрицах) [13]. Оба геноварианта очень схожи по большинству фенотипических признаков. Однако С-штаммы выживают в человеческой сыворотке, в то время как Е-штаммы имеют к ней высокую чувствительность. Это связано с наличием у С-генотипа гена сидерофора *viuB*, экспрессия которого обеспечивает гораздо большую выживаемость в сыворотке крови штаммов этого геноварианта по сравнению со штаммами, у которых ген *viuB* отсутствует. Добавление ионов железа к человеческой сыворотке уравнивает выживание Е- и С-штаммов. Редкие Е-штаммы с геном *viuB* имеют такую же выживаемость в сыворотке, что и С-штаммы.

D.Bartlett с соавт. (США) установили наличие у *V. cholerae* нового холерного токсина, названного им cholix токсин [1]. Показано, что этот токсин имеет структуру, необходимую для инфицирования клеток млекопитающих за счет эндоцитоза с последующей транслокацией в цитоплазму эукариотической клетки и ингибированием биосинтеза белка за счет специфической модификации фактора элонгации 2. Гены cholix токсина содержатся во многих штаммах *V. cholerae*, циркулирующих в различных регионах мира. Этот токсин может быть важным фактором вирулентности, а также играть значительную роль в выживании *V. cholerae* во внешней среде. В докладе D.Bartlett [1] прозвучала оценка роли индола в жизнедеятельности холерных вибрионов. Индол является сигнальной молекулой, влияющей на образование биопленки у целого ряда бактерий. В том числе индол вызывает избыточную экспрессию у *Vibrio* генов, участвующих в продукции полисахарида, необходимого для образования биопленки. Индол также может влиять на экспрессию других генов, определяющих подвижность, устойчивость к поеданию простейшими, потребление железа и транспорт ионов.

Вопрос о роли небольших регуляторных молекул РНК в системах Quorum sensing в пандемических штаммах *V. cholerae* поднял В.К.Hammer (США) [5]. Используя процессы, называемые Quorum sensing, бактерии сообщаются между собой посредством внеклеточных сигнальных молекул, называемых аутоиндукторами. Аутоиндукторы помогают бактериям координировать экспрессию генов на популяционном уровне и вести себя единообразным

образом, наподобие многоклеточных организмов. Информация аутоиндукторов влияет на транскрипцию множественных регуляторных РНК, которые подавляют трансляцию мРНК, кодирующую главный трансляционный регулятор *HapR*. В *V. cholerae* *HapR* контролирует экспрессию факторов вирулентности и образование биопленки. В то же время В.К. Hammer с соавт. [5] обнаружен *HapR*- независимый путь с участием небольших регуляторных РНК, действующий у классических холерных вибрионов, которые, несмотря на наличие нефункционального *HapR*, демонстрируют контролируемую системой quorum sensing экспрессию генов. Механизмы образования биопленки изучаются в настоящее время и у других вибрионов. D.A. Rowe-Magnus (Канада) обсуждена проблема образования биопленки у *V. vulnificus* [12]. Предполагается, что образование биопленки играет важную роль в колонизации этой бактерией кожных покровов у рыб, а также в выживании *V. vulnificus* во внешней среде. Экспрессия факторов вирулентности, образование биопленки и подвижность у других бактерий часто регулируется циклическим di-GMP. D.A. Rowe-Magnus с соавт. [12] обнаружили ген, в случае избыточной экспрессии которого наблюдается резкое возрастание образования биопленки и увеличивается ругозность поверхности клеток. Белок содержит GGDEF домен, наличие которого предполагает, что он относится к дигуанилатциклазам и участвует в синтезе c-di-GMP. Образующий полисахарид относится к новым высокомолекулярным полисахаридам и способствует лучшей адаптации *V. vulnificus* во внешней среде и увеличению способности колонизировать кожные покровы рыб.

На конференции также обсужден вопрос об эволюции *V. cholerae* в сторону появления более вирулентного возбудителя холеры. В докладе В. Nair (Индия) рассказал о механизмах возникновения новых более тяжелых форм заболевания [11]. В 2002 г. им выделены новые варианты холеры, которые содержали смешанную комбинацию свойств классического и эльтор биоваров и были названы Матлабскими вариантами. Эти варианты содержали ген *rstR* классического типа. Значение Матлабских штаммов выросло после того, как в Мозамбике в 2005 г. были выделены штаммы биовара эльтор, которые содержали классический СТХ профаг. Недавно В. Nair с соавт. обнаружили, что с 2001 г. штаммы *V. cholerae* O1 биовара эльтор образуют ХТ классического подтипа, что свидетельствует о происходящих изменениях вирулентных свойств в штаммах биовара эльтор – этиологических агентах 7 пандемии холеры. Количество случаев холеры среди других заболеваний в госпитале в Дакке увеличились от 15,9 % в 2001 г. до 30,8 % в 2005 г., причем отмечено резкое увеличение числа случаев с высокой дегидратацией. Штаммы эльтор, ассоциированные с холерой, в настоящее время в Бангладеш образуют ХТ классического биотипа, что, по-видимому, является доказательством эволюции более вирулентного варианта возбудителя.

В последнее время выявлены новые взаимоотношения холерных вибрионов с различными организмами. В докладе Y. Kashi (Израиль) освещены аспекты взаимодействия *V. cholerae* с хириномидами – некусающими комарами (Diptera, Chironomidae) [8]. Установлено, что яйцевые массы хириномидов содержат биополимер, который служит питательным веществом для холерных вибрионов. Бактерии используют секретлируемую гемагглютининпротеазу HA/P для деградации яйцевых масс. Кроме того, установлено, что взрослые летающие насекомые являются носителями *V. cholerae* и могут переносить бактерии из одного водоема в другой. Таким образом, хириномиды являются, возможно, природными резервуарами холерных вибрионов и могут участвовать в диссеминации *V. cholerae*.

G. Sandsrom (Швеция) сообщил о том, что холерные вибрионы способны выживать внутриклеточно в свободноживущей амебе *Acanthamoeba castellanii* [15]. Результаты исследований по совместному культивированию *V. cholerae* O1 (классического и эльтор биоваров) и O139 показали увеличение роста и выживания бактерий, культивируемых совместно с амебами, по сравнению с отдельно выращиваемыми клетками вибрионов. Бактерии росли в трофозоидах *A. castellanii*, а также обнаруживались в цистах. Внутриклеточный рост и выживание бактерий не ингибировали рост *A. castellanii*. По-видимому, *V. cholerae* и *A. castellanii* находятся во взаимоотношениях эндосимбионт-хозяин.

Различные виды *Vibrio* могут вызывать заболевания и даже гибель кораллов. J.M. Cervino (США) сообщил о том, что причиной болезни кораллов в Карибском море и Тихом океане являются *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. rotiferianus*, *V. proteolyticus*, а также новая группа видов *Vibrio* [2]. Этиологическим агентом заболевания, называемого «побелением» кораллов вида *Oculina patagonica*, является *V. shiloi*, а кораллов вида *Pocillopora damicornis* – *V. coralliilyticus* [14]. *V. shiloi* проявляет хемотаксис к слизи кораллов *O. patagonica*, связывается с галактозосодержащим рецептором на поверхности кораллов, проникает в экзодерму, размножается внутриклеточно и образует ингибитор фотосинтеза пептидов. Однако начиная с 2003 г. кораллы *O. patagonica* приобрели резистентность к *V. shiloi*, несмотря на отсутствие у этих животных иммунной системы. E. Rosenberg (Израиль) предположил, что в биоценозе кораллов появилась бактерия, которая может противодействовать *V. shiloi*. На основании этих данных E. Rosenberg сформулировал гипотезу о гологеноме (общем геноме животных, растений и бактерий, входящих в биоценоз) и о значении микроорганизмов – симбионтов в эволюции животных и растений.

Таким образом, вторая международная конференция по вибрионам «Vibrio 2007» имела несомненный успех и собрала вместе ученых, работающих над изучением различных аспектов биологии вибрионов. Конференция дала возможность обсудить новейшие



данные по биоразнообразию вибрионов, их генетике, эпидемиологии, экологии и различным прикладным аспектам, а также наметить дальнейшие наиболее перспективные направления исследований. Была отмечена высокая пластичность геномов *Vibrio* и высокая скорость адаптации вибрионов к условиям внешней среды. Исследования вибрионов с применением современных молекулярно-биологических и компьютерных технологий обеспечат в дальнейшем лучшее понимание особенностей биологии этой большой и важной группы морских бактерий.

Работа поддержана грантом РФФИ № 05-04-48727.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bartlett D. // Materials of second conference on the biology of vibrios «Vibrio 2007» Paris, 28 Nov. – 1 Dec. 2007, Absr. Book, Institut Pasteur, Centre d'Information Scientific. – Paris, 2007. – P. 6. – 2. Cervino J.M., Lorence E.A., Thompson F.L. *et al.* // Там же. – P. 34. – 3. Dziejman M., Serutto D., Tam V.S. *et al.* // PNAS. – 2005. – Vol. 102, N 9. – P. 3465–3470. – 4. Gonzalez-Escalona N., Martinez-Urtaza J., Romero J. *et al.* // Materials of second conference on the biology of vibrios «Vibrio 2007» Paris, 28 Nov. – 1 Dec. 2007, Absr. Book, Institut Pasteur, Centre d'Information Scientific. – Paris, 2007. – P. 7. – 5. Hammer B.K., Bassier B.L. // Там же. – P. 14. –

6. Hjerde E., Lorentzen M.S., Holden M.T.G. *et al.* // Там же. – P. 13. – 7. Iida T. // Там же. – P. 10. – 8. Kashi Y. // Там же. – P. 8. – 9. Kim Y.R., Lee S.E., Kook H.E. *et al.* // Там же. – P. 29. – 10. Mazel D. // Там же. – P. 17. – 11. Nair G.B., Bhuiyam N.A., Nusrin S. *et al.* // Там же. – P. 26. – 12. Nakhamchik A., Wilde K., Rowe-Magnus D.A. // Там же. – P. 20. – 13. Oliver J.O., Bogard R., Warner E. *et al.* // Там же. – P. 30. – 14. Rosenberg E., Zilber-Rosenberg I. // Там же. – P. 32. – 15. Saeed A., Abd H., Edvinsson B. *et al.* // Там же. – P. 22. – 16. Thompson F.L., Sawabe T., Thompson C.C. *et al.* // Там же. – P. 4. – 17. Ussery D.W. // Там же. – P. 3. – 18. Val M.-E., Barre F.-X. // Там же. – P. 12. – 19. Yamaichi Y., Fogel M.A., Waldor M.K. // Там же. – P. 11.

G. A. Yeroshenko

#### Main Trends of the Up-to-Date Research of Cholera Vibrios Biology

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

The review presents the data covered during the Second International Conference on the Biology of Vibrios "Vibrio 2007" (Paris, from November, 28<sup>th</sup> to December, 1<sup>st</sup>, 2007). Set forth are main trends of state-of-the-art vibrios research concerning their biodiversity, the peculiarities of genome arrangement, pathogenicity, epidemiology and ecology.

*Key words:* Vibrios, biodiversity, genome arrangement, pathogenicity, epidemiology, ecology.

Поступила 26.02.08.

УДК 616.981.452+576.858:616-097

**Т.А.Малюкова, Т.А.Костюкова, Е.М.Головко, М.Н.Ляпин, С.А.Щербакова, Е.А.Плотникова, Е.В.Найденова**

#### ПОДГОТОВКА МАТЕРИАЛА, ОТОБРАННОГО В СОПРЯЖЕННЫХ ОЧАГАХ ЧУМЫ И АРБОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ, К ПРОВЕДЕНИЮ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ. Сообщение 2

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

Представлены результаты второго этапа исследований по использованию  $\beta$ -пропиолактона для обеззараживания возбудителя чумы. Показано, что препарат в концентрации 0,1 % при экспозиции 18–24 ч в условиях холодильника, а также не менее 6 ч при температуре 37 °С обеззараживает *Yersinia pestis* 231 как во взвесах, так и в суспензиях из внутренних органов. Предложены оптимальные режимы подготовки материала, отобранного в сопряженных очагах чумы и арбовирусных инфекций, к проведению иммунологического исследования.

*Ключевые слова:* *Yersinia pestis*, арбовирусы, обеззараживание,  $\beta$ -пропиолактон, ИФА.

При проведении иммунологических исследований материал подвергают предварительной обработке с целью обеззараживания. При подозрении на наличие возбудителя чумы используют формалин [1], для инактивации арбовирусов –  $\beta$ -пропиолактон (БПЛ) [2]. Отсутствие регламентированных способов инактивации образцов, одновременно содержащих чумной микроб и арбовирусы, и наличие реальных сопряженных природных очагов данных инфекций определяют актуальность поиска единого способа обеззараживания.

Полученные в ходе первого этапа исследований [3] положительные результаты обеззараживания взвесей из культур вакцинного штамма чумного

микроба с помощью 0,1 % БПЛ (конечная концентрация в пробе) при температуре 4 °С и экспозиции 6 ч позволили сделать предположение о возможности использования препарата для обработки взвесей вирулентных культур чумного микроба, а также суспензий из органов зараженных ими лабораторных животных.

Известно, что для инактивации инфекционной активности арбовирусов с помощью 0,05–0,1 % БПЛ (конечная концентрация в пробе) рекомендовано два режима: при 37 °С в течение 8–10 ч и при 4 °С в течение 96 ч [2]. Способ обработки в заданных режимах обеспечивает надежность инактивации и высокую чувствительность серологических реакций, прово-

димых с подготовленными пробами.

Цель настоящего исследования состояла в разработке оптимального режима обеззараживания  $\beta$ -пропиолактоном взвесей из культур вирулентного штамма чумного микроба и суспензий из органов лабораторных животных, павших от чумной инфекции, а также выяснение влияния его на эффективность диагностического исследования проб из сопряженных очагов чумы и арбовирусных инфекций (модельные эксперименты).

### Материалы и методы

Эксперименты проводили с использованием эталонного вирулентного штамма *Yersinia pestis* 231 из коллекции Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб». Штаммы культивировали на агаре LB при 28 и 37 °С. Из агаровых культур, выращенных при 37 °С в течение 2 сут, готовили взвеси концентрацией  $10^9$  м.к./мл. Для заражения лабораторных животных (белых мышей) использовали взвеси из культур штамма *Y. pestis* 231, выращенных при 28 °С в течение 2 сут. Биопробных животных заражали подкожно в дозе 500 м.к. в 0,2 мл 0,85 % NaCl, pH 7,2. После гибели животных вскрывали, внутренние органы (печень, селезенка, легкие, кровь) методом отпечатков высевали на пластинки агара LB и использовали для приготовления суспензии в 0,85 % NaCl, pH 7,2. Жидкую фазу отбирали, разливали в равных количествах по пробиркам, довели объем до 5 мл с помощью 0,85 % NaCl, pH 7,2.

Пробы для модельного эксперимента содержали суспензии из внутренних органов биопробных животных, приготовленных описанным выше способом, и суспензии из клещей, собранных на территориях, эндемичных по Крымской-Конго геморрагической лихорадке (ККГЛ), в которых были выявлены специфические антигены. Для сравнения использовали аналогичные пробы, инактивированные 2 % раствором формалина. Клещей от 1–5 до 10–20 (в зависимости от упитанности, вида, места сбора) помещали в стерильные ступки, растирали, заливали 0,85 % NaCl, pH 7,2. Отбирали жидкую фазу и добавляли в равных количествах к суспензиям из внутренних органов.

Взвеси и суспензии обрабатывали БПЛ, синтезированным ООО «Даймонд Тим» (Москва) и любезно предоставленным для проведения исследований.

В подготовленные пробы вносили цельный БПЛ до конечной концентрации в пробе 0,1 или 0,05 %, выдерживали 18 и 24 ч в условиях холодильника или 1, 3, 6, 8 и 24 ч в условиях термостата (37 °С). Контролем служили аналогичные суспензии и взвеси из культуры штамма *Y. pestis* 231, но без добавления БПЛ. Эффективность инактивации оценивали в соответствии с действующими нормативно-методическими документами [4]. Образцы проверяли на специфическую стерильность посевами на плотные и жидкие питательные среды и заражением лабораторных животных. Эксперименты повторяли 3 раза.

Для постановки иммуноферментного анализа (ИФА) использовали тест-систему иммуноферментную моноклональную для идентификации капсульного антигена F1 чумного микроба (Ставрополь) и тест-систему для выявления антигенов вируса ККГЛ (ГУ НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского РАМН, Москва). Анализ проводили в соответствии с инструкциями по применению.

### Результаты и обсуждение

Первоначально изучали инактивирующее действие БПЛ на взвеси из культуры штамма *Y. pestis* 231, выращенной при 37 °С. Предположили, что капсула, образующаяся у чумного микроба в подобных условиях, может препятствовать инактивирующему действию БПЛ. В результате экспериментов установили, что после 1- и 3-часовой экспозиций с БПЛ рост чумного микроба на плотных и жидких питательных средах появлялся на 2-е сутки. После 6-, 8- и 18-часовой экспозиций получены специфически стерильные образцы (табл. 1). Следовательно, БПЛ полностью инактивировал клетки *Y. pestis* 231. Для подтверждения полученных результатов и приближения условий лабораторных исследований к полевым были проведены эксперименты по инаktivации суспензий из внутренних органов белых мышей, зараженных *Y. pestis* 231. На плотных и в жидких питательных средах с посевами материала, прошедшего 3-часовую обработку 0,1 % БПЛ, через 2 сут отмечен специфический рост. Увеличение экспозиции до 6, 8 и 24 ч привело к гибели клеток чумного микроба в суспензиях, о чем свидетельствовало отсутствие специфического роста на питательных средах на

Таблица 1

Оценка эффективности инаktivации при 37 °С  $\beta$ -пропиолактоном взвесей *Y. pestis* 231 и суспензий органов белых мышей, зараженных *Y. pestis* 231

Экспозиция, ч	Концентрация БПЛ		
	0,1 %		0 %
	Посев на питательные среды	Посев внутренних органов биопроб	Посев на питательные среды
<b>Взвеси <i>Y. pestis</i> 231 (<math>10^9</math> м.к./мл)</b>			
1	2*		2*
3	3*		2*
6	Нет роста		2*
8	Нет роста		2*
18	Нет роста		2*
<b>Суспензии органов белых мышей, зараженных <i>Y. pestis</i> 231 (<math>10^5</math> м.к./мл)</b>			
3	2*	1*	2*
6	Нет роста	Нет роста	2*
8	Нет роста	Нет роста	2*
24	Нет роста	Нет роста	2*

\* Время (в сутках) появления роста на средах.

Таблица 2

Влияние способа обеззараживания материала на результаты ИФА

Материал	Концентрация <i>Y. pestis</i> 231 (м.к./мл) в образцах						
	10 <sup>9</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup>
<b>β-пропиолактон в конечной концентрации 0,1%</b>							
Взвеси из культуры <i>Y. pestis</i> 231	+	+	+	+	+	+/-	-
Пробы из внутренних органов грызунов, содержащие <i>Y. pestis</i> 231	+	+	+	+	+	+/-	-
Пробы в модельных экспериментах							
Результаты исследований с тест-системами для выявления							
F1 <i>Y. pestis</i>	+	+	+	+	+	+/-	-
антигенов ККГЛ	+	+	+	+	+	+	-
Отрицательный контроль (взвеси из <i>Y. pestis</i> 231, выращенные при 28 °С)	-	-	-	-	-	-	-
<b>2% р-р формалина</b>							
Взвеси из культуры <i>Y. pestis</i> 231	+	+	+	+	+	+/-	-
Пробы из внутренних органов грызунов, содержащие <i>Y. pestis</i> 231	+	+	+	+	+	+/-	-
Пробы в модельных экспериментах							
Результаты исследований с тест-системами для выявления							
F1 <i>Y. pestis</i> 231	+	+	+	+	+	+/-	-
антигенов ККГЛ	+	+	+	+	+	+	-
Отрицательный контроль (взвеси из <i>Y. pestis</i> 231, выращенные при 28 °С)	-	-	-	-	-	-	-

протяжении срока наблюдения. Оставались стерильными также пластины агара с отпечатками органов биопробных белых мышей, зараженных инактивированным материалом и забитых на 6-е сутки после заражения. Полученные результаты дают основание считать, что БПЛ в концентрации 0,1 % при температуре 37 °С и экспозиции не менее 6 ч вызывает гибель клеток чумного микроба в суспензиях из органов биопробных животных. Таким образом, режим инактивации материала, содержащего арбовирусы [2], оптимален для обеззараживания взвесей чумного микроба и суспензий из внутренних органов зараженных ими грызунов. Присутствие в пробе дополнительных компонентов (белков, липидов, липополисахаридов и др.) не снижает эффективности инактивации. Следовательно, данный режим может быть использован для обеззараживания проб из сопряженных очагов чумы и арбовирусных инфекций.

Существенным моментом выбора способа подготовки проб к проведению серологического исследования является сохранение чувствительности и специфичности иммунологических реакций. Для оценки влияния БПЛ на данные показатели проводили постановку ИФА с инактивированными БПЛ взвесями *Y. pestis* 231, суспензиями из внутренних органов биопробных животных, а также с пробами, одновременно содержащими суспензии из внутренних органов биопробных животных и клещей, в которых ранее были выявлены антигены вируса ККГЛ. Результаты постановки ИФА, отраженные в табл. 2, свидетельствуют о диагностической точности иммунологической реакции для обнаружения *Y. pestis* по наличию антигена F1 и вируса ККГЛ по наличию специфических антигенов.

Следующим этапом стало изучение инактиви-

рующего действия БПЛ при пониженных температурах (в условиях холодильника) на взвеси *Y. pestis* 231 и суспензии из внутренних органов лабораторных животных, павших от чумы. Показано, что после обработки проб БПЛ в конечной концентрации 0,05 % в течение 18 ч рост чумного микроба отмечен на питательных средах на 2-е сутки, биопробные животные погибали на 4-е. При увеличении экспозиции до 24 ч получали обеззараженные образцы. Полной инактивации *Y. pestis* 231 добивались при обработке БПЛ в концентрации 0,1 % как в течение 18, так и 24 ч (табл. 3).

Таким образом, экспериментально подтверждено, что БПЛ в конечной концентрации 0,1 % при экспозиции 18–24 ч в условиях холодильника, а также экспозиции не менее 6 ч при температуре 37 °С обеззараживает *Y. pestis* 231 как во взвесях, так и в суспензиях из внутренних органов. Полученные результаты не выходят за рамки условий инактивации БПЛ арбовирусов. Модельные эксперименты показа-

Таблица 3

Оценка эффективности инактивации β-пропиолактоном в условиях холодильника суспензий из органов белых мышей, зараженных *Y. pestis* 231 (10<sup>9</sup> м.к./мл)

Экспозиция, ч	Концентрация БПЛ				
	0,1 %		0,05 %		0 %
	Посев на питательные среды	Посев внутренних органов биопроб	Посев на питательные среды	Посев внутренних органов биопроб	Посев на питательные среды
18	Нет роста	Нет роста	3*	4*	2*
24	Нет роста	Нет роста	Нет роста	Нет роста	2*

\* Время (в сутках) появления роста на средах.

ли, что использование данного препарата не снижает качества иммунологических реакций для детекции чумного микроба и арбовирусов. Следовательно, применение БПЛ может быть рекомендовано как способ подготовки для иммунологических исследований проб из сопряженных очагов чумы и арбовирусных инфекций. При этом оптимальными режимами являются обеззараживание 0,1 % БПЛ (конечная концентрация в пробе по объему) в течение 8–10 ч при 37 °С и в течение 96 ч при 4 °С. Способ применим для проб малых объемов (микролитры). Можно предположить, что данный способ будет эффективен также в отношении субстратов гнезд птиц и млекопитающих, погадок хищных птиц, а также материала от больных людей, или лиц с подозрением на заболевание. Предварительная подготовка повышает уровень безопасности работы персонала с материалом, содержащим одновременно возбудителей чумы и арбовирусных инфекций, сохраняя ценность проб для лабораторной диагностики.

Представленные в статье результаты оформлены в виде заявки о выдаче патента на изобретение «Способ подготовки проб для серологических исследований из сопряженных очагов чумы и арбовирусных инфекций» № 2006128696 (приоритет 07.08.2006 г.).

УДК 616.981.51:616-097

Н.Е.Терешкина, З.Л.Девдариани

## СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ ИММУНОДЕТЕКЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

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

Авторами представлен анализ отечественной и зарубежной литературы последних лет, посвященной вопросам иммунодиагностики сибирской язвы. Дана краткая характеристика основных достижений в области разработки методов обнаружения *Bacillus anthracis* и его антигенов с помощью различных иммунодиагностических тестов. Обсуждаются наиболее важные проблемы, связанные с повышением эффективности современных иммунодиагностик и их внедрением в практику.

*Ключевые слова:* *Bacillus anthracis*, иммунодиагностика, поликлональные антитела, моноклональные антитела, иммунодиагностические препараты.

Сибирская язва – особо опасное инфекционное заболевание, поражающее животных и человека, этиологическим фактором которого является *Bacillus anthracis*. Особенности биологии сибиреязвенного микроба, обеспечивающие длительное сохранение его в почве с формированием стойких очагов, обуславливая высокий эпизоотический и эпидемический потенциал возбудителя, отсутствие типичных клинических проявлений при генерализованной (септической) форме болезни, а также высокая вероятность использования *B. anthracis* в качестве бактериологического оружия предопределяют актуальность исследований, направленных на совершенствование диагностики сибире-

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безопасность работ с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). Санитарные правила. СП 1.3.1285-03. // Бюлл. норм. и метод. док. Госсанэпиднадзора. – 2003. – № 3 (13). – С. 77–78. – 2. Выявление циркуляции арбовирусов. Методы вирусологических и серологических исследований, клинико-эпидемиологические характеристики малоизученных арбовирусных инфекций, подходы к мониторингу природных очагов арбовирусов: Метод. рекомендации // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Вирусология. – 1991. – Т. 25. – С. 30–34. – 3. Малюкова Т.А., Головки Е.М., Костюкова Т.А. и др. // Пробл. особо опасных инф. – 2007. – Вып. 2 (94). – С. 64–66. – 4. Инструкция по контролю специфической стерильности экспериментальных препаратов, приготовленных из культур чумного или холерного микробов. – Саратов, 1982. – 8 с.

T.A.Maliukova, T.A.Kostiukova, E.M.Golovko, M.N.Lyapin,  
S.A.Shcherbakova, E.A.Plotnikova, E.V.Naidenova

### Preparation of the Materials, Sampled in Combined Foci of Plague and Arbovirus Infections, for Immunologic Assaying. Communication 2

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

The results of the second phase of the experiments are presented in the paper, where β-propiolactone was used to decontaminate materials from *Yersinia pestis*. Both slurries and suspensions of the internal organs were decontaminated of *Y. pestis* 231 with 0.1 % concentrations of the preparation after 18 to 24 hours' exposition in the refrigerator, as well as at 37 °C for as long as 6 hours or more. Optimal schedules for immunologic examination are offered to prepare the samples taken in the combined foci of plague and arboviral infections.

*Key words:* *Yersinia pestis*, arboviruses, decontamination, β-propiolactone, ELISA.

Поступила 30.11.06.

язвенной инфекции [9, 18, 19, 20, 22, 34].

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в этой области, создание новых быстрых и достоверных способов детекции сибиреязвенного микроба и его спор в объектах внешней среды и материале от больного остается приоритетной задачей. Бактериологическое исследование, оставаясь «золотым стандартом» диагностики любых бактериальных инфекций, в том числе сибирской язвы, требует значительных временных затрат (до трех суток) [8, 14, 16, 18, 19].

Практическое применение активно разрабатываемых в настоящее время генодиагностических

методов обнаружения *B. anthracis*, отличающихся быстротой получения результата, высокой чувствительностью и специфичностью, имеет ограничения, связанные с наличием в пробах из внешней среды примесей, ингибирующих полимеразную цепную реакцию (ПЦР), трудностью экстракции ДНК из спорных форм, а также необходимостью использования при постановке анализа дорогостоящих реактивов и оборудования [2, 16]. Поэтому особое внимание исследователей привлекает создание иммунодиагностикомов, которые, будучи относительно недорогими, наряду с высокой чувствительностью и специфичностью характеризуются экспрессностью, воспроизводимостью, простотой постановки и учета результатов [3, 10, 17]. Основным принцип иммунодетекции *B. anthracis*, заключающийся в визуальной или приборной регистрации реакции связывания микроорганизма или его антигенов со специфическими сибиреязвенными поли- и моноклональными иммунореагентами, реализуется при конструировании самых разнообразных иммунодиагностических тест-систем.

Одним из наиболее популярных методов выявления патогенных бактерий в нативном материале является люминесцентно-серологический или метод флуоресцирующих антител (МФА), основанный на обнаружении микроба при обработке специфическими антителами, мечеными флуорохромами. В нашей стране классический МФА относится к официально рекомендованным сигнальным методам обнаружения возбудителя сибирской язвы [14, 18, 19]. В последние годы предлагаются различные модификации данной методики. Так, эффективным в эксперименте оказался МФА с использованием меченных ФИТЦ антител кролика к соматическим антигенам сибиреязвенного микроба, предположительно содержащим диагностически значимые специфические белки S-слоя (фракции 1 и 3), полученным из культурального фильтрата *B. anthracis* СТИ [4, 11]. Применение экспериментальных иммунофлуоресцирующих диагностикумов, сконструированных на основе кроличьих антисывороток к соматическим белковым антигенам «С» (92 кДа) и «В» (30 кДа) *B. anthracis* СТИ-1 позволяет идентифицировать вегетативные формы возбудителя [5, 16]. Поскольку более активные в МФА антитела к белку «С» в рабочем титре взаимодействовали с *Bacillus cereus*, тогда как ФИТЦ-меченные иммуноглобулины к белку «В» обладали строгой специфичностью, но меньшей активностью, надежность этих диагностикумов обеспечивается только их сочетанным использованием. При помощи МКА к гамма-Д-глутаминовой кислоте, основному веществу капсулы *B. anthracis* [8, 34], методом прямой иммунофлуоресценции обнаруживали соответствующий антиген в сыворотке аэрозольно зараженных мышей, что совпадало с возникновением у них бактериемии [30].

Для идентификации спор сибиреязвенного микроба австралийские исследователи апробирова-

ли тест RAMP (rapid analyte measurement platform, англ.), основанный на детекции комплекса антиген-меченное флуорохромом антитело при помощи портативного ридера с использованием специфического коммерческого тест-картриджа. Система оказалась специфичной и эффективной для обнаружения 6000 и более спор в образце в течение 15 мин [28]. Хотя МФА является признанным методом экспресс-диагностики сибирской язвы, при его применении нередко случаи как ложноположительных результатов за счет кросс-реактивности поликлональных флуоресцирующих, особенно неадсорбированных иммуноглобулинов, обуславливающей неспецифическое свечение, так и ложноотрицательных результатов при наличии в материале атипичных форм *B. anthracis* или концентрации микроорганизмов ниже порога чувствительности анализа [8, 16, 18]. Вследствие этого люминесцентно-серологический метод рассматривается как ориентировочный и нуждается в подтверждении [8, 14]. Кроме того, он не всегда применим в полевых условиях, поскольку требует обязательного инструментального обеспечения.

Для обнаружения сибиреязвенного микроба или его специфического антигена эффективно используются различные варианты реакции преципитации. Сигнальным иммунодиагностическим методом, позволяющим уже в первый день исследования поставить предварительный диагноз, много десятилетий является реакция термопреципитации по Асколи, основанная на взаимодействии термостабильного сибиреязвенного антигена с гомологичной преципитирующей сывороткой [8, 14, 16, 18]. Существенным достоинством данного метода является его универсальность, так как он эффективен при исследовании любого, в том числе подвергнувшегося гниению материала. Однако реакция преципитации не является строго специфичной и недостаточно чувствительна [8, 16, 18]. Те же недостатки присущи двум другим преципитационным тестам – реакции иммунодиффузии в геле по Оухтерлони [8, 11, 16, 18] и официально рекомендованной для диагностики сибирской язвы реакции диск-преципитации [14, 16]. В обоих случаях отмечаются перекрестные реакции с почвенными сапрофитными бациллами, особенно *B. cereus* [14, 16], избежать которых можно, по мнению некоторых исследователей, лишь при использовании высокоспецифичной преципитирующей сыворотки [4, 8, 11, 16]. Кроме того, для исследования необходима относительно большая концентрация микроорганизмов, в связи с чем требуется подращивание культуры [16], что пролонгирует анализ.

Другим экспрессным методом иммунодиагностики сибирской язвы является реакция непрямой гемагглютинации (РНГА). В России сертифицирован «Диагностикум эритроцитарный сибиреязвенный иммуноглобулиновый сухой», производимый ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России» (г. Киров), который предназначен для выявления спор сибиреязвенного микроба в РНГА макро- и микрометодом с порогом

чувствительности  $1,56 \cdot 10^6$  и  $3,12 \cdot 10^6$  спор/мл соответственно. Несомненно перспективными представляются экспериментальные иммуноглобулиновые эритроцитарные диагностикумы на основе кроличьих антител к соматическим антигенам *B. anthracis*, продемонстрировавшие исключительную специфичность в отношении сибиреязвенного микроба различных генотипов и удовлетворительную чувствительность ( $6,25 \cdot 10^4$ – $2,5 \cdot 10^6$  м.к./мл) [4, 11]. Хотя геммагглютинационные тесты считаются достаточно достоверными [15, 18], применение эритроцитарных диагностикумов ограничивается нестабильностью входящих в их состав реагентов и меньшей чувствительностью по сравнению с некоторыми другими методами иммунодиагностики [12].

Среди современных иммунодиагностических методов наибольшей чувствительностью, воспроизводимостью и наглядностью отличаются различные модификации твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА, ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay, англ.) и иммуноблоттинг [3, 10, 17], которые заслуженно рассматриваются как наиболее перспективные тесты для детекции бактериальных патогенов, в том числе сибиреязвенного микроба [3, 16, 17]. В последнее время предложен целый ряд экспериментальных ELISA тест-систем для обнаружения *B. anthracis* и его антигенов. Наиболее часто их основой служат антитела к компонентам сибиреязвенного токсина – летальному фактору (ЛФ) и протективно-му антигену (ПА). Разработанный отечественными учеными ELISA для детекции ЛФ эффективно выявлял антиген в сыворотках крови инфицированных животных в продромальном периоде и в острой фазе заболевания в 100 % случаев, в то время как в материале из пораженных участков кожи положительная реакция зарегистрирована у 90–100 % животных [1]. R.Mabry *et al.* [32] сконструировали несколько вариантов сэндвич-ELISA для детекции ПА и ЛФ в сыворотке, которые обнаруживались до и после развития токсемии у биомоделей. С целью быстрого (в течение 1 ч) обнаружения ПА немецкими учеными разработан ТИФА на основе поликлональных кроличьих антител и моноклональных иммуноглобулинов с чувствительностью 15 и 60 нг/мл соответственно [29]. Применение МКА к ПА, полученных исследовательской группой из Индии, позволяло определять нанограммовые количества антигена в ELISA, а эффективное выявление ПА в 22 клинических образцах методом иммуноблотта делает их перспективными для диагностики сибирской язвы [36]. В России также получены МКА, направленные к эпитопам ПА [6], с потенциальной диагностической значимостью. Однако на их основе сконструирована экспериментальная иммуноферментная тест-система, предназначенная для количественного определения соответствующего антигена в полуфабрикатах на стадиях приготовления химической комбинированной сибиреязвенной вакцины [6], но не для диагностических целей.

Иммунодиагностика сибирской язвы прово-

дится с применением некоторых альтернативных иммунологических методик. Например, хемилюминесцентный анализ (ХЛИА) позволял выявлять сибиреязвенный микроб в концентрации  $10^2$ – $10^3$  м.к./мл, а его водорастворимые антигены – 0,2–0,5 нг/мл [13]. Хотя ХЛИА отличался достаточно высокой чувствительностью, использование кроличьих поликлональных антител к живым вегетативным клеткам штамма *B. anthracis* СТИ не позволяло добиться абсолютной специфичности реакции за счет наличия в их пуле иммуноглобулинов, кроссреагирующих с близкородственными микроорганизмами. G.W.Long, T.O'Brien [31] разработали специфические иммунохроматографические тесты – дипстики для детекции ПА и спор, в которых для визуализации реакции использовано коллоидное золото. Постановка анализа технически проста и занимает 15 мин, что делает его перспективным средством экспресс-диагностики сибиреязвенной инфекции. Заслуживает внимания и другой иммунохроматографический метод обнаружения ПА, который оказался высокоспецифичным в экспериментах на крупном рогатом скоте и не давал положительной реакции при исследовании крови животных после иммунизации живой споровой вакциной [35].

Для детекции споровых форм успешно апробирован также метод проточной цитометрии с использованием гомологичных поликлональных антисывороток [37] и моноклональных антител (МКА) различных изотипов и специфичностей [39]. Израильские ученые предложили оригинальный метод, сочетающий эффект переноса энергии частотного резонанса и реакции иммунофлуоресценции [41]. Сочетание мультипараметрических возможностей проточной цитометрического анализа с иммуноокрашиванием создает новый высокоселективный и чувствительный метод. При его разработке использованы кроличьи антитела к компонентам экзоспориума *B. anthracis*. S.Farrell *et al.* [25] предложен оригинальный ультрачувствительный быстрый способ детекции спор *Bacillus globigii*, который служил суррогатным видом для *B. anthracis*. В качестве твердой фазы использованы парамагнетические бусины Dynal. Первые антитела присоединяли к бусинам стрептавидин-биотиновым методом, вторые – метили щелочной фосфатазой. Ферментативное превращение флуоресцеина дифосфата в флуоресцеин щелочной фосфатазой измеряли в реальном времени при различных длинах волн. Предел чувствительности метода составил 78 спор в пробе, продолжительность анализа – 30 мин. Использование кроличьих иммуноглобулинов G, полученных к спорам сибиреязвенного микроба, и панели синтетических углеводов позволило обнаружить высокоспецифичный тетрасахаридный компонент, присутствующий на внешней поверхности экзоспоры *B. anthracis*, который может применяться в качестве ключевого биомаркера для детекции споровых форм данного микроорганизма [40].

В рамках бурно развивающегося современного

научного направления по созданию биологических микрочипов в США сконструирована удобная в полевых условиях миниатюрная биочиповая система для выявления распыленных в воздухе спор *B. globigii* [38]. Для этого чувствительный и селективный ELISA-тест с применением нового флуорогенного субстрата щелочной фосфатазы (диметилакридинона фосфата) скомбинирован с компактной биочиповой системой детекции, которая включает в себя миниатюрный диодовый лазер. Комбинирование портативного биоаэрозольного сэмплера и микрочиповой системы дает возможность обнаруживать 100 спор *B. globigii*, что соответствует 17 спорам, распыленным в 1 л воздуха. Другая группа американских исследователей сообщает о разработке специфических сенсоров на основе антител к спорам сибиреязвенного микроба, имеющих чувствительность 300 спор/мл [23], которые остаются селективными даже в присутствии большого количества спор других видов рода *Bacillus*, в частности *Bacillus thuringiensis* и *B. cereus* [24].

Весьма интересным представляется направление исследований, связанных с совместным применением иммунодиагностических приемов и ПЦР, что обеспечивает повышение чувствительности и специфичности анализа. К примеру, сочетанное использование магноиммосорбентов с кроличьими антителами к споровым антигенам сибиреязвенного микроба и ПЦР для обнаружения *B. anthracis* в искусственно контаминированных пробах почвы, воды, грубых кормов и др. позволяло при применении оптимальной методики исследования обнаружить до 50 спор в 1 мл образца [2]. Несмотря на очень высокую чувствительность, метод, по мнению разработчиков, нуждается в совершенствовании, связанном с повышением его специфичности и оптимизацией различных этапов проведения анализа. Сочетание мультиплексного иммуноанализа на основе высокоспецифичных антител и ПЦР в реальном времени составляет основу автоматизированной автономной системы детекции патогенов, разработанной в США для быстрого выявления ряда опасных микроорганизмов, включая *B. anthracis* [27, 33].

Таким образом, на сегодняшний день как у нас в стране, так и за рубежом разработано множество различающихся по регистрируемому эффекту и технике постановки иммунодиагностических тестов, предназначенных для выявления возбудителя сибирской язвы. Тем не менее совершенствование способов обнаружения *B. anthracis* не теряет актуальности во всем мире. Это связано прежде всего с тем, что несмотря на высокую эффективность в эксперименте многие тест-системы нуждаются в дальнейшей существенной доработке, чтобы получить статус сертифицированных диагностических средств. Так, в нашей стране существует всего два коммерческих препарата для иммунодиагностики сибирской язвы: эритроцитарный сибиреязвенный иммуноглобулиновый диагностикум, упомянутый

выше, и «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие сибиреязвенные неадсорбированные сухие» («Медгамал», Москва), причем последний в соответствии с Инструкцией по применению предназначен для учебных целей. В этой связи наиболее перспективным представляется конструирование таких современных высокочувствительных тестов как ELISA, дот-иммуноанализ, иммуноблоттинг, а также изготовление дипстиков и создание иммуночипов.

Поскольку специфичность иммунодиагностических тестов определяется свойствами антител, особую важность приобретает оптимизация способов получения высокоаффинных строго специфичных иммуноглобулинов [3, 17]. Именно недостаточная специфическая активность последних, как правило, предопределяет невысокое качество разрабатываемых иммунодиагностикумов. Трудности в получении видоспецифических сибиреязвенных антител закономерны и обусловлены тесным генетическим и антигенным родством *B. anthracis* с другими представителями рода *Bacillus* [8, 16, 20, 34]. Безусловный интерес с этой точки зрения представляют гибридная биотехнология, позволяющая получить МКА, характеризующиеся стандартностью и строгой специфичностью [3, 16], использование F(ab)<sub>2</sub>-фрагментов поликлональных иммуноглобулинов [7] и с успехом апробированная на других бактериальных моделях безадсорбционная технология получения монорецепторных поликлональных антител к основным диагностически значимым антигенам патогена [21, 26]. Поэтому на современном этапе основной задачей исследований в области иммунодетекции возбудителя сибирской язвы становится разработка оригинальных высокотехнологичных подходов к изготовлению качественных иммунореагентов, а также конструирование и внедрение в практику эффективных тест-систем, адаптированных к масштабируемому серийному производству сертифицированных медицинских иммунобиологических препаратов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абалакин В.А., Сергеева Л.В., Черкасский Б.Л. // ЖМЭИ. – 1989. – № 12. – С. 63–68. – 2. Абгарян А.Г., Еременко Е.И., Ефременко В.И. и др. // ЖМЭИ. – 2003. – № 6 (Приложение). – С. 47–51. – 3. Антитела. Методы: Кн. 1 / Под ред. Д. Кэтти (ред.). – М.: Мир, 1991. – 287 с. – 4. Баркова И.А., Липницкий А.В., Барков А.М., Евтеева Е.В. // Биотехнология. – 2005. – № 2. – С. 91–96. – 5. Безносов М.В., Голубинский Е.П., Родзиковский А.В., Панченко С.Г. // Карантин. и зоонозн. инф. в Казахстане. – 2001. – № 4. – С. 72–75. – 6. Бондарев В.П., Филиппов А.В., Дармов И.В. и др. // Пробл. особо опасных инф. – 2007. – № 1 (93). – С. 66–69. – 7. Буерова С.В., Галиуллин А.К., Хаертынов К.С. // Вет. врач. – 2001. – № 3. – С. 85–87. – 8. Бургасов П.Н., Рожков Г.И. Сибиреязвенная инфекция. – М.: Медицина, 1984. – 207 с. – 9. Воробьев А.А. // ЖМЭИ. – 2007. – № 1. – С. 105–108. – 10. Дзантиев Б.Б., Жердев А.В., Попов В.О. и др. // Клин. лаб. диагн. – 2002. – № 8. – С. 25–32. – 11. Евтеева Е.В. Внеклеточные антигены сибиреязвенного микроба и их диагностическое значение: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Волгоград, 2003. – 29 с. – 12. Каральник Б.В. Эритроцитарные диагностикумы. – М.: Медицина, 1976. – 164 с. – 13. Коваленко А.А. Разработка хемиллюминесцентного анализа для иммунодиагностики сибирской язвы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Саратов, 1992. – 16 с. – 14. Лабораторная диагностика сибирской язвы у животных и людей, обнаружение возбудителя в сырье животного происхождения и объектах

внешней среды: Метод. указ. – М.: ВО «Агропромиздат», 1989. – 30 с. – 15. Лухнова Л. Ю., Пазылов Е. К., Мека-Меченко Т. В. и др. // Карантин и зооноз. инф. в Казахстане. – 2002. – № 6. – 56–60. – 16. Маринин Л. И., Онищенко Г. Г., Степанов А. В. и др. Микробиологическая диагностика сибирской язвы. – М.: ВУНМЦ МЗ РФ, 1999. – 221 с. – 17. Новые методы иммуноанализа / Под ред. У.П.Коллинз. – М.: Мир, 1991. – 280 с. – 18. Онищенко Г. Г., Васильев Н. Т., Литусов Н. В. и др. Сибирская язва: Акт. асп. микробиол., эпидемиол., клин. диагн., лечения и профилактик. – М.: ВУНМЦ МЗ РФ, 1999. – 448 с. – 19. Покровский В. И., Черкасский Б. Л. // Эпидемиол. и инф. бол. – 2002. – № 2. – С. 57–60. – 20. Смирнова Н. И., Кутырев В. В. // Мол. генет., микробиол., вирусол. – 2006. – № 2. – С. 9–19. – 21. Терешкина Н. Е. Изучение капсульных и бескапсульных форм *Vibrio cholerae* O139 с использованием поли- и моноклональных антител: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Саратов, 2004. – 23 с. – 22. Черкасский Б. Л. Эпидемиология и профилактика сибирской язвы. – М.: ИНТЕРСЭН, 2002. – 384 с. – 23. Campbell G. A., Mutharasan R. // Biosens. Bioelectron. – 2006. – Vol. 21. – № 9. – P. 1684–1692. – 24. Campbell G. A., Mutharasan R. // Anal. Chem. – 2007. – Vol. 79, N 3. – P. 1145–1152. – 25. Farrell S., Halsall H. B., Heineman W. R. // Analyst. – 2005. – Vol. 130, N 4. – P. 489–497. – 26. Feodorova V. A., Gromova O. V., Devdariani Z. L. et al. // J. Med. Microbiol. – 2001. – Vol. 50, N 6. – P. 499–508. – 27. Hindson B. J., McBride M. T., Makarewicz A. J. et al. // Anal. Chem. – 2005. – Vol. 77, N 1. – P. 284–289. – 28. Hoile R., Yuen M., James G., Gilbert G. L. // Forensic. Sci. Int. – 2007. – Vol. 171, N 1. – P. 1–4. – 29. Klein-Albers C., Bohm R. // Zentralbl. Veterinarmed. B. – 1989. – B. 36, N 3. – S. 226–230. – 30. Kozel T. R., Murphy W. J., Brandt S. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol. 101, N 14. – P. 5042–5047. – 31. Long G. W., O'Brien T. // J. Appl. Microbiol. – 1999. – Vol. 87, N 2. – P. 214. – 32. Mabry R., Brasky K., Geiger R. et al. // Clin. Vaccine Immunol. – 2006. – Vol. 13, N 6. – P. 671–677. – 33. McBride

M. T., Masquelier D., Hindson B. J. et al. // Anal. Chem. – 2003. – Vol. 75, N 20. – P. 5293–5299. – 34. Mock M., Fouet A. // Annu. Rev. Microbiol. – 2001. – Vol. 55. – P. 647–671. – 35. Muller J. D., Wilks C. R., O'Riley K. J. et al. // Aust. Vet. J. – 2004. – Vol. 82. – P. 220–222. – 36. Sastry K. S., Tuteja U., Batra H. V. // Indian J. Exp. Biol. – 2003. – Vol. 41. – P. 123–128. – 37. Stopa P. J. // Cytometry. – 2000. – Vol. 41. – P. 237–244. – 38. Stratis-Cullun D. N., Griffin G. D., Mobley J. et al. // Anal. Chem. – 2003. – Vol. 75, N 2. – P. 275–280. – 39. Swiecki M. K., Lisanby M. W., Shu F. et al. // J. Immunol. – 2006. – Vol. 176, N 10. – P. 6076–6084. – 40. Wang D., Carroll G. T., Turro N. J. et al. // Proteomics. – 2007. – Vol. 7, N 2. – P. 180–184. – 41. Zahavy E., Fisher M., Bromberg A., Olshevsky U. // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 69. – P. 2330–2339.

N.E.Tereshkina, Z.L.Devdariani

#### Present Status of the Anthrax Pathogen Immunodiagnosis

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Analysis of the recent domestic and foreign publications concerning the problems of anthrax immunodiagnosis is presented in the current review. The major achievements in the development of the procedures to detect *Bacillus anthracis* and its antigens using various immunodiagnostic assays are briefly characterized. The most important problems are discussed in connection with the efforts to increase the efficacy of the modern immunodiagnostic kits and their introduction into practice.

*Key words:* *Bacillus anthracis*, immunodiagnosis, polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, immunodiagnostic kits.

Поступила 07.09.97.

УДК 616.981.452

Е.В.Чеботарев, А.А.Бывалов, Н.Н.Зайцева, В.В.Роман, А.В.Кожемяко

### КИСЛОРОДЗАВИСИМОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ *YERSINIA PESTIS*

ФГУ «48 Центральный НИИ Минобороны России», Киров

Предложен способ восстановления жизнеспособности замороженных при температуре минус (20±2) °С и длительно (7–16 мес.) хранившихся культур *Yersinia pestis*. Способ заключается в аэрировании 10 см<sup>3</sup> оттаявшей культуры в стеклянном флаконе вместимостью 120 см<sup>3</sup> встряхиванием на шуттель-аппарате под ватными пробками при температуре (27±1) °С. Показана кислородная и энергетическая зависимость процесса репарации поврежденных бактерий. Восстановление жизнеспособности предотвращается в атмосфере аргона, при ингибировании дыхания клеток цианидом (KCN) и разобщении окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенолом (2,4-ДНФ). Способность к репарации проявляют бактериальные культуры, сохранившие энергозависимую ауторегуляцию дыхательной активности, оцениваемую по предложенным параметрам дыхания, прежде всего по величине метаболического дыхательного контроля (МДК).

*Ключевые слова:* *Yersinia pestis*, репарация бактериальных клеток, метаболический дыхательный контроль (МДК).

Разработка способов поддержания и восстановления у бактериальных культур при их длительном хранении таких значимых критериев жизнеспособности, как рост и размножение в питательных средах, устойчивость к действию неблагоприятных (экстремальных) факторов внешней среды на уровне исходных параметров является одной из важных задач практической микробиологии [4].

Жизнеспособность микроорганизмов – это не только живое состояние исследуемых объектов, но и их генетическая и фенотипическая полноценность, способность нормально функционировать в различных, в том числе и в неблагоприятных усло-

виях, устойчивость и толерантность к ним, адаптационные и компенсаторные возможности, защитные свойства клеток, их ростовой и репродуктивный потенциалы [7].

При действии экстремальных факторов на живую систему, к числу которых относятся «замораживание – оттаивание», тепловое воздействие, длительное хранение бактериальных культур, имеют место следующие явления [1]: возникновение первичных повреждений структур и клеточных компонентов; развитие патологического процесса, т.е. деструктивные последствия и функциональные нарушения, вызванные выпадением или функциональным сдвигом нарушенного звена ин-



тегральной системы жизнеобеспечения клетки; адаптивный отклик клетки и репарация полученных повреждений.

Известно, что способность к репарации носит у поврежденных микроорганизмов энергозависимый характер, являясь, в то же время, одним из наиболее информативных показателей их физиологического состояния [3, 10–14]. На примере *Escherichia coli* и *Salmonella anatum* показано, что восстановление ростовых свойств у грамотрицательных бактерий после замораживания-оттаивания требует энергетических затрат: восстановление замедляется при разобщении реакций окислительного фосфорилирования введением в репарационную среду 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ), а также при ингибировании дыхания цианидом и азидом [11–13]. Следовательно, эффективность процессов восстановления жизнеспособности зависит не только от подбора оптимальных условий репарации (определенного температурно-временного режима, состава среды восстановления и т.д.), но и от исходного уровня энергизованности бактерий. При одинаковых условиях репарации клеток с различной степенью повреждения эффективность восстановления жизнеспособности определяется глубиной дисрегуляции энергозависимых функций бактерий. Последнее обстоятельство позволяет не только подобрать условия компенсации функциональных свойств у поврежденных микроорганизмов, но и одновременно оценить значимость разработанных нами ранее параметров ауторегуляции дыхательной активности для характеристики физиологического состояния бактерий *Yersinia pestis* и их способности к репарации некоторых свойств [9].

Важная роль кислородзависимых процессов в реализации многих функциональных свойств аэробных и факультативно-анаэробных бактерий [6] позволяет предположить, что аэрирование после оттаивания длительно хранившихся в замороженном состоянии культур *Y. pestis*, имеющих в своем составе клетки с нарушенными функциями (например, способность к росту на плотных питательных средах, устойчивость к повышенным температурам), будет обеспечивать восстановление жизнеспособности у поврежденных бактерий.

### Материалы и методы

В работе использовали глубинные культуры *Y. pestis* (штамм ЕВ), выращенные в жидких средах на основе ферментативного гидролизата мяса крупного рогатого скота в лабораторных культиваторах ЛКВ (Швеция) с рабочим объемом 1,0 л в течение 30 ч при температуре  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$  и pH  $7,0 \pm 0,3$ . По окончании выращивания к культурам добавляли стабилизирующую жидкость (в объемном соотношении 1:1), содержащую сахарозу (3 % вес.), глицерин (6 % об.) и фосфатный буфер  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,2 % об.). Полученные таким образом стабилизированные культуры разливали по 30 см<sup>3</sup> в стеклян-

ные флаконы вместимостью 120 см<sup>3</sup> и хранили под ватно-марлевыми пробками при температуре минус  $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$  до 16 мес.

После хранения и оттаивания в течение 30–40 мин при температуре  $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$  исследуемые культуры разливали по 10 см<sup>3</sup> в стеклянные флаконы вместимостью 120 см<sup>3</sup> и аэрировали в кислородсодержащей атмосфере воздуха встряхиванием на шуттель-аппарате при температуре  $(27 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  под ватными пробками. При частоте встряхивания 140–160 качаний в минуту степень аэрации культур по величине сульфитного числа ( $K_s$ ) составила 0,6–0,7 мМО<sub>2</sub>/дм<sup>3</sup>·мин. Культуры аэрировали в предварительных опытах от 30 до 180 мин, в дальнейших экспериментах – в течение 90 мин. В качестве контроля использовали культуры в бескислородной газовой среде аргона во флаконах с плотно закрытыми резиновыми пробками, а также культуры, хранившиеся в процессе опыта во флаконах под ватно-марлевыми пробками при температуре  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$  без встряхивания.

Жизнеспособность свежеприготовленных, хранившихся и аэрированных культур оценивали по содержанию в них колониеобразующих микроорганизмов (биологическая концентрация) и по их устойчивости к повышенной температуре (терморезистентность).

Биологическую концентрацию (БК) определяли общепринятым «чашечным» методом, высевая разведенные клеточные культуры на плотную питательную среду (ППС) в чашках Петри и подсчитывая число колоний через 3 сут выращивания при температуре  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ . Биологическую концентрацию свежеприготовленных культур принимали за 100 %.

Для определения терморезистентности исследуемые культуры прогревали при температуре  $(47 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  в течение 1 ч в термостате в объеме 5 см<sup>3</sup> в стеклянных пробирках под ватно-марлевыми пробками. Устойчивость бактерий к прогреву ( $\Pi_{47}$ ) определяли как частное от деления разницы десятичных логарифмов БК культуры до и после температурного воздействия на продолжительность прогрева [ $\Pi_{47} = (\lg \text{БК}_{\text{исх.}} - \lg \text{БК}_{\text{прогр.}}) / 1 \text{ ч}$ ].

Степень повреждения барьерных функций клеточных мембран определяли полярографически по величине стимуляции дыхания бактерий экзогенным никотинамидадениндинуклеотидом восстановленным ( $\text{СД}_{\text{НАД-Н}}$ ) согласно методике [2]. Для интактных барьерных структур  $\text{СД}_{\text{НАД-Н}}$  равен 1,00. Чем выше значения  $\text{СД}_{\text{НАД-Н}}$ , тем глубже нарушения избирательной проницаемости бактериальных цитоплазматических мембран.

Дыхательную активность бактериальных культур измеряли при температуре  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$  на лабораторной установке для полярографической (хроноамперометрической) регистрации скорости убыли кислорода из среды инкубации, применяя поляризующийся платиновый электрод открытого типа [8]. Рабочий объем полярографической ячейки – 2 см<sup>3</sup>. В качестве среды инкубации использовали водно-

солевой раствор следующего состава: 60 см<sup>3</sup> 0,15 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O; 40 см<sup>3</sup> 0,075М KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,4 см<sup>3</sup> 1 М MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, (рН 7,15). Растворы субстратов (глюкоза, НАД·Н), разбавителя – протонофора (2,4-динитрофенол) и ингибитора дыхания (цианид калия) готовили на среде, идентичной по составу среде инкубации. Исходная концентрация кислорода в среде инкубации – 120 нмоль O<sub>2</sub>/см<sup>3</sup>. Объемы исследуемых культуральных проб составляли 10–50 мкл из расчета создания в среде инкубации полярографической ячейки общей концентрации, примерно, (1–3)·10<sup>9</sup> кл./см<sup>3</sup>.

По полярограммам рассчитывали следующие параметры дыхания: V<sub>энд.</sub> – удельная скорость эндогенного дыхания бактерий, нмоль O<sub>2</sub>/млрд кл.·мин; СД<sub>гл.25</sub> – коэффициент стимуляции эндогенного дыхания бактерий глюкозой в конечной концентрации 25 нмоль/см<sup>3</sup>, отн. ед.; МДК – коэффициент метаболического дыхательного контроля, отн. ед. Характеристика и способы расчета параметров дыхания клеток *Y. pestis* приведены в опубликованной ранее работе [9].

Статистическую обработку результатов изменений проводили в соответствии с рекомендациями Г.Ф.Лакина [5], вычисляя средние арифметические значения показателей и доверительные интервалы их отклонений (X±I<sub>95</sub>) для уровня вероятности 95 %. Достоверность различий при необходимости определяли, сравнивая расчетные (t<sub>расч.</sub>) и табличные (t<sub>табл.</sub>) значения критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

Предварительные опыты со стабилизированными культурами *Y. pestis*, хранившимися при температуре минус (20±2) °С в течение 7–12 мес., результаты которых представлены на рисунке, показали, что аэрирование оттаявших культур приводит к существенному снижению их термочувствительности уже через 30 мин от начала аэрации. Параметр П<sub>47</sub> достигает статистически значимого минимума (соответствующего уровню терморезистентности свежеприготовленных культур) через 90 мин встряхивания на шуттель-аппарате и незначительно меняется в течение дальнейших 90 мин аэрирования.

Как следует из данных, представленных на рисунке, уменьшение термочувствительности предотвращается введением в культуру перед аэрацией разбавителя – протонофора 2,4-динитрофенола (2,4-ДНФ) и ингибитора дыхания цианида калия (KCN). Причем о полном ингибировании дыхания цианидом судили по отсутствию стимуляции дыхательной активности клеток глюкозой (СД<sub>гл.25</sub> = 1,00), так как культуры, сохраняющие способность окислять глюкозу (СД<sub>гл.25</sub> > 1,00) при практически полном подавлении эндогенного дыхания ингибитором, проявляли, хотя и в меньшей степени, способность к репарации.

В контрольных пробах, встряхиваемых на шуттель-аппарате без доступа кислорода в атмос-

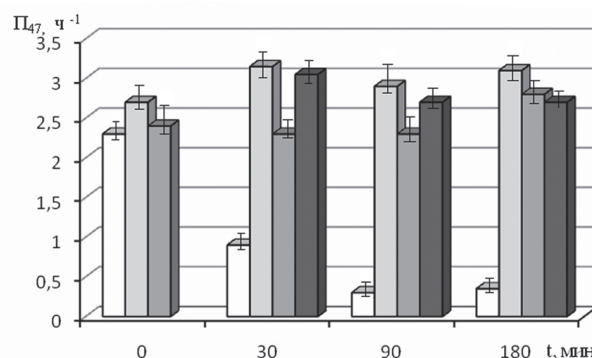
фере аргона (рисунок), термостойчивость бактерий статистически значимо не менялась по сравнению с исходной величиной, и это свидетельствует об определяющей роли кислородзависимых метаболических реакций в процессе репарации.

Таким образом, приведенные на рисунке данные подтверждают существенное увеличение терморезистентности длительно хранившихся культур *Y. pestis* в результате аэрирования и свидетельствуют об энергезависимом характере репарации, так как и разбавитель окислительного фосфорилирования и ингибитор дыхания предотвращают данный процесс. В дальнейшем мы применяли полуторачасовой режим аэрирования проб в кислородсодержащей атмосфере воздуха в качестве теста на способность бактерий в составе различных культур к репарации.

Использованные в опытах культуры проявили различную способность к кислородзависимой репарации в заданных условиях, и по степени выраженности данного признака они были разделены на три условные группы: А, Б и В. Результаты сравнительного определения способности к репарации аэрированием в кислородсодержащей атмосфере 13 стабилизированных культур с различными сроками хранения в замороженном состоянии и последующем оттаивании представлены в табл. 1

В группу А объединили культуры, аэрирование которых приводило не только к достоверному уменьшению термочувствительности, но и к достоверному увеличению жизнеспособности по показателю БК. В группу Б вошли культуры, способные к восстановлению только термостойчивости, а в группу В – культуры, не проявляющие способности к репарации ни по одному из вышеперечисленных показателей.

После полуторачасового аэрирования культуры групп А и Б демонстрируют высокую термостойчивость (0,29±0,06 ч<sup>-1</sup> и 0,28±0,08 ч<sup>-1</sup>, соответственно), которая близка уровню, определенному у свежеприготовленных (до замораживания) серий культуры, а именно: (0,20±0,04) ч<sup>-1</sup>. Кроме того, в результате аэ-



Изменение термочувствительности бактерий *Y. pestis* по показателю П<sub>47</sub> в зависимости от продолжительности аэрирования культур, доступа к ним кислорода, наличия в пробах ингибитора дыхания KCN и разбавителя окислительного фосфорилирования 2,4-ДНФ:  
 □ – проба без добавок; □ – в пробе 2,4-ДНФ, 1·10<sup>-4</sup> М;  
 ■ – в пробе KCN, 1·10<sup>-4</sup> М; ■ – проба без добавок и без доступа кислорода (атмосфера аргона), контроль

Таблица 1

Изменение биологической концентрации (БК)<sup>1)</sup>, термочувствительности (П<sub>47</sub>) и степени нарушения барьерных функций клеточных мембран (СД<sub>НАДН</sub>) в результате полторачасового аэрирования длительно хранившихся культур *Y. pestis* (X±J<sub>95</sub>, n = 8–10)

Группа	Номер культуры	Срок хранения, мес.	Показатели до аэрирования			Показатели после аэрирования		
			БК, %	П <sub>47</sub> , ч <sup>-1</sup>	СД <sub>НАДН</sub> , отн. ед.	БК, %	П <sub>47</sub> , ч <sup>-1</sup>	СД <sub>НАДН</sub> , отн. ед.
А	1, 2	7–9	72,3±11,4	0,99±0,12	1,06±0,06	94,1±8,1	0,29±0,06	1,00
Б	1 <sup>2)</sup> , 3–11	7–16	59,2±7,2	2,36±0,19	2,33±0,78	58,5±7,0	0,28±0,08	1,20±0,13
В	12, 13	11–12	66,1±16,0	2,76±0,28	1,72±0,24	60,2±14,3	2,65±0,70	1,50±0,28

Примечания: <sup>1)</sup> Изменение БК приводится в процентах относительно исходной биологической концентрации свежеприготовленных культур (принята за 100 %); <sup>2)</sup> Культура № 1 исследована повторно после 3-кратного цикла «замораживание минус (20±2) °С – оттаивание(20±2) °С».

рирования культур групп А и Б достоверно уменьшается по показателю СД<sub>НАДН</sub> степень повреждения барьерных функций бактерий, определяемая уровнем структурно-функциональной организации клеточных мембран. Исходно более низкие значения СД<sub>НАДН</sub> в культурах группы В обусловлены, по всей видимости, общим снижением уровня дыхательной активности бактерий данной группы, что подтверждают приведенные ниже результаты экспериментов.

Дополнительное воздействие на культуру № 1 (группа А) трехкратного цикла «замораживание минус (20±2) °С – оттаивание (20±2) °С» приводит к углублению структурно-функциональных повреждений бактерий и, как следствие, к утрате ими способности к восстановлению ростового и репродуктивного потенциалов при сохранении способности к репарации терморезистентности, что характерно для культур группы Б.

Из данных литературы известно, что репарационные процессы в поврежденных клетках ряда грамотрицательных факультативно-анаэробных микроорганизмов (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*) сопровождаются усиленным синтезом липидов мембранных структур и перестройкой их жирно-кислотного состава [10]. Не исключено, что регистрируемая репарация барьерных функций, равно как и увеличение терморезистентности бактерий *Y. pestis*, также обусловлены изменениями в липидном составе клеточных мембран, поскольку ингибитор биосинтеза липидов церуленин, добавленный в пробы культур № 8 и 9 в конечной концентрации 300 мкг/см<sup>3</sup>, полностью предотвращал процесс повышения их термоустойчивости аэрированием.

Таблица 2

Параметры дыхания<sup>1)</sup> длительно хранившихся культур *Y. pestis* (X±J<sub>95</sub>, n = 8–10)

Группа	Номер культуры	Срок хранения, мес.	Параметры дыхания		
			V <sub>энл.</sub> , нмоль O <sub>2</sub> /млрд кл. · мин	СД <sub>л.25</sub> , отн. ед.	МДК, отн. ед.
А	1, 2	7–9	2,0±0,8	2,93±0,51	2,13±0,29
Б	1 <sup>2)</sup> , 3–11	7–16	1,8±0,8	2,70±0,50	1,64±0,18
В	12, 13	11–12	1,4±0,4	1,13±0,02	1,00

Примечания: <sup>1)</sup> Наименование параметров дыхания приводится в тексте. <sup>2)</sup> Культура № 1 исследована повторно после 3-кратного цикла «замораживание минус (20±2) °С – оттаивание(20±2) °С».

Как следует из данных табл. 1, способность к репарации не зависит от продолжительности хранения культур в замороженном состоянии, от содержания в их составе бактерий, сохранивших после хранения и оттаивания способность к образованию колоний на ППС в чашках Петри (БК), в том числе (и это отмечено для культур групп Б и В) после дополнительного температурного воздействия (П<sub>47</sub>) на них. В то же время выявленные закономерности и групповые различия в восстановлении жизнеспособности бактерий в составе длительно хранившихся культур хорошо согласуются с результатами оценки уровня регуляции их дыхательной активности по предложенным нами ранее параметрам [9]. Прежде всего это относится к показателю метаболического дыхательного контроля (МДК), информативность которого для оценки физиологического состояния бактерий была продемонстрирована на примере развивающихся и переживающих культур *Y. pestis*.

В табл. 2 приводятся статистические значения параметров дыхания исследованных до аэрирования культур, входящих в состав групп А, Б и В, которые свидетельствуют о том, что культуры группы А отличаются достоверно более высокими значениями МДК (t<sub>расч.</sub> = 2,96, t<sub>табл.</sub> = 2,18), по сравнению со значениями МДК культур группы Б. Утрата метаболического дыхательного контроля (МДК = 1,00) у клеток группы В при слабой стимуляции дыхания глюкозой и низкой скорости окисления эндогенных субстратов свидетельствует о более глубоком, нежели у культур групп А и Б, нарушении энергозависимой ауторегуляции дыхания бактерий *Y. pestis*, что, по-видимому, и предопределяет их неспособность к репарации.

Таким образом, можно полагать, что энергопродуктивные метаболические процессы, эффективность которых отражает уровень ауторегуляции дыхательной активности поврежденных микроорганизмов, определяют способность бактерий (либо отсутствие таковой) к восстановлению ростовых свойств и термоустойчивости при аэрировании длительно хранившихся культур *Y. pestis*, и параметры дыхания, прежде всего метаболический дыхательный контроль (МДК), характеризуют эффективность внутриклеточных энергозависимых реакций, участвующих в процессах репарации. В то же время полученные экспериментальные данные о кислородзависимой репарации

бактерий как активном метаболическом процессе позволяют рассматривать его в качестве самостоятельного теста для определения глубины нарушения жизнеспособности клеток при действии экстремальных факторов на бактериальные культуры.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Александров В.Я. Клетки, макромолекулы и температура. – Л.: Наука, 1975. – 330 с. – 2. Игнатов С.Г., Красильников В.А., Перельгин В.В. и др. // Биохимия. – 1981. – Т. 46, вып. 11. – С. 1996–2003. – 3. Игнатов С.Г., Андреева О.В., Евдокимова О.А. и др. // Биохимия. – 1982. – Т. 47, вып. 10. – С. 1621–1623. – 4. Кробиология и биотехнология / Под ред. А.А.Цуцаевой. – Киев: Наукова думка, 1987. – 5. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1980. – 6. Лукьянова Л.Д., Балмуханов Б.С., Уголев А.Т. Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние. – М.: Наука, 1982. – 302 с. – 7. Луста К.А., Фихте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов / Под ред. В.К.Ерошина. – Пушкино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1990. – С. 8–45. – 8. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. Под ред. Г.М.Франка. – М.: Наука, 1973. – 9. Чеботарев Е.В., Пименов Е.В., Бывалов А.А. и др. // Пробл. особо опасных инф. – 2006. – Вып. 2 (91). – С. 49–53. – 10. Veuchat L.R. // Adv. Appl. Microbiol. – 1978. – Vol. 23. – P. 219–243. – 11. Ray B., Janssen D.W., Busta F.F. // Appl. Microbiol. –

1972. – Vol. 23, N 4. – P. 803–809. – 12. Ray B., Jereski J.I., Busta F.F. // Appl. Microbiol. – 1971. – Vol. 22, N 3. – P. 401–407. – 13. Ray B., Speck M.L. // Appl. Microbiol. – 1972. – Vol. 24, N 4. – P. 585–590. – 14. Tain V.K., Gupta I., Lata K. // Realist. Res. – 1982. – Vol. 92, N 3. – P. 463–473.

E.V.Chebotaryov, A.A.Byvalov, N.N.Zaitseva,  
V.V.Roman, A.V.Kozhemyako

#### Oxygen-Dependent Recovery of *Yersinia pestis* Viability

48<sup>th</sup> Central Research Institute of the RF Defense Ministry, Kirov

The following technique is offered for restoration of viability of *Yersinia pestis* cultures lyophilized at  $(-20 \pm 2)^\circ\text{C}$  and stored for a long time (7–16 months): 10 cm<sup>3</sup> melted culture in a 120 cm<sup>3</sup> glass bottle under cotton stoppers is aerated by rocking in a shaker at  $(27 \pm 1)^\circ\text{C}$ . The process of reparation of the injured bacteria was shown to depend on the presence of the oxygen and energetic sources. Viability reparation was prevented in the atmosphere of argon, when cells' breath was inhibited by cyanide (KCN), and in the case of uncoupling of the oxidative phosphorylation process by 2,4-dinitrophenol (2,4-DNF). Reparation capability was manifested by the bacterial cultures that had retained energy-dependent autoregulation of the breathing activity, estimated according to the respiration parameters, and especially by the magnitude of the metabolic breathing control (MBC).

*Key words:* *Yersinia pestis*, bacterial cells reparation, metabolic respiratory control (MRC).

Поступила 04.06.07.

## БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 616.932:615.371/.372

О.А.Волох, И.А.Шепелёв, С.П.Заднова, И.М.Крепостнова, С.А.Еремин

### ИЗУЧЕНИЕ БИОКИНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ И ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА – ПРОДУЦЕНТОВ ПРОТЕКТИВНЫХ АНТИГЕНОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ВНЕДРЕНИЯ В ПРОИЗВОДСТВО

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Представлены основные биокинетические показатели роста штаммов *V. cholerae* O1 (классического и эльтор биоваров), O139, не O1 / не O139 – серогрупп, являющихся продуцентами основных протективных антигенов (O1 и O139 антигенов, холерного токсина I и II типов, В-субъединицы холерного токсина II типа, токсин-регулируемых пилей адгезии) при глубинном культивировании. Для каждого штамма определены оптимальные условия (питательные среды, pH, время культивирования, использование дополнительного источника углеводов) для максимальной продукции протективных антигенов в условиях производства, что позволит использовать их для изготовления более эффективных вакцинных препаратов, а также для получения в очищенном виде основных протективных антигенов *V. cholerae* с целью создания диагностических препаратов.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, глубинное культивирование, протективные антигены.

Холера – опасное эпидемическое заболевание, вызываемое токсигенными штаммами *Vibrio cholerae* O1 (классического и эльтор биоваров) и O139 серогрупп. В связи с сохранением эндемичных по холере территорий в Азии и Африке и постоянной миграцией населения обстановка по холере в мире и Российской Федерации остается неблагоприятной. Поэтому существует настоятельная необходимость создания химических холерных вакцин, эффективных против всех трех эпидемических вариантов *V. cholerae*, а также диагностических тест-систем, на основе очищенных основных протективных антигенов, для оценки качества выпускаемых вакцинных препаратов.

В России производится химическая вакцина «холероген-анатоксин», содержащая O1-антиген сероваров Инаба и Огава и анатоксин, а также ряд ферментов – протеазу, фосфолипазу, нейраминидазу [2], формирующая анитоксический и антибактериальный иммунитет. Для изготовления указанной вакцины используют штамм O1 серогруппы классического биовара *V. cholerae* 569 серовара Инаба, который продуцирует незначительное (9 мкг/мл) количество холерного токсина (ХТ) в среду выращивания и синтезирует незначительное количество токсин-регулируемых пилей адгезии (ТКПА) на поверхности клеток, выявляющихся только высокочувстви-

тельным методом иммуноблоттинга. Для внесения O1 антигена Огава применяют штамм *V. cholerae* M41 серовара Огава. Кроме того, изготавливаются экспериментальные серии вакцины, дополненные O139 антигеном [1]. Однако недостатком данных вакцин является отсутствие в их составе ТКПА, необходимых для образования антиколонизирующего иммунитета, предотвращающего инфекционный процесс на его первой стадии – колонизации, а также протективных антигенов *V. cholerae* эльтор биовара – возбудителя текущей пандемии холеры [7]. В лаборатории патогенных вибрионов РосНИПЧИ «Микроб» сконструировано значительное количество штаммов-продуцентов протективных антигенов O1, O139 и не O1/не O139 серогрупп, в том числе *V. cholerae* KM206 и 2415 O1 серогруппы классического биовара продуценты ХТ I типа, секретирующие соответственно 40,0 и 38,4 мкг/мл данного белка. Данные штаммы образуют также значительное количество ТКПА на поверхности клеток, которые определяются визуально при постановке реакции самоагглютинации [6, 8]. Штамм *V. cholerae* KM137 O139 серогруппы образует в значительном количестве O139 антиген [4], *V. cholerae* KM234 O1 серогруппы эльтор биовара – продуцент ХТ II типа (24,0 мкг/мл). Необходимо отметить, что штаммы эльтор вибрионов, продуцирующие ХТ *in vitro*, существуют только за рубежом. *V. cholerae* KM93 не O1/не O139 серогруппы – продуцент (14,3 мкг/мл) иммуногенной В-субъединицы ХТ [5]. Штаммы депонированы в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб».

При проведении малообъемного культивирования [3] подобрано оптимальное время и среда для максимальной продукции антигенов указанными штаммами-продуцентами, но масштабированное культивирование в ферментере отличается от таковых в малообъемных экспериментах. Для эффективного использования среды выращивания и образования значительного количества бактериальной массы при масштабированном культивировании штаммов-продуцентов необходимо оптимизировать схемы культивирования на основе подбора благоприятных физико-химических условий и компонентов питания, а также изучить популяционный состав штаммов и продукцию протективных антигенов, что и явилось целью данной работы.

### Материалы и методы

Глубинное культивирование штаммов-продуцентов проводили на ферментере «New Brunswick M19» (США) с рабочим объемом 10 л и с автоматическими системами поддержания параметров культивирования. Объем питательной среды составлял 4 л. Исследуемые штаммы выращивали как на питательных средах, широко используемых в лабораторной практике (LB и АК1), так и на питательных средах, используемых при культивировании штаммов-продуцентов при производстве химической холерной

вакцины (Хоттингера и казеиновой). При выращивании штаммов, содержащих мобильные генетические элементы, для создания селективных условий в бульон добавляли или канамицин в концентрации 25 мкг/мл (*V. cholerae* 2415, KM234), или тетрациклин в количестве 2 мкг/мл (*V. cholerae* KM93).

Температура культивирования для штаммов KM137 и KM234 составляла 37 °С, остальные штаммы выращивали при 30 °С. В ходе выращивания контролировали такие параметры, как рН среды, концентрация биомассы (м.к./мл по стандарту мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича), жизнеспособность (КОЕ), продукция антигенов. В зависимости от этих показателей изменяли уровень подаваемого кислорода (газообмен), скорость перемешивания питательной среды и подачу дополнительного источника питания – глюкозы (массообмен). Бульонную культуру обеззараживали добавлением формалина до конечной концентрации 0,6 %. Содержание O1 и O139 антигенов определяли в реакции диффузионной преципитации в агаровом геле (РДП) со специфическими сыворотками. Продукцию ХТ и В-субъединицы измеряли иммуноферментным методом GM<sub>1</sub> ELISA [9], ТКПА – методом иммуноблоттинга со специфической сывороткой [10].

### Результаты и обсуждение

Культивирование штаммов O1 серогруппы классического биовара серовара Огава *V. cholerae* KM206 и Инаба *V. cholerae* 2415 показало, что при выращивании в LB бульоне (рН 6,8) они активно синтезируют все антигены (О-антиген, ХТ и ТКПА). Минимальное время генерации для этих штаммов составило 0,8 ч, что в два раза короче этого же показателя для штаммов классического биовара (569В и М41), используемых при производстве коммерческой химической холерной вакцины – «холероген-анатоксин». Посевная доза для штамма *V. cholerae* KM206 составила 1 млрд м.к./мл, а для *V. cholerae* 2415 – 1,4 млрд м.к./мл. Установлено, что оптимальным значением рН питательной среды являются значения 7,2–7,8, время культивирования – 12 ч, при удлинении времени выращивания начинается лизис клеток.

При культивировании штаммов отмечено две экспоненциальные фазы роста. После 7 ч выращивания заметна фаза подавления роста, однако при добавлении глюкозы (40 %) происходит возрастание рН среды с 6,8 до 7,2–7,6 и наблюдается процесс нарастания количества клеток. Очевидно, происходит адаптация популяции к физико-химическим условиям и переходу на другой субстрат питания (рис. 1). Для штамма KM206 рост биомассы достигает своего максимума к 10 ч от начала культивирования, затем отмечается переход в стационарную фазу. Через 12 ч культивирования концентрация микробных клеток для данного штамма составила 32 млрд м.к./мл, а КОЕ – 14,4 млрд м.к./мл. При вы-

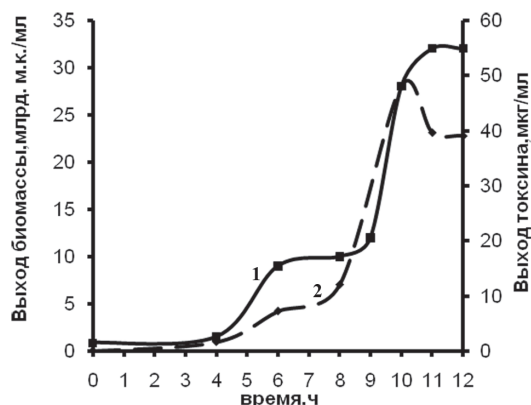


Рис. 1. Глубинное культивирование штамма O1 серогруппы серовара Огава *V. cholerae* KM206 на бульоне LB (рН 6,8):

1 – выход биомассы, млрд м.к./мл; 2 – выход ХТ, мкг/мл

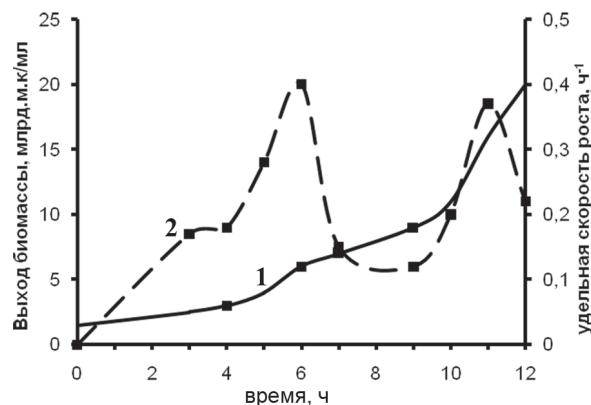


Рис. 2. Глубинное культивирование штамма-продуцента O-антигена O139 серогруппы *V. cholerae* KM137 на бульоне LB (рН 7,5±0,1):

1 – выход биомассы, млрд м.к./мл; 2 – удельная скорость роста, ч⁻¹

рацивании штамма *V. cholerae* 2415 отмечено удлинение лаг-фазы до 9 ч и короткая экспоненциальная фаза роста – 3 ч. Максимальное количество биомассы образовывалось также к 12 ч выращивания и составило 30 млрд м.к./мл, из которых жизнеспособных клеток было 14,1 млрд м.к./мл. Возможно, необходимость применения антибиотиков при культивировании этого штамма приводит к увеличению лаг-фазы и обуславливает потребность в высоких посевных дозах (не менее 1,4 млрд м.к./мл). Однако добавление дополнительных источников углерода в ходе выращивания данных штаммов дает возможность продлевать экспоненциальную фазу роста.

При изучении популяционного состава культур после выращивания в ферментере (проверено по 200 клонов) обнаружено, что штаммы стабильно сохраняют свои свойства. Выявлено незначительное количество клонов – 0,8 % в штамме *V. cholerae* KM206, снизивших продукцию ХТ и ТКПА, и 1 % клонов *V. cholerae* 2415, утративших плазмидный репликон и переставших синтезировать ХТ в среде выращивания, что не повлияло на выход конечного продукта.

Для контроля процесса накопления ХТ в среде выращивания через равные промежутки времени брали пробы бульона и определяли наличие данного антигена. При этом обнаружено, что штаммы *V. cholerae* KM206 и 2415 синтезировали ТКПА и ХТ в среде уже с 4 ч выращивания, а к концу культивирования концентрация токсина в бульоне составила 38,0 и 36,4 мкг/мл соответственно. Титр O1 антигена в РДП составил – 1:32. Способность синтезировать сразу три иммуногена (ХТ, ТКПА, O1 антиген) в большом количестве делает эти штаммы перспективными для использования в производственных условиях.

Глубинное культивирование штамма-продуцента O-антигена O139 серогруппы *V. cholerae* KM137 проводили на бульоне LB при рН 7,5±0,1. Для создания оптимального уровня рН питательной среды использовали фосфатный буфер (0,4 М), который добавляли в начале выращивания для сокращения времени адаптации (лаг-фаза). Оптимальное время выращивания данного штамма составляло 11–12 ч, при этом выход

биомассы составил 20 млрд м.к./мл (рис. 2), а КОЕ – 5,4 млрд м.к./мл. При переходе микробной популяции в экспоненциальную фазу роста осуществлялась дробная подача глюкозы (40 %), что позволило увеличить удельную скорость роста ( $\mu = 0,32–0,4 \text{ ч}^{-1}$ ) и сократить время генерации ( $T = 1,7–1,8 \text{ ч}$ ). При изучении продукции O139 антигена клетками установлено, что титр по данным РДП составил 1:128, что указывает на присутствие значительного количества O-антигена на поверхности клеток.

При оптимизации условий выращивания штамма KM93 для высокого выхода биомассы и продукции в среду выращивания В-субъединицы холерного токсина, установлено, что при культивировании в бульоне LB (рН 7,6) и Хоттингера с 2 % пептона (рН 8,0) выход биомассы был высоким – 15–16 млрд м.к./мл, но продукция ХТ была низкой – 1,5–1,7 мкг/мл. Кроме того, при выращивании в питательной среде с низкой буферной емкостью (LB) отмечен резкий переход в фазу отмирания, при которой в результате лизиса клеток часть продукта под действием ферментов разрушается. В результате проведения экспериментов установлено, что культивирование данного штамма целесообразно проводить на казеиновом бульоне с 1 % пептоном (рН 7,6) отъемно-доливым способом (методом фазовых культур), позволяющим получать большой объем биомассы за короткий промежуток времени. Концентрация микробных клеток в конце выращивания составила 16 млрд м.к. В связи с удлинением экспоненциальной фазы роста после замены 1/2 объема питательной среды удельная скорость образования холерного токсина ( $qr$ ) увеличилась с 0,13 до 0,21. Кроме того, синтез продукта продолжался и после выхода культуры в стационарную фазу роста (рис. 3) и составил 10,3 мкг/мл. Необходимо отметить, что при периодическом культивировании в этом случае начинается частичный лизис клеток и разрушение под действием ферментов содержащего в среде выращивания ХТ. При изучении популяционного состава клеток после выращивания в ферментере (проверено 300 клонов) установлено, что все изоляты стабильно продуцировали В-субъединицу ХТ в

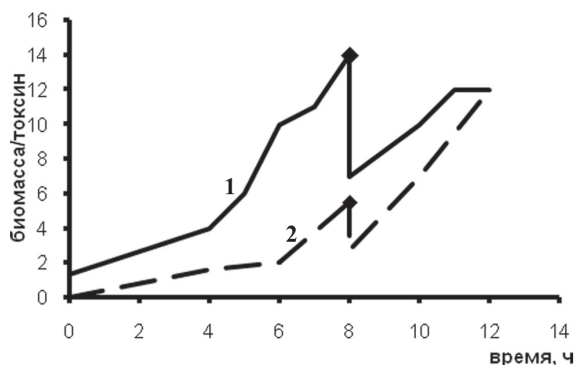


Рис. 3. Глубинное культивирование штамма не O1 / не O139 серогруппы *V. cholerae* KM93 на казеиновом бульоне с 1 % пептоном (рН 7,6) отъемно-доливым способом:

1 – выход биомассы, млрд м.к./мл; 2 – выход ХТ

среду выращивания.

Культивирование штамма-продуцента ХТ II типа *V. cholerae* KM234 проводили на среде АК1 (рН 8,0), являющейся оптимальной для продукции ХТ штаммами эльтор биовара. Скорость роста этого штамма в ферментере была очень низкой, добавление глюкозы привело к переходу к экспоненциальной фазе с двукратным ростом скорости, максимум удельной скорости роста наблюдался через 11 ч от начала выращивания. Выход биомассы и продукта, несмотря на увеличение времени культивирования до 24 ч, в этом случае остался низким (концентрация бактериальных клеток – 8 млрд м.к./мл и количество ХТ – 7,6 мкг/мл). Более продуктивным (10 млрд м.к./мл и 10,4 мкг/мл ХТ) было выращивание в бутылках емкостью 250 мл с использованием термостатированной качалки в течение 20 ч. В этих условиях газообмен и массообмен менее интенсивны, чем в ферментере, что приводит к постепенному и полному потреблению питательных веществ из среды и, соответственно, более продуктивному росту биомассы и синтезу антигена. Популяционный состав штамма после выращивания был однородным, все клоны сохранили способность к синтезу ХТ II типа. Несмотря на полученные положительные результаты, необходимо проведение дальнейшей работы по подбору сред и схемы выращивания данного штамма в производственных условиях.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что для высокой продукции основных протективных антигенов холерного вибриона штаммами-продуцентами при масштабированном культивировании необходимо использовать богатые питательные среды, контролируя рН среды и время культивиро-

вания, а также дополнительные источники углерода (глюкоза).

Таким образом, в процессе проведенной работы определены оптимальные условия масштабированного культивирования в условиях производства пяти штаммов-продуцентов холерного вибриона разных серогрупп и биоваров для активной продукции ими протективных антигенов, что позволит использовать их для изготовления более эффективных вакцинных препаратов, а также для получения в очищенном виде основных протективных антигенов *V. cholerae* с целью создания диагностических препаратов.

Работа поддержана грантом РФФИ ОФИ № 06-04-08122.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Дятлов И.А. и др. Оральная химическая вакцина против холеры. Патент РФ № 2159128. – 2000. – 10 с. – 2. Джапаридзе М.Н., Никитина Г.П., Куликова В.Л. и др. // ЖМЭИ. – 1984. – № 4. – С. 70–74. – 3. Заднова С.П., Волох О.А., Крепостнова И.М. и др. // Пробл. особо опасных инф. – 2007. – Вып. 1 (95). – С. 50–55. – 4. Смирнова Н.И., Чеховская Г.В., Ливанова Л.Ф. и др. // ЖМЭИ. – 2000. – № 3. – С. 47–51. – 5. Смирнова Н.И., Крепостнова И.М., Ливанова Л.Ф. и др. // Мол. генет., микробиол., вирусол. – 2007. – № 4. – С. 7–13. – 6. Топорков А.В., Заднова С.П., Смирнова Н.И., Кутырев В.В. Штамм бактерий *Vibrio cholerae* KM206 классического биовара серовара Огава – продуцент протективных антигенов. Патент РФ № 2222594. – 2004. – 6 с. – 7. Kabir S. // J. Med. Microbiol. – 2005. – Vol.16. – P.101–116. – 8. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Toporkov A.V., Kutyrev V.V. // New Research on Biotechnology and Medicine / Edit. A.M.Egorov, G.E.Zaikov. – New York, 2006. – P. 177–188. – 9. Svennerholm A.M., Holmgren J. // Curr. Microbiol. – 1978. – Vol. 1. – P. 19–23. – 10. Towbin H., Stabelin T., Gordon J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1979. – Vol. 76 – P. 4350–4354.

O.A.Volokh, I.A.Shepelev, S.P.Zadnova, I.M.Krepostnova, S.A.Yeremin

#### A Study of Biokinetic Peculiarities and Optimization of the Conditions for Culturing *Vibrio cholerae* Strains Overproducing Protective Antigens Suitable for Use in the Production

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Described in the work are the major biokinetic criteria of the submerged growth process of *V. cholerae* O1 strains (classical and eltor biovars), O139, non-O1 and non-O139 serogroups, capable of overproducing the main protective antigens (O1 and O139 antigens, type I and II cholera toxin, cholera toxin type II B subunit, toxin-coregulated adhesion pili). The optimal parameters were defined for each strain (nutritional media, pH indices, cultivation time, application of an additional carbohydrate source) facilitating the maximal yield of the protective antigens under the production conditions, thus making it possible to use them as a basis for manufacturing more efficient vaccinal preparations as well as to obtain the main *V. cholerae* protective antigens as purified drugs for constructing diagnostic preparations.

**Key words:** *Vibrio cholerae*, submerged cultivation, protective antigens.

Поступила 24.10.07.

А.А.Горяев, Е.Ю.Щелканова, Ю.В.Лозовский, И.В.Тучков, Н.И.Смирнова

## КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММА *VIBRIO CHOLERAЕ* БИОВАРА ЭЛЬТОР ГИПЕРПРОДУЦЕНТА ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА II ТИПА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ДЛЯ ПРОДУКЦИИ ЭТОГО БЕЛКА

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Показано, что внедрение транспозона Tn5-Mob (Km<sup>R</sup>) в хромосому токсигенного штамма *V. cholerae* МАК757 биовара эльтор обусловило появление инсерционных мутантов с измененным геномом профага СТХф. Реорганизация генома профага выразилась в делеции четырех генов *zot*, *ace*, *cep*, *orfU* при сохранении лишь оперона *ctxAB*, кодирующего синтез холерного токсина II типа. Указанное изменение генома профага СТХф обусловило повышение продукции этого белка у клонов МАК757 chr.:Tn5-Mob (Km<sup>R</sup>) Tox<sup>++</sup> более чем в 2000 раз. Среди инсерционных мутантов Km<sup>R</sup> Tox<sup>++</sup> в качестве штамма-продуцента выбран один клон с наиболее высоким уровнем биосинтеза холерного токсина (42,0–45,0 мкг/мл), получивший обозначение КМ234. Подобраны условия для культивирования штамма КМ234, обеспечивающие наибольшую продукцию холерного токсина. Показано, что сконструированный штамм *V. cholerae* КМ234 биовара эльтор является стабильным и эффективным продуцентом холерного токсина 2-го типа и может быть использован в производстве для получения этого белка, необходимого для приготовления холерных профилактических и диагностических препаратов.

**Ключевые слова:** холерный вибрион, штамм-продуцент холерного токсина, реорганизация генома профага СТХф, транспозон Tn5-Mob.

Реальная возможность завоза холеры эльтор на территорию Российской Федерации из стран Азии и Африки, где сохраняется неблагоприятная эпидемиологическая ситуация, указывает на необходимость создания эффективных диагностических и профилактических препаратов. Один из подходов к решению этой задачи состоит в разработке нового поколения иммунодиагностических тест-систем и химических холерных вакцин, важным компонентом которых является иммуногенная В-субъединица холерного токсина (ХТ) II типа, который продуцируют эпидемически опасные штаммы *Vibrio cholerae* биовара эльтор. В этой связи очевидна необходимость создания эффективных штаммов-продуцентов ХТ, который является не только ключевым фактором патогенности возбудителя холеры, но и основным протективным антигеном. При решении этой задачи наиболее часто используют рекомбинантные плазмиды с клонированным опероном *ctxAB*, кодирующим ХТ, которые вводят в клетки вирулентных штаммов, несущих резидентные хромосомные гены *ctxAB*. За счет повышения копияности структурных генов *ctxAB* в клетках таких штаммов происходит увеличение продукции ими ХТ. Однако при отсутствии селективного давления стабильность наследования рекомбинантных плазмид клетками таких штаммов, как правило, не превышает 60–80 %, что, в свою очередь, ведет к снижению синтеза ХТ. Поэтому для конструирования стабильных бесплазмидных штаммов-продуцентов мы использовали другой подход, основанный на способности различных транспозонов при внедрении в бактериальный геном вызывать вторичные перестройки в участках ДНК, прилежащих к сайту их интеграции, которые в ряде случаев повышают экспрессию соседних генов.

Целью нашей работы явилось создание безплазмидного штамма *V. cholerae* биовара эльтор гиперпродуцента холерного токсина II типа с помощью транспозона Tn5-Mob (Km<sup>R</sup>) и определение оптимальных условий для эффективной экспрессии генов *ctxAB*, кодирующих синтез этого белка.

### Материалы и методы

В работе использовали токсигенные штаммы *V. cholerae* МАК757 биовара эльтор и *V. cholerae* 569В классического биовара, полученные из ГКПБ «Микроб», а также штамм *Escherichia coli* S17-1 (pSUP5011) Km<sup>R</sup> Ap<sup>R</sup> Cm<sup>R</sup>, предоставленный ИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи. Культивирование бактерий проводили в бульоне и агаре LB, а также в казеиновом, АК1 и казеиновом бульонах. Минимальной средой служил глюкозо-солевой агар и глюкозо-солевой раствор [1]. Аминокислоты вносили в концентрациях 20–40 мкг/мл, канамицин – 25 мкг/мл, ампициллин – 100 мкг/мл, хлорамфеникол – 50 мкг/мл.

Определение продукции холерного токсина проводили с помощью радиального пассивного иммунного гемолиза (РПИГ) на плотной среде [3] и иммуноферментного метода GM<sub>1</sub>ELISA [7].

Конъюгационные скрещивания осуществляли на плотной среде [1]. Для внедрения Tn-элемента в бактериальный геном трансконъюганты МАК757 (pSUP5011) Km<sup>R</sup> Am<sup>R</sup> Cm<sup>R</sup> выращивали в жидкой минимальной среде с канамицином при 4 °С, поскольку при таких условиях культивирования селективное преимущество получают бесплазмидные клоны, сохранившие Tn5-Mob (Km<sup>R</sup>) в хромосоме. Изолированные колонии, полученные после посева такой культуры на LB агаре с канамицином, прове-



ряли на устойчивость к канамицину, ампицилину и хлорамфениколу, отбирая для дальнейших исследований  $Km^R$   $Ap^S$   $Cm^S$ -клоны.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили, как описано ранее [2], используя для тестирования 6 генов коровой области профага СТХφ, а также Tn5-Mob следующие специфические олигонуклеотидные праймеры:

- ctxA1 (размер ампликона 564)  
 прямой - 5' CgggCAGATCTAGACCTCTg';  
 обратный - 5' CgATgATCTTggAgCATCCCCAS 3';
- ctxB1 (размер ампликона 354)  
 прямой - 5' ATgATGAAATGAAAATTTgg 3';  
 обратный - 5' TTAATTTgCCATACTAATG 3';
- zot1 (размер ампликона 947)  
 прямой - 5' TCgCTTAAcAgATggCgCgTTTT 3';  
 обратный - 5' AACCCCGTTTCACTTCTACCCA 3';
- ace1 (размер ампликона 289)  
 прямой - 5' TAAggATgTgCTTATgATggACACC 3';  
 обратный - 5' CCgTgATgAATAAAgATACTCATAgg 3';
- orfU1 (размер ампликона 721)  
 прямой - 5' SAAAATgAgCATggCggC 3';  
 обратный - 5' CCCATTgTgCAATCggTgT 3';
- сер-1 (размер ампликона 162)  
 прямой - 5' CAgAACAATgCCCCACCAS 3';  
 обратный - 5' AAgCACgCTTTCACTCgggg 3';
- Tn5 Mob-1 (размер ампликона 405)  
 прямой - 5' AgTAgCgTCCTgAACggAACSTTT 3';  
 обратный - 5' AAgAgAACggAgTgAACCCACCAT 3'.

### Результаты и обсуждение

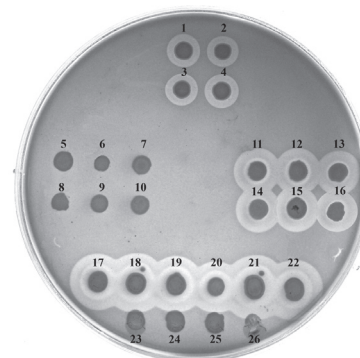
Для проведения транспозонного мутагенеза выбран Tn5-Mob ( $Km^R$ ) на основании его способности, установленной нами ранее [1], с большой частотой внедряться в хромосомную область холерного вибриона вблизи профага СТХφ, несущего структурные гены ctxAB, кодирующие ХТ. В качестве вектора транспозона Tn5-Mob ( $Km^R$ ) использовали конъюгативную плазмиду pSUP5011 ( $Km^R$   $Ap^R$   $Cm^R$ ) [6]. Донором плазмиды служил штамм *E.coli* S17-1 (pSUP5011), реципиентом был вирулентный штамм *V. cholerae* MAK757 биовара эльтор, в геноме которого присутствуют две копии генов ctxAB в составе двух профагов СТХφ. Выбор данного реципиента обусловлен отсутствием у него гемолитической активности, что позволяло использовать для определения продукции ХТ у большого количества трансконъюгантов простой и эффективный метод РПИГ на плотной среде. В условиях *in vitro* этот штамм продуцирует в культуральную среду небольшое количество токсина (0,02 мкг/мл по данным ELISA), которое практически недоступно для определения его в РПИГ (рис. 1, колонии 1–10, 23–26).

Частота конъюгационного переноса плазмиды pSUP5011 из *E.coli* S17-1 в клетки *V. cholerae* MAK757 достигала  $5,5 \cdot 10^{-5}$ . Все проверенные трансконъюганты были  $Km^R$   $Ap^R$   $Cm^R$ . Последующее культивирование 15 произвольно отобранных клонов

МАК757 (pSUP5011)  $Km^R$   $Ap^R$   $Cm^R$  при 4 °С в минимальной среде с добавлением канамицина позволило выделить 263 клон из 2100 проверенных, которые утратили плазмидные маркеры  $Ap^R$   $Cm^R$ , но сохранили устойчивость к канамицину, определяемую транспозоном. Возникновение клонов  $Km^R$   $Ap^S$   $Cm^S$  обусловлено транспозицией Tn-элемента из плазмидного генома в хромосому, частота которой составила 12,5 %.

Полученные клоны проверяли на продукцию ХТ методом РПИГ, полагая, что внедрение Tn5-Mob в хромосому *V. cholerae* в ряде случаев может привести к изменению биосинтеза этого белка. В результате среди изученных  $Km^R$   $Ap^S$   $Cm^S$ -клонов действительно обнаружено 6 клонов MAK757 chr::Tn5-Mob с повышенной продукцией ХТ. Зона иммунного гемолиза вокруг макроколоний таких клонов была около 5,0 мм (рисунок, колонии 17–22), тогда как размер такой зоны вокруг макроколоний высокотоксигенного штамма *V. cholerae* 569В не превышали 2–3 мм (рисунок, колонии 1–4). Явная гиперпродукция ХТ клонами MAK757 chr::Tn5-Mob позволила обозначить их фенотип  $Km^R$   $Tox^{++}$ . По данным иммуноферментного метода GM1 ELISA, выявленные клоны  $Km^R$   $Tox^{++}$  при культивировании их в стандартных лабораторных условиях (казаминовый бульон, pH 7,6, 30 °С) продуцировали 42–45 мкг/мл этого белка (табл. 1). Клон с наибольшей продукцией ХТ был выбран в качестве штамма-продуцента и получил обозначение *V. cholerae* KM234 биовара эльтор.

Повышение более чем в 2000 раз продукции ХТ в клетках ряда клонов, содержащих в геноме транспозон Tn5-Mob, по сравнению с исходным штаммом, указывает на значительное увеличение экспрессии их структурных генов ctxAB. Одним из возможных объяснений изменения продукции ХТ могла быть реорганизация профага СТХφ, индуцированная транспозоном Tn5-Mob. Для подтверждения этого предпо-



Продукция холерного токсина штаммами *V. cholerae* MAK757 chr::Tn5-Mob  $Km^R$ ,  $Tox^{++}$  биовара эльтор, определенная с помощью реакции пассивного иммунного гемолиза:

- 1–4 и 11–16 – высокотоксигенные штаммы *V. cholerae* 569В и Дакка 35 классического биовара, взятые в качестве положительного контроля;
- 5–10, 23–26 – *V. cholerae* MAK757 (исходный);
- 17–19 и 20–22 – независимо полученные инсерционные мутанты *V. cholerae* MAK757 chr::Tn5-Mob  $Km^R$  с повышенной продукцией ХТ

Результаты изучения структуры генома профага СТХφ исходного штамма *V.cholerae* МАК757 биовара эльтор и его инсерционных мутантов с помощью ПЦР

Штамм	Продукция токсина по методу		Tn5-Mob	Тестируемые гены профага СТХφ					
	РПИГ*, мм	ELISA**, мкг/мл		cep	orfU	ace	zot	ctxA	ctxB
МАК757	0	0,02	-	+	+	+	+	+	+
МАК757 (pSUP5011) Km <sup>R</sup> Ap <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup>	0	0,02	+	+	+	+	+	+	+
МАК757 chr::Tn5-Mob Tox <sup>++</sup> Km <sup>R</sup> – транспозант 1-й	5	42,2	+	-	-	-	-	+	+
МАК757 chr::Tn5-Mob Tox <sup>++</sup> Km <sup>R</sup> – транспозант 2-й	5	43,7	+	-	-	-	-	+	+
МАК757 chr::Tn5-Mob Tox <sup>++</sup> Km <sup>R</sup> – транспозант 3-й (KM234)	5	45,0	+	-	-	-	-	+	+
569В	2	9,0	-	+	+	+	+	+	+

\*Размер зоны иммунного гемолиза вокруг макроколоний. \*\*Штаммы выращивали в казеиновом бульоне при 30 °С

ложения мы провели ПЦР-анализ трансконъюгантов МАК757 chr::Tn5-Mob (Km<sup>R</sup>) Tox<sup>++</sup> с целью выявления в их геноме фаговых генов *ctxA*, *ctxB*, *zot*, *ace*, *orfU*, *cep*. Оказалось, что геном их профага СТХφ действительно претерпел значительные изменения, выразившиеся в сохранении генов *ctxA* и *ctxB*, кодирующих ХТ, и потере четырех тестируемых генов, *zot*, *ace*, *orfU*, *cep*. Повышение продукции холерного токсина у таких инсерционных мутантов, содержащих в хромосоме дефектный или неполный профаг, указывает на еще не описанный механизм регуляции экспрессии генов *ctxAB*, который требует дальнейшего изучения. Такая реорганизация генома профага СТХφ, связанная с делецией указанных генов, вызвана Tn5-Mob, который, видимо, локализован в хромосомной области вблизи СТХφ, поскольку спонтанные мутанты такого типа неизвестны. Тем не менее, независимо от результатов дальнейших исследований в этом направлении, мы получили бесплазмидный

штамм *V. cholerae* биовара эльтор с высоким уровнем продукции ХТ II типа (42,0–45,0 мкг/мл), превышающий таковой у исходного штамма (0,02 мкг/мл) более чем в 2000 раз.

Для определения оптимальных условий, при которых происходит наибольшая продукция ХТ, сконструированный штамм KM234 выращивали на разных питательных средах (АКИ-бульон, LB-бульон, казеиновый) при различных температурах (30 и 37 °С). Выбор названных сред и температурных режимов определялся рядом причин. Во-первых, среда АКИ (1,5 % бакто-пептона, 0,4 % дрожжевого экстракта фирмы «Дифко», 0,5 % NaCl, 0,3 % NaHCO<sub>2</sub>) является специально подобранной средой для получения холерного токсина 2-го типа, продуцируемого природными штаммами *V. cholerae* биовара эльтор [5]. Выращивание холерных эльтор вибрионов на этой среде (рН 7,8–8,0) при 37 °С в течение 20 ч обеспечивает эффективный синтез регуляторного белка ToxT, необходимого для выраженной экспрессии структурных генов *ctxAB* [4]. Во-вторых, LB и казеиновый бульон относятся к питательным средам, широко используемым как в лабораторных, так и в производственных условиях при получении ХТ. Полученные данные представлены в табл. 2. В результате проведенных исследований установлено, что эффективный биосинтез ХТ (43,2 мкг/мл по данным GM1 ELISA) наблюдался при выращивании клеток штамма KM234 на казеиновом бульоне при 30 °С. На среде АКИ продукция токсина была также высока, однако она составляла лишь 19,0 мкг/мл. Причина выявленных различий в продукции ХТ штаммом KM234 на среде АКИ (19,0 мкг/мл) и казеиновом бульоне (43,2 мкг/мл) пока неясна. По-видимому, полученный штамм KM234 приобрел способность к ToxT-независимой экспрессии генов *ctxAB* за счет действия нового механизма контроля биосинтеза ХТ, который предстоит изучить.

При выяснении оптимальных условий для биосинтеза ХТ сконструированным штаммом одним из важных является вопрос о стабильности наследования хромосомной мутации, определившей его фенотип Tox<sup>++</sup>. В этой связи у 600 произвольно ото-

Таблица 2

Продукция холерного токсина сконструированным штаммом-продуцентом *V. cholerae* KM234 биовара эльтор при культивировании его на различных средах

Штамм	Используемый бульон	Температура культивирования, °С	Продукция ХТ по данным GM1 ELISA, мкг/мл
569В* классического биовара	Казеиновый (рН 7,6)	30	6,0±0,55
	Казеиновый (рН 7,6)	37	0
KM234 биовара эльтор	LB (рН 6,8)	30	6,5±1,2
	LB (рН 6,8)	37	13,5±1,0
	АКИ (рН 8,0)	37	19,0±3,5
	Казеиновый с 1 % пептона (рН 7,6)	30	9,0±2,7
	Казеиновый с 1 % пептона (рН 7,6)	37	0,7±0,3
	Казеиновый (рН 7,6)	30	43,2±3,0
	Казеиновый (рН 7,6)	37	1,0±0,25

\* Штамм взят в качестве контроля.

бранных клонов, полученных при расщеплении бульонной культуры (казеиновый бульон, pH 7,6, 30 °C) KM234 на плотной среде без канамицина, проверяли продукцию ХТ с помощью РПИГ. Оказалось, что лишь 5 клонов (или 0,8 %) утратили фенотип Tox<sup>++</sup>. Из этого следует, что выявленные условия культивирования штамма 234 (казеиновый бульон, pH 7,6, 30 °C) действительно являются оптимальными для стабильной и эффективной продукции его клетками ХТ.

Таким образом, с помощью транспозона Tn5-Mob (Km<sup>R</sup>) сконструирован бесплазмидный штамм *Vibrio cholerae* KM234 биовара эльтор, имеющий высокий и стабильный уровень биосинтеза холерного токсина II типа. Выявление оптимальных условий для продукции ХТ в лабораторных условиях позволяет рекомендовать использование штамма KM234 в производстве для получения и выделения очищенного холерного токсина II типа, который применяется для приготовления холерных иммунодиагностических препаратов. Кроме того, сконструированный штамм может быть использован при проведении генетических исследований с целью изучения нового механизма регуляции экспрессии генов вирулентности и иммуногенности холерных вибрионов.

Работа поддержана грантами РФФИ № 06-04-48310 и РФФИ ОФИ № 06-04-08122.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Журавлева Е.А., Смирнова Н.И. // Мол. генет. – 1991. – № 5. – С. 15–19. – 2. Осин А.В., Нефедов К.С.,

Ерошенко Г.А., Смирнова Н.И. // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 1. – С. 1–10. – 3. Шагинян Б.М., Маракуша Б.И. // Журн. микробиол. – 1983. – № 7. – С. 92–96. – 4. DiRita V.J., Neely M., Taylor R.K., Bruss P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1996. – Vol. 93. – P. 7991–7995. – 5. Iwanaga M., Yamamoto K., Higa N., Ichinose Y. *et al.* // Microbiol. Immunol. – 1986. – Vol. 30 (11). – P. 1075–1083. – 6. Simon R. // Mol. Gen. Genet. – 1984. – Vol. 196. – P. 413–420. – 7. Svennerholm A.-M., Wiklund G. // J. Clin. Microbiol. – 1983. – Vol. 17. – P. 262–270.

A.A.Goryaev, E.Yu.Shelkanova, Yu.V.Loizovsky, I.V.Touchkov,  
N.I.Smirnova

**Construction of an El Tor Biovariant *Vibrio cholerae* Strain Capable of Type II Cholera Toxin Hyperproduction and Determining the Optimal Conditions for the Production of This Protein**

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

Introduction of Tn5-Mob (Km<sup>R</sup>) transposon into the chromosome of the toxigenic *V. cholerae* strain MAK757 El Tor biovar was shown to result in the emergence of insertion mutants containing an altered genome of CTX $\phi$  prophage. The reorganization of the latter was expressed in the deletion of four genes, *zot*, *ace*, *cep*, *orfU*, however, its *ctxAB* operon coding for the synthesis of type II cholera toxin being still retained. This change in the CTX $\phi$  prophage has led to as high as 200 fold greater levels of production of this protein by MAK757 clones chr::Tn5-Mob (Km<sup>R</sup>) Tox<sup>++</sup>. A single clone with the highest cholera toxin biosynthesis levels (42.0–45.0  $\mu$ g/ml) was selected among the insertion mutants Km<sup>R</sup> Tox<sup>++</sup> and designated as KM234. The optimal conditions for culturing the KM234 construct were fitted to provide for the highest cholera toxin elaboration by the cells. The El Tor biovar *V. cholerae* strain KM234 thus constructed was shown to be a stable and efficient type II cholera toxin overproducing strain promising to be applied in the industrial production of this protein routinely used to manufacture the preparations for cholera diagnosis and prophylaxis.

*Key words:* the cholera agent, a cholera toxin hyperproducing strain, prophage CTX $\phi$  genome reorganization, Tn5-Mob transposon.

Поступила 10.12.07.

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 616.981.48(471.44)

Л.И.Наркайтис<sup>1</sup>, А.Н.Данилов<sup>2</sup>, Ю.И.Ящечкин<sup>3</sup>, Е.В.Куклев<sup>3</sup>, О.И.Кожанова<sup>2</sup>, М.Е.Минаева<sup>4</sup>,  
Ю.Ю.Елисеев<sup>1</sup>

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ НАСЕЛЕНИЯ САРАТОВА  
КИШЕЧНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ С ВОДНЫМ ПУТЕМ ПЕРЕДАЧИ**

<sup>1</sup>Саратовский государственный медицинский университет, <sup>2</sup>Управление Роспотребнадзора по Саратовской области, <sup>3</sup>ФГУЗ «Российский НИПЧИ «Микроб», <sup>4</sup>ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в Саратовской области, Саратов

Разработана методика прогнозирования заболеваемости кишечными инфекциями, связанными с водным фактором, в Саратове, основанная на аналитических методах оценки санитарно-гигиенических показателей качества воды централизованного водоснабжения.

*Ключевые слова:* база данных, прогнозирование заболеваемости, статистическая модель, системный подход.

Контроль за качеством питьевой воды в Саратовской области уделяется пристальное внимание, тем не менее, заболеваемость острыми кишечными инфекциями (ОКИ) держится на достаточно высоком уровне. Так, в 2006 г. заболеваемость ОКИ установленной и не установленной этиологии возросла по сравнению с 2005 г. на 20,0 % (с 9366 до

11240 случаев) и превысила аналогичный показатель по области за последние 6 лет [4].

Учитывая вышеизложенное, проведен сбор данных о состоянии хозяйственно-питьевого водоснабжения по санитарно-бактериологическим (8), санитарно-химическим (9) и органолептическим (4) показателям качества воды в 665 точках пяти райо-

нов Саратова за период 2004–2006 гг. В каждой точке учитывали следующие показатели: ОМЧ, ОКБ, ТКБ, споры, сульфитредуцирующие клостридии, колифаги, энтеровирусы, патогенные бактерии, запах, цветность, привкус, мутность, рН, аммиак (по азоту), нитриты, нитраты, окисляемость, хлориды, железо, остаточный хлор, свободный хлор, регламентированные действующими нормативными документами.

Для анализа вышеперечисленных показателей разработана база данных (БД), являющаяся составной частью БД предвестников осложнения эпидемиологической ситуации при кишечных инфекциях с водным путем передачи. Использованный формат – Access 2000, который интегрирован в MS Office, поддерживается объектно-ориентированным языком программирования Visual Basic 6.0 (и выше), запросы к таблицам базы данных реализуются напрямую из программы Statistica 6.0 и ARC GIS 9.

Прогнозирование заболеваемости ОКИ с водным путем передачи инфекции проведено по непараметрическим и параметрическим показателям качества воды в отдельных точках централизованного водоснабжения Саратова.

Результаты прогнозирования по непараметрическим показателям с использованием различных дискриминантных, в т.ч. регрессионных моделей, свидетельствуют о невозможности использования этих показателей в качестве предвестников роста (или снижения) заболеваемости ОКИ с водным путем передачи. В то же время полученные корреляции, хотя и имеют низкие значения, обладают высокой степенью достоверности, т.е. связь этих показателей с заболеваемостью имеется, но непараметрические данные не позволяют в достаточной степени эту связь выявлять.

Для параметрического преобразования исходных параметров использован следующий подход. Путем запроса к разработанной базе данных по каждому показателю для каждого района определено количество точек водозабора, в которых его значения превышали норму. Далее полученные значения были пронормированы на 100 точек, т.к. в каждом районе Саратова разное их количество.

Сопоставление коэффициентов корреляции полученных показателей с заболеваемостью выявило слабую их взаимосвязь, что связано с недостаточным количеством анализируемых данных, а также разнонаправленное влияние показателей на заболеваемость.

При использовании факторного анализа [2, 3] получены аналогичные результаты: выявлено две группы показателей (таблица), среди которых выделяется показатель ОМЧ, как наиболее связанный с уровнем заболеваемости. Результаты проведенного регрессионного анализа следует оценить как положительные, о чем свидетельствует относительно небольшое различие между расчетными и фактическими значениями.

Использование данной методики позволило провести районирование Саратова по степени опасности

**Результаты факторного анализа санитарно-гигиенических показателей и заболеваемости кишечными инфекциями**

Показатели	Группа 1	Группа 2
Окисляемость	-0,896541	-0,221186
ОМЧ	-0,363741	<b>0,752039</b>
Цветность	-0,675412	0,329497
Мутность	-0,893365	-0,183430
Железо	0,035542	0,647405
Дизентерия	0,439716	<b>0,807801</b>
ОКИ	0,367028	<b>0,792339</b>

возникновения ОКИ и определить наиболее критичные районы. В порядке уменьшения опасности районы распределяются следующим образом: Заводской, Ленинский, Кировский, Волжский, Октябрьский, Фрунзенский.

Таким образом, разработанная методика прогнозирования заболеваемости кишечными инфекциями в Саратове с водным путем передачи на основе аналитической оценки таких показателей качества воды, как ОМЧ, окисляемость, цветность, мутность, содержание железа, выделенных в качестве предвестников осложнения эпидемиологической ситуации [5, 6, 7], включает в себя два этапа: первый – прогноз заболеваемости комплексом альтернативных методов, второй – обобщенная оценка с использованием полученных результатов. Такой подход аналогичен «информационному консилиуму» [1], применение которого существенно повышает качество оценок и прогнозов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Генкин А.А. Новая информационная технология анализа медицинских данных. – СПб: Политехника, 1999. – 191 с. – 2. Куклев Е.В., Дობло А.Д., Попов Н.В. и др. Современные эпидемиологические особенности ГЛПС в Саратовской области и ее профилактика // Пробл. особо опасных инф. – Саратов, 1999. – С. 44–49. – 3. Ларичев О.И. Теория и методы принятия решений. – М.: Логос, 2002. – С. 115–129. – 4. О санитарно-эпидемиологической обстановке в Саратовской области в 2006 году. Государственный доклад. – Саратов, 2007. – 274 с. – 5. Топорков В.П., Подсвилов А.В., Яшкуллов К.Б. Эколого-эпидемиологический мониторинг за предикторами экстремальных эпидемических ситуаций в природно-очаговом по чуме регионе Северо-Западного Прикаспия. – Элиста, 1999. – 125 с. – 6. Черкасский Б.Л. Эпидемиологический диагноз. – Л.: Медицина, 1990. – 208 с. – 7. Черкасский Б.Л. Руководство по общей эпидемиологии. – М.: Медицина, 2001. – 558 с.

L.I.Narkaitis, A.N.Danilov, Yu.I.Yashechkin, E.V.Kouklev, O.I.Kozhanova, M.E.Minaeva, Yu.Yu.Yeliseev

#### **Forecasting of Morbidity of the Enteric Infections with Water-Borne Transmission for the Population of Saratov**

*Saratov State Medical University, Territorial Agency of Rospotrebnadzor for Saratov Region, Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Center of Hygiene and Epidemiology in Saratov Region, Saratov*

The system for forecasting of the incidence of the enteric infections with water-borne transmission for Saratov city was created. It is based on analytical methods of estimation of sanitary indicators of water quality in the central water supply.

*Key words:* enteric infections, water quality, sanitary indicators.

Поступила 11.01.08.

## К 65-ЛЕТИЮ ЮРИЯ МИХАЙЛОВИЧА ФЕДОРОВА



Юрию Михайловичу Федорову, заместителю начальника Управления эпидемиологического надзора, санитарной охраны, надзора на транспорте Роспотребнадзора, доктору медицинских наук, исполнилось 65 лет.

Юрий Михайлович внес существенный вклад в совершенствование санитарно-эпидемиологической службы страны, организацию и проведение эпидемиологического надзора за особо опасными инфекционными болезнями, санитарную охрану территории Российской Федерации, неоднократно участвовал в ликвидации эпидемий и эпидемических вспышек различных инфекционных болезней в условиях чрезвычайных ситуаций и социальных катастроф.

Федорова Ю.М. отличает высокий профессио-

нализм, незаурядные организаторские способности, принципиальность в решении государственных вопросов. Особенно его организаторский потенциал проявился в курации противочумных учреждений.

Федоров Ю.М. – автор более 40 научных публикаций по различным вопросам профилактики и борьбы с инфекционными болезнями. При его участии разработано 60 нормативных документов федерального уровня, обеспечивающих проведение эффективных мероприятий по санитарной охране территории России. Он принимал непосредственное участие в подготовке материалов к саммиту «Группы восьми» в Санкт Петербурге (2006 г.) по вопросу борьбы с инфекционными болезнями.

Коллектив Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб», редакционная коллегия журнала «Проблемы особо опасных инфекций» поздравляют Юрия Михайловича с юбилеем и желают крепкого здоровья, семейного благополучия, новых надежд и свершений.

## К 75-ЛЕТИЮ ЛЮБОВИ ВЛАДИМИРОВНЫ САМОЙЛОВОЙ



Доктору медицинских наук, профессору, Заслуженному деятелю науки, главному научному сотруднику РосНИПЧИ «Микроб» Л.В.Самойловой исполнилось 75 лет. Вся яркая и многогранная деятельность Любови Владимировны связана с институтом «Микроб» и противочумной системой, в

которой она служит с 1958 г.

Творческая инициатива, широкая эрудиция, завидное трудолюбие Л.В.Самойловой направлены на решение актуальных вопросов профилактики особо опасных инфекций. Любовью Владимировной организована первая в противочумной системе лаборатория аэрозолей, которую она возглавляла с 1972 по 1996 год. В лаборатории формировались научные направления по моделированию легочных форм особо опасных инфекций, обосновывались и разрабатывались схемы иммунопрофилактики, общей экстренной профилактики и лечения этих наиболее клинически тяжелых и эпидемически опасных форм заболева-

ний. Результаты большинства экспериментальных исследований, выполненных под руководством и при непосредственном участии Любови Владимировны, нашли практическое воплощение и явились гарантом эпидблагополучия организованных контингентов и населения в зонах риска.

Под руководством Л.В.Самойловой разработаны методы лабораторной диагностики и лечения чумы, обеспечение безопасности при работе с аэрозолями патогенных микроорганизмов, средства индивидуальной защиты, которые используются в учреждениях Госсанэпиднадзора страны.

Профессор Самойлова воспитала целую плеяду высококвалифицированных специалистов, которые в настоящее время решают важные научно-практические задачи в области диагностики, лечения, эпидемиологии и профилактики инфекционных заболеваний на региональном и государственном уровне.

Редакционная коллегия и редакционный совет журнала «Проблемы особо опасных инфекций» поздравляют Любовь Владимировну с юбилеем и желают доброго здоровья, долгих лет жизни, дальнейших творческих успехов.

ПАМЯТИ ЕВГЕНИЯ ПАВЛОВИЧА ГОЛУБИНСКОГО  
(1934–2008)



11 февраля 2008 г. на 75-м году жизни скоропостижно скончался директор Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока, заслуженный деятель науки, доктор медицинских наук, профессор Евгений Павлович Голубинский.

Почти полвека своей жизни Евгений Павлович посвятил работе в противочумной системе нашей страны, тридцать лет он возглавлял институт, обеспечивающий санитарно-эпидемиологическое благополучие в обширном регионе Сибири и Дальнего Востока.

Е.П.Голубинский внес весомый вклад в изучение различных аспектов особо опасных инфекционных болезней. Его исследования в области экологии чумного микроба и механизмов эпизоотического процесса позволили научно обосновать меры профилактики и повысить эффективность обследования природных очагов чумы в Сибири.

Под руководством Евгения Павловича впервые в нашей стране разработан иммуноферментный метод диагностики чумы, бруцеллеза, туляремии и сибирской язвы, позволивший на качественно но-

вом уровне проводить лабораторную диагностику и серологическую разведку в очагах. Разработаны способы производственного выращивания чумного и холерного микробов, методы дифференциации возбудителей чумы и псевдотуберкулеза, холерного и НАГ-вибрионов, вирулентных и авирулентных штаммов чумного микроба, сконструированы среды для культивирования возбудителей чумы, сибирской язвы, бруцеллеза и псевдотуберкулеза.

Научная и общественная деятельность Евгения Павловича была многогранной. Е.П.Голубинский – автор 5 монографий, свыше 300 научных трудов, авторских свидетельств и патентов на изобретения.

За многолетнюю и плодотворную работу он награжден орденом Дружбы народов, знаками «Отличник здравоохранения», «Отличник здравоохранения МНР», внесен в Книгу почета Центра изучения природно-очаговых инфекций Монголии, отмечен почетными грамотами, благодарностями, ценными подарками Совета Министров СССР, Министерства здравоохранения, Госкомитета санэпиднадзора России и администрации Иркутской области.

Светлая память об Евгении Павловиче – крупном ученом, талантливом руководителе, добром и отзывчивом человеке навсегда сохранится в сердцах тех, кому довелось работать с ним и просто знать его.