

# ПРОБЛЕМЫ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Научно-практический журнал  
Выходит четыре раза в год  
Основан в 1968 году

Главный редактор академик РАН,  
доктор медицинских наук, профессор **В.В.Кутырев**

*Журнал входит в перечень ВАК ведущих рецензируемых научных журналов и изданий,  
в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций  
на соискание ученой степени доктора и кандидата наук*

**Выпуск 3**

**2014**

**САРАТОВ**

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

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

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

В.А.Антонов, докт. мед. наук, профессор (Волгоград)  
В.Е.Безсмертный, канд. мед. наук (Москва)  
С.В.Балахонов, докт. мед. наук, профессор (Иркутск)  
В.П.Бондарев, докт. мед. наук, профессор (Москва)  
С.В.Борисевич, докт. биол. наук, профессор (Сергиев Посад)  
А.Л.Гинцбург, докт. мед. наук, академик РАН (Москва)  
И.А.Дятлов, докт. мед. наук, член-корр. РАН (Оболensk)  
А.Н.Куличенко, докт. мед. наук, профессор (Ставрополь)  
В.В.Кутырев, докт. мед. наук, академик РАН (Саратов)  
Д.К.Львов, докт. мед. наук, академик РАН (Москва)  
В.В.Малеев, докт. мед. наук, академик РАН (Москва)  
В.Л.Мотин, профессор (Галвестон, США)  
Г.Г.Онищенко, докт. мед. наук, академик РАН (Москва)  
А.В.Ракин, канд. биол. наук (Мюнхен, Германия)  
В.П.Сергиев, докт. мед. наук, академик РАН (Москва)  
М.Скурник, профессор (Хельсинки, Финляндия)

*Журнал включен в Реферативный журнал и Базы данных ВИНТИ, индексируется в Российском Индексе Научного Цитирования (РИНЦ) и размещен в Электронной научной библиотеке. Сведения о журнале ежегодно публикуются в международной справочной системе по периодическим и продолжающимся изданиям «Ulrich's Periodicals Directory».*

© Федеральное казенное учреждение здравоохранения  
Российский научно-исследовательский противочумный  
институт «Микроб», 2014

ISSN 0370-1069



9 770370 106008 >

2014, Issue 3

## Problems of Particularly Dangerous Infections

Scientific and Practical Journal  
Issued quarterly. Founded in 1968

Problems of Particularly Dangerous Infections is published  
by Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe"

### Editor-in-Chief

*Kutyrev V.V.*, Member of the RAS,  
Doctor of Medical Science, Professor

### Editorial Board

*Bugorkova S.A.*, Doctor of Medical Science  
*Devdariani Z.L.*, Doctor of Medical Science, Professor  
*Eroshenko G.A.*, Doctor of Biological Science  
*Karavaeva T.B.* (executive secretary), Candidate of Medical Science  
*Kouklev E.V.*, Doctor of Medical Science, Professor  
*Mikshis N.I.*, Doctor of Medical Science  
*Lyapin M.N.*, Candidate of Medical Science  
*Osin A.V.*, Candidate of Biological Science  
*Popov N.V.*, Doctor of Biological Science, Professor  
*Popov Yu. A.*, Doctor of Biological Science, Professor  
*Sayapina L.V.*, Doctor of Medical Science  
*Smirnova N.I.*, Doctor of Biological Science, Professor  
*Toporkov A.V.*, Doctor of Medical Science  
*Toporkov V.P.*, Doctor of Medical Science, Professor  
*Shcherbakova S.A.*, Doctor of Biological Science  
*Shchukovskaya T.N.*, Doctor of Medical Science, Professor

### Editorial Council

*Antonov V.A.*, Doctor of Medical Science, Professor (Volgograd)  
*Bezsmertny V.E.*, Candidate of Medical Science (Moscow)  
*Balakhonov S.V.*, Doctor of Medical Science, Professor (Irkutsk)  
*Bondarev V.P.*, Doctor of Medical Science, Professor (Moscow)  
*Borisevich S.V.*, Doctor of Biological Science, Professor (Sergiev Possad)  
*Ginitsburg A.L.*, Doctor of Medical Science, Member of the RAS (Moscow)  
*Dyatlov I.A.*, Doctor of Medical Science, Corresponding Member  
of the RAS (Obolensk)  
*Kulichenko A.N.*, Doctor of Medical Science, Professor (Stavropol)  
*Kutyrev V.V.*, Doctor of Medical Science, Member of the RAS (Saratov)  
*L'vov D.K.*, Doctor of Medical Science, Member of the RAS (Moscow)  
*Maleev V.V.*, Doctor of Medical Science, Member of the RAS (Moscow)  
*Motin V.L.*, Ph. D., Professor (Galveston, USA)  
*Onishchenko G.G.*, Doctor of Medical Science, Member of the RAS (Moscow)  
*Rakin A.V.*, Ph. D. (Munich, Germany)  
*Sergiev V.P.*, Doctor of Medical Science, Member of the RAS (Moscow)  
*Skurnik M.*, Professor (Helsinki, Finland)

### Editorial Office Address:

46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation  
Tel +7(845-2) 51-82-22. Fax +7(845-2) 51-52-12  
E-mail: jour@microbe.ru  
http://journal.microbe.ru

Подписной индекс в каталогах «Почта России» – 24687, «Пресса России» – 29448

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

Адрес редакции: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: jour@microbe.ru. Сайт: http://journal.microbe.ru  
Зав. редакцией Л.С.Пронина. Тел. (845-2) 51-82-22. Факс (845-2) 51-52-12

Пробл. особо опасных инф. 2014. Вып. 3. 1–104

Редакторы Е.С.Герасимова, Т.А.Поршакова. Технический редактор Т.К.Меркулова. Перевод на английский Т.Б.Караваевой, А.П.Рыжовой

Подписано в печать 12.08.14. Формат 60×88 1/8. Бумага мелованная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 12,8. Гарнитура Таймс. Заказ 867  
Журнал отпечатан в типографии ООО «ИППОЛиТ-XXI век». 410012, Саратов, Б. Казачья, 79/85

## СОДЕРЖАНИЕ

## CONTENTS

Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Одинок Г.Н., Сафронов В.А. Синтетическая биология: риски и перспективы ..... 5

### Эпидемиология, биобезопасность

Андаев Е.И., Чеснокова М.В., Борисова Т.И., Вершинин Е.А., Татарников С.А., Бренева Н.В., Мазепа А.В., Адельшин Р.В., Худченко С.Э., Сидорова Е.А., Мельникова О.В., Трушина Ю.Н., Климов В.Т., Дарижапов Б.Б., Тин Т.К., Легейда Н.И., Им Ен Ок Е.А. Оценка эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по природно-очаговым инфекциям в Александровск-Сахалинском районе Сахалинской области ..... 11

Василенко Н.Ф., Ермаков А.В., Малецкая О.В., Куличенко А.Н. Эпидемиологическая обстановка по трансмиссивным природно-очаговым инфекциям в регионе Кавказских Минеральных Вод..... 16

Гражданов А.К., Аязбаев Т.З., Топорков А.В., Бидашко Ф.Г., Захаров А.В., Белоножжина Л.Б., Пак М.В., Андриушченко А.В. О выявлении новых природных очагов актуальных инфекционных болезней на западе Казахстана..... 20

Костюкова Т.А., Смоленский В.Ю., Ляпин М.Н. Разработка инструктивно-методической базы учреждения как элемента обеспечения биобезопасности работ с патогенными биологическими агентами ..... 25

Левченко Б.И., Дегтярева Л.В., Зайцев А.А., Григорьев М.П., Остапович В.В. Роль отдельных видов мелких млекопитающих в поддержании природной очаговости на территории лесостепной части природного очага туляремии Ставропольского края ..... 30

Маркин А.М., Гришина М.А., Кочубеева Е.Н. Эпидемиология бластомикоза и паракокцидиоидомикоза..... 34

Сазанова Е.В., Малюкова Т.А., Попов Ю.А. Учебные штаммы *Yersinia pestis*: критерии подбора, принципы применения..... 38

Слудский А.А. Список позвоночных животных мировой фауны – носителей возбудителя чумы ..... 42

### Микробиология

Мишанькин Б.Н., Дуванова О.В., Романова Л.В., Шипко Е.С., Водопьянов А.С. Мембранный белок *OmpT* холерного вибриона как возможный представитель омптин-семейства *Vibrionaceae* ..... 52

Никифоров К.А., Анисимова Л.В., Одинок Г.Н., Фадеева А.В., Новичкова Л.А., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Конструирование комплекта праймеров для детекции генов антибиотикоустойчивости у возбудителей опасных бактериальных инфекций на примере штаммов *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* ..... 57

Сенина Т.В., Шубникова Е.В. Мелиоидоз: основные этапы научных исследований ..... 61

Червякова Н.С., Валова Т.В., Осин А.В. Использование лиофильных аппаратов камерного типа в коллекциях патогенных микроорганизмов ..... 65

Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., Odinokov G.N., Safronov V.A. Synthetic Biology: Risks and Prospects

### Epidemiology, biosafety

Andaev E.I., Chesnokova M.V., Borisova T.I., Vershinin E.A., Tatarnikov S.A., Breneva N.V., Mazepa A.V., Adel'shin R.V., Khudchenko S.E., Sidorova E.A., Mel'nikova O.V., Trushina Yu.N., Klimov V.T., Darizhapov B.B., Tin T.K., Legeida N.I., Im En Ok E.A. Assessment of Epizootiological-Epidemiological Situation on Natural Focal Infections in Aleksandrovsk-Sakhalin Territory of the Sakhalin Region

Vasilenko N.F., Ermakov A.V., Maletskaya O.V., Kulichenko A.N. Epidemiological Situation on Vector-Borne Natural-Focal Infections in the Territory of Caucasian Mineral Waters

Grazhdanov A.K., Ayazbaev T.Z., Toporkov A.V., Bidashko F.G., Zakharov A.V., Belonozhkina L.B., Pak M.V., Andryushchenko A.V. Concerning the Allocation of Emerging Natural Foci of the Currently Important Infectious Diseases in the West of Kazakhstan

Kostyukova T.A., Smolensky V.Yu., Lyapin M.N. Development of Instruction and Methodical Data Basis of the Institution as an Element of Biosafety Provision as Regards Works with Pathogenic Biological Agents

Levchenko B.I., Degtyareva L.V., Zaitsev A.A., Grigor'ev M.P., Ostapovich V.V. The Role of Certain Species of Small Mammals in the Persistence of Natural Focality in the Territory of Forest-Steppe Zone of the Natural Tularemia Focus of the Stavropol Region

Markin A.M., Grishina M.A., Kochubeeva E.N. Epidemiology of Blastomycosis and Paracoccidioidomycosis

Sazanova E.V., Malyukova T.A., Popov Yu.A. Dummy *Yersinia pestis* Strains: Selection Criteria, Usage Guidelines

Sludsky A.A. List of World Fauna Vertebrate Animals – Carriers of Plague Agent

### Microbiology

Mishan'kin B.N., Duvanova O.V., Romanova L.V., Shipko E.S., Vodop'yanov A.S. Cholera Vibrio Membrane Protein *OmpT* as an OmpTn Belonging to *Vibrionaceae* Family

Nikiforov K.A., Anisimova L.V., Odinokov G.N., Fadeeva A.V., Novichkova L.A., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Development of a Set of Primers for Drug-Resistance Genes Detection in the Agents of Dangerous Bacterial Infections as Exemplified by *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* Strains

Senina T.V., Shubnikova E.V. Melioidosis: Milestones of the Scientific Studies

Chervyakova N.S., Valova T.V., Osin A.V. Application of Freeze-Dryers of Chamber Type in the Collections of Pathogenic Microorganisms

**Диагностика**

- Носкова О.А., Загоскина Т.Ю., Субычева Е.Н., Марков Е.Ю., Попова Ю.О., Гриднева Л.Г., Михайлов Е.П. Применение дот-иммуноанализа для выявления антигенов чумного микроба в полевом материале ..... 69
- Портенко С.А., Щербакова С.А., Казакова Е.С., Шарова И.Н., Карнаухова И.Г., Топорков А.В., Кутырев В.В. Основные этапы совершенствования лабораторной базы СПЭБ ..... 72
- Спицын А.Н., Уткин Д.В., Куклев В.Е., Портенко С.А., Германчук В.Г., Осина Н.А. Применение MALDI масс-спектрометрии в диагностике особо опасных инфекционных болезней: современное состояние и перспективы ..... 77

**Иммунология**

- Демьянова О.Б., Жукова С.И., Занкович А.А., Храпова Н.П., Ротов К.А., Синтюрина Н.Н., Снатенков Е.А. Использование цитокинов и синтетических пептидов для повышения иммуногенности мелиоидозных антигенов.. 83
- Петров А.А., Лебедев В.Н., Плеханова Т.М., Стомба Л.Ф., Сидорова О.Н., Мельникова Е.В., Борисевич С.В. Перспективы разработки и применения вакцин на основе РНК-репликона вируса венесуэльского энцефаломиелита лошадей против особо опасных вирусных инфекций ..... 86

**Биотехнология**

- Ковтун Ю.С., Курилова А.А., Таран Т.В., Катунина Л.С., Чурикова Н.В. Сравнительная оценка потенциальных белковых основ микробиологических сред ..... 92
- Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Задохин С.Н., Еремин С.А., Волох О.А., Алешина Ю.А. Математическая модель кинетики накопления антигенов в ходе периодического глубинного культивирования *Vibrio cholerae* 569B Инаба с лимитацией по углеродному субстрату ..... 96
- Полунина Т.А., Гусева Н.П., Кузьмиченко И.А., Девдариани З.Л., Заднова С.П., Степанов А.В., Киреев М.Н. Новый способ получения липополисахарида возбудителя чумы ..... 100

**Памяти коллеги**

- Памяти Ларисы Вениаминовны Ляпустиной ..... 104

**Diagnostics**

- Noskova O.A., Zagoskina T.Yu., Subycheva E.N., Markov E.Yu., Popova Yu.O., Gridneva L.G., Mikhailov E.P. Application of Dot-Immunoassay for Detection of Plague Agent Antigens in the Field Samples
- Portenko S.A., Shcherbakova S.A., Kazakova E.S., Sharova I.N., Karnaukhov I.G., Toporkov A.V., Kutyrev V.V. Key Stages in the Development of SAET Laboratory Facilities
- Spitsyn A.N., Utkin D.V., Kuklev V.E., Portenko S.A., Germanchuk V.G., Osina N.A. Application of MALDI Mass-Spectrometry for Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases: Current State of Affairs and Prospects

**Immunology**

- Dem'yanova O.B., Zhukova S.I., Zankovich A.A., Khrapova N.P., Rotov K.A., Sinyurina N.N., Sntenkov E.A. Application of Cytokines and Synthetic Peptides for Increase in Immunogenicity of Melioidosis Antigens
- Petrov A.A., Lebedev V.N., Plekhanova T.M., Stobva L.F., Sidorova O.N., Mel'nikova E.V., Borisevich S.V. Future Developments and Applications of the Vaccines against Dangerous Viral Infections, RNA-Replicon-Based, Obtained from the Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus

**Biotechnology**

- Kovtun Yu.S., Kurilova A.A., Taran T.V., Katunina L.S., Churikova N.V. Comparative Assessment of Prospective Protein Bases for Microbiological Media
- Komissarov A.V., Nikiforov A.K., Zadokhin S.N., Eremin S.A., Volokh O.A., Aleshina Yu.A. Mathematical Model of Kinetics of Antigens Accumulation in the Process of Periodical Submerged Cultivation of *Vibrio cholerae* 569B Inaba with Limitation as Regards Carbonic Substrate
- Polunina T.A., Guseva N.P., Kuz'michenko I.A., Devdariani Z.L., Zadnova S.P., Stepanov A.V., Kireev M.N. New Method of Plague Agent Lipopolysaccharide Obtaining

**Revering the Memory of the Colleague**

- Of blessed memory of Larisa Veniaminovna Lyapustina

Г.Г.Онищенко<sup>1</sup>, В.В.Кутырев<sup>2</sup>, Г.Н.Одинок<sup>2</sup>, В.А.Сафронов<sup>2</sup>**СИНТЕТИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ: РИСКИ И ПЕРСПЕКТИВЫ**<sup>1</sup>Российская академия наук, Москва, Российская Федерация; <sup>2</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Новое направление в биологических исследованиях под общим названием «синтетическая биология» представляет собой следующий шаг в развитии генной инженерии, связанный с проектированием и построением уникальных биологических систем с «запрограммированными» функциями и свойствами, которые не имеют своих природных аналогов. В наши дни синтетическая биология служит источником инноваций, которые обещают решить ряд глобальных проблем, стоящих перед человечеством. В том числе получение на основе искусственных геномов мультидиагностических платформ, лекарственных препаратов, синтетических вакцин и другие. Создание синтетических форм жизни указывает на необходимость развития их мониторинга как на международном, так и национальном уровнях на основе новой системы оценки рисков биологической безопасности.

*Ключевые слова:* искусственный геном, секвенирование и синтез нуклеиновых кислот, 4D-принтеры, третья пара оснований ДНК, контроль рисков в области синтетической биологии.

G.G.Onishchenko<sup>1</sup>, V.V.Kutyrev<sup>2</sup>, G.N.Odinokov<sup>2</sup>, V.A.Safronov<sup>2</sup>**Synthetic Biology: Risks and Prospects**<sup>1</sup>Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation; <sup>2</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

New area of biological studies that goes under general name of "synthetic biology" is a next step in the development of gene engineering associated with design and construction of unique biological systems with "preset" functions and properties, having no natural analogues. Nowadays synthetic biology is a source of innovations that offer solution to a number of global problems facing the humanity, including production of artificial genome-based multi-diagnostic panels, medicinal preparations, synthetic vaccine, etc. The process of unnatural life form creation requires conduction of monitoring both on the international and national scales using advanced system of biological risk assessment.

*Key words:* artificial genome, sequencing and synthesis of nucleic acids, 4D-printers, the third DNA base pair, and risk control in the sphere of synthetic biology.

Одним из величайших научных достижений в области биологии XX столетия явилось открытие пространственной структуры дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), а также молекулярных механизмов, обеспечивающих сохранение, передачу и реализацию наследственной информации. Эти открытия послужили началом эпохи молекулярной биологии, дальнейшим развитием которой стало новое научное направление под общим названием «синтетическая биология».

Впервые термин «синтетическая биология» («synthetic biology») был предложен немецким биохимиком Барбарой Хобом (Barbara Hobom) в 1980 г. для описания трансгенной бактерии, полученной с помощью технологии рекомбинантной ДНК. Впоследствии, на многие годы, термин «синтетическая биология» практически вышел из употребления в научном сообществе, за исключением ряда работ середины 90-х годов XX века, в том числе исследований Клауса Концельманна (Klaus Conzelmann) и Матиаса Шнеля (Mathias Schnell), посвященных созданию синтетических аналогов геномной одноцепочечной (-)РНК вируса бешенства [2].

Синтетическая биология – это новое направление в биологических исследованиях, представляющее собой следующий шаг в развитии генной ин-

женерии от перемещения нескольких генов между организмами к проектированию и построению уникальных биологических систем с «запрограммированными» функциями и свойствами. На пути создания искусственного генома исследователям предстояло решить задачу, связанную с определением нуклеотидной последовательности природных молекул геномной ДНК (РНК). В 70-е годы XX века были разработаны различные методические подходы по секвенированию ДНК. Англичанином Фредериком Сэнгером (Frederick Sanger) были предложены методы секвенирования нуклеиновых кислот, известные как «плюс-минус» (1975 г.), и метод терминаторов (1977 г.), американцами Алланом Максамом (Allan Maxam) и Уолтером Гилбертом (Walter Gilbert) – метод химической дегградации (1976–1977 гг.). Исторически самым «долгоживущим» оказался метод терминаторов, основанный на использовании дидезоксинуклеозидтрифосфатов (ddATP, ddTTP, ddCTP или ddGTP), которые могут включаться в растущую цепь ДНК, но не способны образовывать фосфодиэфирные связи из-за отсутствия 3'-ОН группы. Претерпев небольшие модификации, в том числе отказ от радиоактивных меток в пользу флуоресцентных красителей, этот метод применяется в современных приборах – капиллярных секвенаторах. В то же

время метод капиллярного секвенирования имеет серьезное ограничение, связанное с предельными размерами «участков-чтения» ДНК, которые, как правило, не превышают 1000 п.н. Тем не менее, с помощью автоматизированного секвенирования перекрывающихся фрагментов ДНК по методу Сенгера были получены первые полногеномные последовательности (whole genome sequencing, WGS): в 1977 г. бактериофага *phiX174* (5,386 Kb, 11 генов), в 1995 г. штамма Rd *Haemophilus influenzae* (1,830137 Mb, 2355 генов), в 1997 г. штамма K12 *Escherichia coli* (4,64 Mb, 4497 генов) и многие другие.

Основные успехи в развитии синтетической биологии связаны с развитием технологии секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS). Принципиальным отличием метода NGS от капиллярного секвенирования является массовое параллельное прочтение огромного количества относительно небольших фрагментов ДНК (100 п.н.), что позволяет проводить полногеномное секвенирование *de novo*. Так, полногеномный секвенатор второго поколения Illumina GAIIx позволяет получать до 10 млрд нуклеотидов за один запуск (геном *Escherichia coli* – 4,6 м.п.н., *Homo sapiens* – 3,2 млрд п.н.), а стоимость секвенирования индивидуального генома человека составляет 5 тыс. долларов США. Последний в линейке приборов комплекс – Illumina HiSeqX Ten (2013 г.) – применяется для популяционного секвенирования и позволяет за 1 неделю секвенировать 320 геномов *Homo sapiens*, за 1 месяц – 1500, а за год – 18000. При этом стоимость процедуры снижена до 1 тыс. долларов США за геном человека.

Параллельно с методом секвенирования ДНК развивались технологии синтеза из отдельных нуклеотидов коротких олигонуклеотидов (с заданной последовательностью) и их «сшивание» в более длинные полинуклеотидные цепи, которые могут служить основой для создания искусственного гена и генома. В 1970 г. американский ученый индийского происхождения Хар Гобинд Корана (Har Gobind Khorana) впервые осуществил ферментативный синтез гена алланин-тРНК пекарских дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) с применением полимераз и лигаз.

Впоследствии химико-ферментным методом были синтезированы нуклеотидные последовательности генов, кодирующих первичную структуру предшественников инсулина, соматотропина, тиреотропин-рилизинг-гормона,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -интерферонов и другие, которые применялись для создания трансгенных микроорганизмов методом генной инженерии.

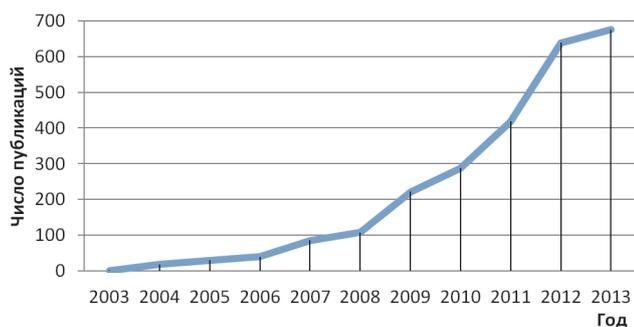
Для синтеза бактериальных геномов была разработана технология получения больших фрагментов ДНК, в соответствии с которой химически синтезированные полинуклеотиды объединялись в перекрывающиеся кассеты (7–8 т.п.н.) *in vitro* при помощи соответствующих ферментов до размера 1/4 генома. Полная сборка генома из четырех оставшихся фрагментов осуществлялась *in vivo* в клетках *S. cerevisiae*.

Дальнейшее развитие технологии сборки искусственных геномов из полинуклеотидных цепей позволило проводить всю операцию *in vitro* без применения метаболического аппарата дрожжевой клетки [3].

Основные достижения в области синтетической биологии XXI века связаны с именем американского генетика Крейга Вентера (Craig Venter) и созданного им института в США, носящего его имя. В 2003 г. группе исследователей под руководством К. Вентера удалось синтезировать геномную ДНК бактериофага *phiX174* (5386 п.н.), в 2008 г. синтезирован полный бактериальный геном *Mycoplasma genitalium* размером 580 т.п.н., а в 2010 г. – геном *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0 размером 1,08 м.п.н. [3, 4].

В 2014 г. в журнале Science была опубликована работа, посвященная созданию «усовершенствованной» эукариотической синтетической хромосомы *S. cerevisiae*, выполненная в рамках проекта «Sc2.0» [5]. Группе из 49 студентов под руководством Джефа Боеке (Jef Boeke) за полтора года удалось синтезировать и собрать 272871 п.н. искусственной хромосомы synIII – «дизайнерского» варианта природной третьей хромосомы *S. cerevisiae*, размер которой составляет 316667 п.н. В синтетической хромосоме synIII авторы удалили некоторые фрагменты – интроны (некодирующие участки), мигрирующие генетические элементы (МГЭ), субтеломерные участки, псевдогены, а также произвели оптимизацию кодонов (например, заменили стоп-кодон TAG на TAA). Шаблон синтетической хромосомы был разработан *in silico* (на компьютере), а в последствии синтезирован и собран в несколько этапов. На первом этапе с помощью ПЦР перекрывающиеся олигонуклеотидные фрагменты (из 60–79 п.н.) собирались в более длинные цепочки из 750 п.н. и встраивались в векторные плазмиды. На втором этапе проводили трансформацию этими плазмидами бактериальных клеток. Между плазмидами, в цитоплазме бактериальных клеток, происходила гомологичная рекомбинация и сборка более крупных фрагментов – от 2 до 4 т.п.н. На заключительном этапе плазида-переносчик с крупным фрагментом помещалась в клетки дрожжей, где происходила гомологичная рекомбинация между естественной третьей хромосомой и фрагментом синтетической хромосомы в составе плазмиды. Таким образом, часть естественной хромосомы заменялась участком из synIII, а после нескольких повторений этой процедуры (11 повторений) вся третья хромосома представляла собой «дизайнерскую» последовательность синтетической хромосомы. Научная группа Д. Боеке ставит планы по созданию полного синтетического генома *S. cerevisiae* в ближайшие несколько лет. При этом они предполагают, что в дрожжевой геном возможно внести гораздо более серьезные изменения, которые будут использоваться для решения различных биотехнологических задач, а также в фундаментальных исследованиях, в том числе посвященных вопросам эволюции синтетического генома.

Очевидный рост интереса (рисунок) к син-



Динамика публикации статей по теме «синтетическая биология»

тетической биологии во многом обусловлен теми возможностями, которые открываются перед человечеством. В том числе «синтетическая биология» позволяет решить ряд глобальных проблем: получение биотоплива из водорослей, бактериального электричества и лекарственных препаратов. В настоящее время синтетическая биология рассматривается как источник инноваций для получения диагностических препаратов и мульти-диагностических платформ, предлагается синтетическая вакцина против гриппа, терапевтические препараты (бактериофагов, пробиотиков для лечения сальмонеллеза, холеры и др. инфекционных болезней), в сельском хозяйстве для повышения продуктивности и устойчивости растений и животных [1, 6, 7, 8, 9, 10].

Большие перспективы открывает возможность совместного использования технологии создания искусственного генома и 4-D принтеров – устройств, использующих метод послойного создания физического объекта по цифровой 3D-модели. 4D-принтер является усовершенствованной версией промышленной модификации трехмерного принтера. 4D-принтер может «распечатывать» объекты, способные к самоорганизации, т.е. самостоятельно принимающие нужную форму. Группой ученых из Оксфордского университета в 2013 г. с помощью 4D-принтера были синтезированы липосомы (фосфолипиды с водой, замкнутые в двуслойные пузырьки) – искусственные мембранные платформы. Контролируемое введение специализированных белков (аналог мембранных белков) в такие искусственные системы формирует щелевые контакты (*gap junctions*), способные присоединить липосомы и образовывать сплоченную, кооперативную систему. Исследователям удалось создать целую «сеть» из 35000 капель, которая по своей эластичности сходна с мозговой или жировой тканью и может сохранять свое состояние вплоть до нескольких недель. Кроме того, в искусственную мембрану были интегрированы «трансмембранные» белки с транспортной функцией, что создавало разность физико-химических параметров в липосоме и окружающей среде. Это пример перспективной искусственной платформы для построения более сложных и функциональных устройств, которые в будущем включали искусственный геном. Такие синтетические ткани могут быть интегрированы с живыми организмами и заменять отсутствующие или

поврежденные органы или их фрагменты [11].

Учитывая всю сложность синтетических систем, крайне трудно предсказать все последствия их функционирования. На сегодняшний день синтезирован геном вируса полиомиелита [12] и гриппа А/Н1N1 («Испанки») [13], всерьез рассматривается возможная угроза применения синтетических геномов вирусов в качестве агентов биотерроризма. В сельском хозяйстве имеются примеры появления «супер сорняков», устойчивости к гербициду глифосфату, что приводит к нарушению экологического баланса [14]. Одним из ярких примеров новых угроз является возможность появления ранее недоступных способов производства наркотических средств. В частности, не пригодный для получения морфина – опиумного алколоида – прицветниковый мак (*Papaver bracteatum*) становится его продуцентом. Описан эксперимент получения трансгенных бактерий (*Agrobacterium rhizogenes*), содержащих рекомбинантную плазмиду со встроенным геном *codR* (фермента кодеин-редуктазы) опиумного мака (*Papaver somniferum*). Такие генномодифицированные бактерии использовались для трансформации корневых волосков прицветникового мака, в результате чего продукция ими морфина увеличивалась, по сравнению с диким типом, на 22 % [15]. Как известно, морфин может быть использован не только в медицинских целях, но и для получения наркотических препаратов – морфия (морфина гидрохлорид тригидрата), героина (диаморфина) и др. Осложняет ситуацию отсутствие регламентирующих документов по культивированию *P. bracteatum* и мониторингу его дикорастущих популяций. Согласно Списку сильнодействующих и ядовитых веществ (утв. Постоянным комитетом по контролю наркотиков Российской Федерации 24.11.2004) опий представляет собой свернувшийся млечный сок опийного мака (*P. somniferum*), а не прицветникового (*P. bracteatum*).

Последние достижения в области компьютерной техники – рост вычислительных мощностей, возможность хранения больших объемов информации и новые алгоритмы анализа и моделирования живых систем дают исследователям-биоинформатикам возможность совершать фундаментальные открытия без необходимости проведения классического эксперимента. В настоящее время появилось большое количество общедоступных баз данных, содержащих нуклеотидные последовательности ДНК и РНК (в том числе высокопатогенных возбудителей болезней человека и животных), информацию о пространственной структуре белковых молекул и метаболических путях различных организмов от вируса до человека – все это открывает новые перспективы применения компьютерных технологий (*in silico*) в биологических исследованиях, в том числе и посвященных созданию искусственных форм жизни. Биологические лаборатории, реализующие биоинформационный подход в своих исследованиях, в английском языке называют «сухими» (*dry lab*), в про-

тивовес классическим «мокрым» лабораториям (wet lab), где основу исследований составляют сделанные руками эксперименты. Примером «сухой» лаборатории может служить лаборатория Атула Бьюта (Atul Butte) медицинского факультета Стэнфордского университета, которая известна открытиями в области изучения диабета, ожирения, трансплантологии и обнаружения новых лекарств для лечения рака легких и других заболеваний [16, 17, 18]. Сотрудники этой лаборатории большую часть времени проводят за ноутбуками, иногда обращаясь к большому компьютерному кластеру Стэнфордского университета или другому суперкомпьютеру. Для повышения эффективности блока экспериментальной «мокрой» лаборатории в настоящее время активно применяются автоматизированные системы, которые многократно ускоряют ход научных исследований и снижают их трудоемкость.

Таким образом, оценивая дальнейшие перспективы развития синтетической биологии, следует выделить три ключевых аспекта: научно-технический, законодательный и организационно-контрольный.

Следует особо подчеркнуть увеличение темпов роста исследовательских работ по всему миру и явную тенденцию к усложнению продуктов синтетической биологии. Наблюдается активное вовлечение национальных оборонных структур. В частности, в апреле 2014 г. в 56-ю годовщину создания агентства передовых исследовательских проектов при Министерстве обороны США, более известного как DARPA (Defense Advanced Research Projects Agency), было объявлено о создании в своей структуре нового подразделения – отдела биологических технологий. Революция в этой области знаний развивается многократно быстрее, чем это декларирует закон Мура (1965 г.) – статистический прогноз бывшего главы компании Intel Гордона Мура (Gordon Moore), который предполагает не линейное, а экспоненциальное развитие всех технологий. Важным качественным аспектом научного развития в данной области является переход от манипулирования аналогами крупных участков природных геномов к прямому проектированию на основе комбинации отдельных функциональных блоков. При этом главная проблема при создании искусственного генома на основе синтетических генных сетей, не имеющих естественных аналогов, будет связана с проектированием *in silico* принципиально новых полипептидов с определенной пространственной структурой и «запрограммированной» функцией. В перспективе станет возможным создание искусственных геномов уже не на основе природных аналогов, и даже не матриц ДНК-РНК, а основанных на иных принципах кодирования, чем естественные геномы. Уже сейчас рассматриваются варианты замещения ДНК ее синтетическим аналогом пептидно-нуклеиновой кислотой (ПНК, PNA), в которой сахаро-фосфатный остов заменен на линейные полимеры N-(2-аминоэтил)глицина и на которую нанизаны нуклеозидные остатки. В отличие от

своего природного аналога ПНК будет находиться не внутри клетки, а на поверхности мембраны вместе с другими органеллами [19].

В 2014 г. группе американских исследователей под руководством Флойда Ромсберга (Floyd Romesberg) из института Скриппса (The Scripps Research Institute) удалось внести корректировки в генетический код. Синтезированная учеными плазмида содержала, наряду с естественными парами комплементарных гетероциклических оснований – аденин (А) и тимин (Т), гуанин (G) и цитозин (С) – искусственную пару d5SICS- dNaM, обозначенную авторами как X-Y. Синтетическая плазмида, интегрированная в геном *E. coli*, показала способность к репликации без потери под действием механизмов репарации X-Y пар до тех пор, пока синтетические основания d5SICS и dNaM поступают в среду, содержащую бактерии. На следующем этапе исследователи должны проверить, возможна ли транскрипция полусинтетической ДНК – синтез информационной РНК, которая в дальнейшем принимает участие в синтезе белковых молекул. Ученым удалось увеличить информационную емкость молекулы ДНК, что в будущем позволит дополнить природный «белковый словарь» совершенно новыми протеинами для создания на их основе лекарственных, диагностических и вакцинных препаратов [20, 21]. По мере накопления практического опыта будут совершенствоваться и алгоритмы биоинформатики, делая поиск устойчивых искусственных форм жизни с заданными свойствами более эффективным и целенаправленным. В итоге, благодаря развитию 4-D принтеров синтетическая биология сможет перейти от одноклеточных продуктов на уровень искусственных тканей и органов.

Следующим аспектом является необходимость правового регулирования биологической безопасности синтетических форм жизни и системы их мониторинга на международном и национальном уровнях по новой системе оценки рисков, состоящей в комплексной, экспериментально доказательной проработке последствий в области синтетической биологии. В настоящее время законодательное и нормативное обеспечение работ, связанных с синтетической биологией в Российской Федерации, напрямую не регламентируется. При этом генно-инженерная деятельность регулируется рядом международных и национальных документов: Международными медико-санитарными правилами (2005 г.), Женевским протоколом (1925 г.), конвенцией КБТО (1972 г.), Картахенским протоколом (2003 г.), который не подписан Россией. Национальный уровень правового обеспечения представлен Федеральным Законом РФ (О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности, 1996 г.) и Санитарными правилами (1988 г.), которые охватывают работу с рекомбинантными ДНК. Вместе с тем очевидна недостаточность систем контроля за соблюдением имеющихся норм, а также тот факт, что последние революционные достижения в области синтетической

биологии уже вступают в противоречие с положениями действующих нормативных документов, что требует оперативной выработки новой нормативной базы и новых методов контроля.

В этой связи третьим аспектом является направление по усилению национальных мощностей по оценке и контролю рисков в области синтетической биологии. В Российской Федерации еще предстоит определить ведомственную структуру, обеспечивающую надзорные и контрольные функции в этой области, наделив ее не только полномочиями, но и соответствующей ресурсной базой. Адекватное организационное обеспечение контроля биосинтетических рисков может опираться на сеть научных центров, при условии оснащения передовым оборудованием и создания благоприятных условий для профильных коллективов путем целевого финансирования. Для полноценной реализации этого направления требуется комплексная национальная программа по развитию синтетической биологии с опережающим планированием и вовлечением всех профильных министерств и ведомств. Исходя из новых задач, усиление и модернизация практических учреждений, осуществляющих надзор и контроль на системном уровне, возможны путем создания многоуровневой сети профильных учреждений, работающих по аналогии с действующей трехуровневой системой лабораторной диагностики инфекционных болезней, опирающейся на крупные референс-центры.

В заключение следует отметить, что, помимо утилитарных вопросов оценки пользы или вреда, существует и этический аспект. Мировая научная общественность всерьез озабочена этикой искусственной эволюции, пытаясь найти ответ на вопрос: имеет ли право человек ускорять этот процесс в миллионы раз, не обладая достаточным уровнем предвидения последствий, действуя по принципу «осуществлять все, что технически достижимо»?

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Седова Е.С., Щербинин Д.Н., Мигунов А.И., Смирнов Ю.А., Логунов Д.Ю., Шмаров М.М., Цыбалова Л.М., Народицкий Б.С., Киселев О.И., Гинцбург А.Л. Гриппозные рекомбинантные вакцины. *Acta Nature*. 2012; 4(4):17–27.
2. Rawls R.L. 'Synthetic biology' makes its debut. *Chemical & Engineering News*. 2000; 78:49–53.
3. Gibson D.G., Glass J.I., Lartigue C., Noskov V.N., Chuang R.Y., Algire M.A., Benders G.A., Montague M.G., Ma L., Moodie M.M., Merryman C., Vashee S., Krishnakumar R., Assad-Garcia N., Andrews-Pfannkoch C., Denisova E.A., Young L., Qi Z.Q., Segall-Shapiro T.H., Calvey C.H., Parmar P.P., Hutchison C.A. 3rd, Smith H.O., Venter J.C. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*. 2010; 329(5987):52–6.
4. Smith H.O., Hutchison C.A., Pfannkoch C., Venter J.C. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phiX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; 100(26):15440–45.
5. Annaluru N., Muller H., Mitchell L.A., Ramalingam S., Stracquadanio G., Richardson S.M., Dymond J.S., Kuang Z., Scheifele L.Z., Cooper E.M., Cai Y., Zeller K., Agmon N., Han J.S., Hadjithomas M., Tullman J., Caravelli K., Cirelli K., Guo Z., London V., Yeluru A., Murugan S., Kandavelou K., Agier N., Fischer G., Yang K., Martin J.A., Bilgel M., Bohutski P., Boulier K.M., Capaldo B.J., Chang J., Charoen K., Choi W.J., Deng P., DiCarlo J.E., Doong J., Dunn J., Feinberg J.I., Fernandez C., Floria C.E., Gladowski D., Hadidi P., Ishizuka I., Jabbari J., Lau C.Y., Lee P.A., Li S., Lin D., Linder M.E., Ling J., Liu J., Liu J., London M., Ma H., Mao J., McDade J.E., McMillan A., Moore A.M., Oh W.C., Ouyang Y., Patel

R., Paul M., Paulsen L.C., Qiu J., Rhee A., Rubashkin M.G., Soh I.Y., Sotuyo N.E., Srinivas V., Suarez A., Wong A., Wong R., Xie W.R., Xu Y., Yu A.T., Koszul R., Bader J.S., Boeke J.D., Chandrasegaran S. Total Synthesis of a Functional Designer Eukaryotic Chromosome. *Science*. 2014; 344:55–8.

6. Dormitzer P.R., Suphaphiphat P., Gibson D.G., Wentworth D.E., Stockwell T.B., Algire M.A., Alperovich N., Barro M., Brown D.M., Craig S., Dattilo B.M., Denisova E.A., De Souza I., Eickmann M., Dugan V.G., Ferrari A., Gomila R.C., Han L., Judge C., Mane S., Matrosovich M., Merryman C., Palladino G., Palmer G.A., Spencer T., Strecker T., Trusheim H., Uhlenhoff J., Wen Y., Yee A.C., Zaveri J., Zhou B., Becker S., Donabedian A., Mason P.W., Glass J.I., Rappuoli R., Venter J.C. Synthetic generation of influenza vaccine viruses for rapid response to pandemics. *Sci. Transl. Med.* 2013; 5(185):185ra68. DOI 10.1126/scitranslmed.3006368.

7. Krylov V., Shaburova O., Krylov S., Pleteneva E. A genetic approach to the development of new therapeutic phages to fight *Pseudomonas aeruginosa* in wound infections. *Viruses*. 2012; 5(1):15–53.

8. Conor M.W., Stemerding D.D. Governing synthetic biology for global health through responsible research and innovation. *Syst. Synth. Biol.* 2013; (7):139–50.

9. Karas B.J., Molparia B., Jablanovic J., Hermann W.J., Lin Y.C., Dupont C.L., Tagwerker C., Yonemoto I.T., Noskov V.N., Chuang R.Y., Allen A.E., Glass J.I., Hutchison C.A. 3rd, Smith H.O., Venter J.C., Weyman P.D. Assembly of eukaryotic algal chromosomes in yeast. *J. Biol. Eng.* 2013; 7(1):30.

10. Rooke J. Synthetic biology as a source of global health innovation. *Syst. Synth. Biol.* 2013; (7):67–72.

11. Villar G., Graham A.D., Bayley H.A. Tissue-Like Printed Material. *Science*. 2013; 340(6128):48–52.

12. Cello J., Paul A.V., Wimmer E. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: Generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science*. 2002; 297:1016–8.

13. Wimmer E., Mueller S., Tumpey T.M., Taubenberger J.K. Synthetic viruses: a new opportunity to understand and prevent viral disease. *Nat. Biotechnol.* 2009; 27(12):1163.

14. Adler J. The growing menace from superweeds. *Sci. Am.* 2011; 304(5):74–9.

15. Sharafi A., Sohi H.H., Mousavi A., Azadi P., Khalifani B.H., Razavi K. Metabolic engineering of morphinan alkaloids by over-expression of codeinone reductase in transgenic hairy roots of *Papaver bracteatum*, the Iranian poppy. *Biotechnol. Lett.* 2013; 35(3):445–53.

16. Janusz M., Sorkin M., Glotzbach J.P., Vial I.N., Maan Z., Rennert R.C., Duscher D., Thangarajah H., Longaker M.T., Butte A.J., Gurtner G.C. Diabetes Irreversibly Depletes Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cell Subpopulations. *J. Diabetes*. 2014; [Epub. ahead of print]. DOI: 10.2337/db13-1366.

17. Shaikh A.R., Butte A.J., Schully S.D., Dalton W.S., Khoury M.J., Hesse B.W. Collaborative biomedicine in the age of big data: the case of cancer. *J. Med. Internet. Res.* 2014; 16(4):e101. DOI 10.2196/jmir.2496.

18. Chen R., Khatri P., Mazur P.K., Polin M., Zheng Y., Vaka D., Hoang C.D., Shrager J., Xu Y., Vicent S., Butte A.J., Sweet-Cordero E.A. A meta-analysis of lung cancer gene expression identifies PTK7 as a survival gene in lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2014; [Epub. ahead of print].

19. Bentin T., Nielsen M.L. RNA-DNA sequence differences spell genetic code ambiguities. *Artif. DNA PNA XNA*. 2011; 2(3):69–70.

20. Malyshev D.A., Dhami K., Lavergne T., Chen T., Dai N., Foster J.M., Corrèa I.R.Jr., Romesberg F.E. A semi-synthetic organism with an expanded genetic alphabet. *Nature*. 2014; DOI 10.1038/nature13314. [Epub ahead of print].

21. Thyer R., Ellefson J. New letters for life's alphabet. *Nature*. 2014; DOI 10.1038/nature13335. [Epub ahead of print].

#### References

1. Sedova E.S., Shcherbinin D.N., Migunov A.I., Smirnov Yu.A., Logunov D.Yu., Shmarov M.M., Tsybalova L.M., Naroditsky B.S., Kiselev O.I., Gintsburg A.L. [Influenza recombinant vaccines]. *Acta Nature*. 2012; 4(4):17–27.
2. Rawls R.L. 'Synthetic biology' makes its debut. *Chemical & Engineering News*. 2000; 78:49–53.
3. Gibson D.G., Glass J.I., Lartigue C., Noskov V.N., Chuang R.Y., Algire M.A., Benders G.A., Montague M.G., Ma L., Moodie M.M., Merryman C., Vashee S., Krishnakumar R., Assad-Garcia N., Andrews-Pfannkoch C., Denisova E.A., Young L., Qi Z.Q., Segall-Shapiro T.H., Calvey C.H., Parmar P.P., Hutchison C.A. 3rd, Smith H.O., Venter J.C. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science*. 2010; 329(5987):52–6.
4. Smith H.O., Hutchison C.A., Pfannkoch C., Venter J.C. Generating a synthetic genome by whole genome assembly: phiX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; 100(26):15440–45.
5. Annaluru N., Muller H., Mitchell L.A., Ramalingam S., Stracquadanio G., Richardson S.M., Dymond J.S., Kuang Z., Scheifele L.Z., Cooper E.M.,

- Cai Y., Zeller K., Agmon N., Han J.S., Hadjithomas M., Tullman J., Caravelli K., Cirelli K., Guo Z., London V., Yeluru A., Murugan S., Kandavelou K., Agier N., Fischer G., Yang K., Martin J.A., Bilgel M., Bohutski P., Boulier K.M., Capaldo B.J., Chang J., Charoen K., Choi W.J., Deng P., DiCarlo J.E., Doong J., Dunn J., Feinberg J.I., Fernandez C., Floria C.E., Gladowski D., Hadidi P., Ishizuka I., Jabbari J., Lau C.Y., Lee P.A., Li S., Lin D., Linder M.E., Ling J., Liu J., Liu J., London M., Ma H., Mao J., McDade J.E., McMillan A., Moore A.M., Oh W.C., Ouyang Y., Patel R., Paul M., Paulsen L.C., Qiu J., Rhee A., Rubashkin M.G., Soh I.Y., Sotuyo N.E., Srinivas V., Suarez A., Wong A., Wong R., Xie W.R., Xu Y., Yu A.T., Koszul R., Bader J.S., Boeke J.D., Chandrasegaran S. Total Synthesis of a Functional Designer Eukaryotic Chromosome. *Science*. 2014; 344:55–8.
6. Dormitzer P.R., Suphaphiphat P., Gibson D.G., Wentworth D.E., Stockwell T.B., Algire M.A., Alperovich N., Barro M., Brown D.M., Craig S., Dattilo B.M., Denisova E.A., De Souza I., Eickmann M., Dugan V.G., Ferrari A., Gomila R.C., Han L., Judge C., Mane S., Matrosovich M., Merryman C., Palladino G., Palmer G.A., Spencer T., Strecker T., Trusheim H., Uhlendorff J., Wen Y., Yee A.C., Zaveri J., Zhou B., Becker S., Donabedian A., Mason P.W., Glass J.I., Rappuoli R., Venter J.C. Synthetic generation of influenza vaccine viruses for rapid response to pandemics. *Sci. Transl. Med.* 2013; 5(185):185ra68. DOI 10.1126/scitranslmed.3006368.
7. Krylov V., Shaburova O., Krylov S., Pleteneva E. A genetic approach to the development of new therapeutic phages to fight *Pseudomonas aeruginosa* in wound infections. *Viruses*. 2012; 5(1):15–53.
8. Connor M.W., Stemerding D.D. Governing synthetic biology for global health through responsible research and innovation. *Syst. Synth. Biol.* 2013; (7):139–50.
9. Karas B.J., Molparia B., Jablanovic J., Hermann W.J., Lin Y.C., Dupont C.L., Tagwerker C., Yonemoto I.T., Noskov V.N., Chuang R.Y., Allen A.E., Glass J.I., Hutchison C.A. 3rd, Smith H.O., Venter J.C., Weyman P.D. Assembly of eukaryotic algal chromosomes in yeast. *J. Biol. Eng.* 2013; 7(1):30.
10. Rooke J. Synthetic biology as a source of global health innovation. *Syst. Synth. Biol.* 2013; (7):67–72.
11. Villar G., Graham A.D., Bayley H.A. Tissue-Like Printed Material. *Science*. 2013; 340(6128):48–52.
12. Cello J., Paul A.V., Wimmer E. Chemical synthesis of poliovirus cDNA: Generation of infectious virus in the absence of natural template. *Science*. 2002; 297:1016–8.
13. Wimmer E., Mueller S., Tumpey T.M., Taubenberger J.K. Synthetic viruses: a new opportunity to understand and prevent viral disease. *Nat. Biotechnol.* 2009; 27(12):1163.
14. Adler J. The growing menace from superweeds. *Sci. Am.* 2011; 304(5):74–9.
15. Sharafi A., Sohi H.H., Mousavi A., Azadi P., Khalifani B.H., Razavi K. Metabolic engineering of morphinan alkaloids by over-expression of co-deinone reductase in transgenic hairy roots of *Papaver bracteatum*, the Iranian poppy. *Biotechnol. Lett.* 2013; 35(3):445–53.
16. Januszyk M., Sorkin M., Glotzbach J.P., Vial I.N., Maan Z., Rennett R.C., Duscher D., Thangarajah H., Longaker M.T., Butte A.J., Gurtner G.C. Diabetes Irreversibly Depletes Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cell Subpopulations. *J. Diabetes*. 2014; [Epub. ahead of print]. DOI: 10.2337/db13-1366.
17. Shaikh A.R., Butte A.J., Schully S.D., Dalton W.S., Khoury M.J., Hesse B.W. Collaborative biomedicine in the age of big data: the case of cancer. *J. Med. Internet. Res.* 2014; 16(4):e101. DOI 10.2196/jmir.2496.
18. Chen R., Khatri P., Mazur P.K., Polin M., Zheng Y., Vaka D., Hoang C.D., Shrager J., Xu Y., Vicent S., Butte A.J., Sweet-Cordero E.A. A meta-analysis of lung cancer gene expression identifies PTK7 as a survival gene in lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2014; [Epub. ahead of print].
19. Bentin T., Nielsen M.L. RNA-DNA sequence differences spell genetic code ambiguities. *Artif. DNA PNA XNA*. 2011; 2(3):69–70.
20. Malyshev D.A., Dhami K., Lavergne T., Chen T., Dai N., Foster J.M., Corrêa I.R.Jr., Romesberg F.E. A semi-synthetic organism with an expanded genetic alphabet. *Nature*. 2014; DOI 10.1038/nature13314. [Epub ahead of print].
21. Thyer R., Ellefson J. New letters for life's alphabet. *Nature*. 2014; DOI 10.1038/nature13335. [Epub ahead of print].

**Authors:**

*Onishchenko G.G.* Russian Academy of Science. Moscow, Russian Federation.

*Kutyrev V.V., Odnokov G.N., Safronov V.A.* Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

**Об авторах:**

*Онищенко Г.Г.* Российская академия наук. Москва, Российская Федерация.

*Кутырев В.В., Одинокоев Г.Н., Сафронов В.А.* Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 26.06.14.

УДК 616.9:616-036.22(571.64)

Е.И.Андаев<sup>1</sup>, М.В.Чеснокова<sup>1</sup>, Т.И.Борисова<sup>1</sup>, Е.А.Вершинин<sup>1</sup>, С.А.Татарников<sup>1</sup>, Н.В.Бренева<sup>1</sup>,  
А.В.Мазепа<sup>1</sup>, Р.В.Адельшин<sup>1</sup>, С.Э.Худченко<sup>1</sup>, Е.А.Сидорова<sup>1</sup>, О.В.Мельникова<sup>1</sup>, Ю.Н.Трушина<sup>1</sup>,  
В.Т.Климов<sup>1</sup>, Б.Б.Дарижанов<sup>2</sup>, Т.К.Тин<sup>2</sup>, Н.И.Легейда<sup>3</sup>, Е.А.Им Ен Ок<sup>3</sup>

## ОЦЕНКА ЭПИЗООТОЛОГО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫМ ИНФЕКЦИЯМ В АЛЕКСАНДРОВСК-САХАЛИНСКОМ РАЙОНЕ САХАЛИНСКОЙ ОБЛАСТИ

<sup>1</sup>ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»,  
Иркутск, Российская Федерация; <sup>2</sup>Управление Роспотребнадзора по Сахалинской области, Южно-  
Сахалинск, Российская Федерация; <sup>3</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Сахалинской области»,  
Южно-Сахалинск, Российская Федерация

Цель работы заключалась в комплексной оценке современного состояния эпизоотической активности и эпидемиологической значимости природных очагов возбудителей инфекционных болезней в Александровск-Сахалинском районе Сахалинской области. В июле 2010 г. на разных участках района отловлено 56 особей мелких млекопитающих, собрано 180 экземпляров имаго таежных клещей, отловлено 1000 экземпляров комаров. От жителей района собрано 223 образца сывороток крови. Весь полевой материал исследовали для выявления специфических антител, антигенов и генетического материала возбудителей. По результатам эпизоотологического обследования, серологических и молекулярно-генетических исследований показано, что на территории района имеются природные очаги лептоспирозов, туляремии, клещевого энцефалита (КЭ), иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ), клещевого риккетсиоза (КР), гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ), моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ), лихорадки Западного Нила (ЛЗН), Инко, Гета, Батаи, а также хантавирусов (ГЛПС) с разной степенью проявления активности. От комаров выделен штамм вируса КЭ.

*Ключевые слова:* Сахалин, природно-очаговые инфекции, заболеваемость, лептоспирозы, туляремия, клещевой энцефалит, лихорадка Западного Нила, хантавирусы, инфекции, передающиеся иксодовыми клещами, лабораторная диагностика.

E.I.Andaev<sup>1</sup>, M.V.Chesnokova<sup>1</sup>, T.I.Borisova<sup>1</sup>, E.A.Vershinin<sup>1</sup>, S.A.Tatarnikov<sup>1</sup>, N.V.Breneva<sup>1</sup>, A.V.Mazepa<sup>1</sup>,  
R.V.Adel'shin<sup>1</sup>, S.E.Khudchenko<sup>1</sup>, E.A.Sidorova<sup>1</sup>, O.V.Mel'nikova<sup>1</sup>, Yu.N.Trushina<sup>1</sup>, V.T.Klimov<sup>1</sup>,  
B.B.Darizhapov<sup>2</sup>, T.K.Tin<sup>2</sup>, N.I.Legeida<sup>3</sup>, E.A.Im En Ok<sup>3</sup>

### Assessment of Epizootiological-Epidemiological Situation on Natural Focal Infections in Aleksandrovsk-Sakhalin Territory of the Sakhalin Region

<sup>1</sup>Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation; <sup>2</sup>Rospotrebnadzor  
Administration in the Sakhalin Region, Yuzhno-Sakhalinsk, Russian Federation; <sup>3</sup>Center of Hygiene and Epidemiology  
in the Sakhalin Region, Yuzhno-Sakhalinsk, Russian Federation

Objective of the work was to carry out complex assessment of the current state of epizootic activity and epidemiological significance of the infectious disease natural foci in the Aleksandrovsk-Sakhalin territory of the Sakhalin Region. Trapped were 56 samples of small mammals in July, 2010; collected were 180 specimens of taiga tick imago, caught were 1000 specimens of mosquitoes. 223 samples of blood sera were taken from residents of the region. All the field data were tested to detect specific antibodies, antigens and genetic material of agents. Based on the results of epizootiological investigations, serological and molecular-genetic assays, demonstrated was the occurrence of natural foci of leptospirosis, tularemia, tick-borne encephalitis, borreliosis, rickettsiosis, human granulocytic anaplasmosis, human monocytic ehrlichiosis, West Nile fever, Inco fever, Batai and Geto fevers, as well as HFRS with varying degree of activity manifestation in the territory of the region. Isolated was tick-borne encephalitis virus from mosquitoes.

*Key words:* Sakhalin, natural-focal infections, morbidity, leptospiroses, tularemia, tick-borne encephalitis, West Nile fever, hantaviruses, ixodidae tick-borne infections, laboratory diagnostics.

Остров Сахалин эндемичен по многим природно-очаговым инфекциям. На территории острова выделены возбудители туляремии, псевдотуберкулеза и кишечного иерсиниоза, лептоспироза, клещевого сыпного тифа, Ку-лихорадки; обнаружены антитела к возбудителям инфекций, передающихся иксодовыми клещами: ИКБ, КР, МЭЧ, ГАЧ [2]. При вирусологическом и серологическом обследовании людей, грызу-

нов, птиц и кровососущих членистоногих установлен циркуляция следующих арбовирусов: японского и клещевого энцефалитов, хантавирусов, Тягиня, Гета, Батаи, Заяц беляк, Тюлений [3, 4, 5]. Роль большей части перечисленных возбудителей в инфекционной патологии местного населения еще не выяснена, хотя в сыворотках крови людей выявлены специфические антитела. До настоящего времени исследования про-

водились рекогносцировочно в отношении лишь некоторых инфекций, преимущественно в южных районах Сахалина. И имеющиеся сведения дают лишь общие представления о существовании природных очагов арбовирусных и других инфекций на территории острова, Александровск-Сахалинский район менее изучен [2, 5].

Цель работы заключалась в комплексной оценке современного состояния эпизоотической активности и эпидемиологической значимости природных очагов возбудителей инфекционных болезней в Александровск-Сахалинском районе Сахалинской области.

### Материалы и методы

Во второй декаде июля 2010 г. на разных участках Александровск-Сахалинского района отловлено 56 особей мелких млекопитающих. Сбор имаго таежных клещей производили с поверхности травы по обочинам лесных дорог и троп при помощи флага-волокуши. Собрано 180 экз. имаго. Осуществлен учет численности членистоногих по стандартным методикам. Отловлено 1000 экз. комаров. От жителей района собрано 223 образца сывороток крови. Весь полевой материал исследован на бактериальные инфекции (иерсиниозы, туляремию, лептоспирозы), инфекции, передающиеся клещами (КЭ, ИКБ, КР, МЭЧ, ГАЧ), комарами (лихорадка Западного Нила, Инко, Гета, Батаи) и хантавирусы.

*Иерсиниозы.* Кишечники грызунов исследовали методом «холодового обогащения» с последующим высевом на 5, 10, 15-е сутки на дифференциально-диагностическую среду с бромтимоловым синим.

*Туляремия.* Антитела к возбудителю туляремии в сыворотках крови от людей и мелких млекопитающих определяли в реакции непрямой геммагглютинации (РНГА) с антигенным эритроцитарным туляремийным диагностикумом производства Ставропольского научно-исследовательского противочумного института. Образцы печени и селезенки от всех млекопитающих объединили в 18 пулов и исследовали в биопробе на белых мышцах. Параллельно пулы исследовали на наличие ДНК возбудителя туляремии методом ПЦР.

*Лептоспирозы.* Антитела к патогенным лептоспирам в сыворотках крови выявляли в реакции микроскопической агглютинации (РМАЛ), выполняемой в стандартной процедуре с использованием в качестве антигена линейки из 10 репрезентативных штаммов для серогрупп, наиболее представленных на территории Российской Федерации: *Icterohaemorrhagiae*, *Javanica*, *Canicola*, *Autumnalis*, *Australis*, *Pomona*, *Grippotyphosa*, *Sejroe*, *Bataviae*, *Tarassovi*. Обнаружение ДНК патогенных лептоспир проводили методом ПЦР. Выделение ДНК осуществляли с помощью набора «РИБО-сорб» (ФБУН ЦНИИЭ, Москва). Детекцию ДНК патогенных лептоспир в ПЦР проводили с помощью тест-системы

«АмплиСенс Leptospira-FL» на амплификаторе Rotor-Gene 6000 (Corbet Research, Австралия) способом, описанным S.D.D.Jouglard *et al.* [6] и nested-вариантом ПЦР. Реакционную смесь для nested-варианта ПЦР готовили на основе реагентов ФБУН ЦНИИЭ, Москва.

*Клещевой энцефалит, Инко, Гета и Батаи.* Антитела к перечисленным возбудителям в пробах сывороток крови людей определяли в реакции нейтрализации (РН), проводимой микрометодом в культуре клеток СПЭВ с референс-штаммами вирусов КЭ, Инко, Гета и Батаи из коллекции института [1]. Антигены вируса КЭ в органах млекопитающих и суспензиях клещей выявляли в ИФА на тест-системах производства ФБУП «НПО «Микроген», Томск. РНК вируса КЭ определяли в ОТ-ПЦР с помощью набора АмплиСенс TBE-FL производства ФБУН ЦНИИЭ, Москва.

*Лихорадка Западного Нила.* Антитела к вирусу Западного Нила в пробах сывороток крови людей выявляли в ИФА на тест-системе ЗАО «Биосервис» (Боровск, Калужская область). Антигены и РНК вируса в пробах органов млекопитающих и пулах комаров – в ИФА и ОТ-ПЦР на тест-системах производства ЗАО «Биосервис» (Боровск, Калужская область) и АмплиСенс WNV-FL производства ФГУН ЦНИИЭ, Москва.

*Хантавирусы.* Антитела к хантавирусам в пробах сывороток крови от людей и мелких млекопитающих определяли непрямой методом флюоресцирующих антител (НМФА) с культуральным поливалентным диагностикумом, антигены хантавирусов в пробах легких мелких млекопитающих – в ИФА на тест-системах производства «Хантагност» (предприятие Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им М.П.Чумакова РАМН, Москва), РНК хантавирусов – с помощью наборов АмплиСенс Hantavirus, производства ФБУН ЦНИИЭ, Москва.

*ИКБ, ГАЧ, МЭЧ.* Для обнаружения в сыворотках крови людей иммуноглобулинов класса G к возбудителям данных инфекций применяли тест-систему ООО «Омникс», Санкт-Петербург.

*Клещевые риккетсиозы.* Антитела к риккетсиям выявляли в РСК с диагностикумом риккетсиозным Сибирика производства ФГУП «НПО «Микроген».

Суммарную ДНК из суспензий клещей экстрагировали индивидуально с помощью набора АмплиСенс «РИБО-сорб». Для амплификации гена 16S рРНК использовали праймеры RTF (5'-GTGGTGGCGG-ATCGCAGAGATGCT-3') и RTR1 (5'-TCGCCGTCTTGCTTCCCTCTGTAACA-3'), а для гена протективного поверхностного белка ompB – праймеры RtsfF (5'-GGGTGTAGGTCAGA ACGTTACAACATTT-3') и RtsfR (5'-CCAGCTAAA-CCGCCTTTCTTACTTT-3'). Расшифровка первичных последовательностей фрагмента гена ompB выполнена на автоматическом ДНК анализаторе ABI 3130 PRISM (Applied Biosystems). Полученные последовательности идентифицированы с депонента-

ми, находящимися в GenBank.

**Иксодовые клещевые боррелиозы.** ДНК боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato* (*B. burgdorferi sensu stricto*, *B. afzelii*, *B. garinii*) в суспензии клещей выявляли методом ПЦР с комплектом реагентов «АмплиСенс *Borrelia burgdorferi sensu lato*-FL». Все исследования проводили в соответствии с инструкциями изготовителей. Изоляцию патогенных агентов от комаров проводили на новорожденных белых мышах (НБМ) по общепринятой методике. Идентификацию патогенного агента осуществляли методами ИФА, ОТ-ПЦР.

### Результаты и обсуждение

Александровск-Сахалинский район расположен в центральной части острова на западном побережье Татарского пролива. Его территория входит в подзону средней темнохвойной тайги в горной средней части острова. Здесь представлены смешанные елово-пихтовые зеленомошные леса местами с суходольными и низинными лугами на месте южно-таежных лесов [2].

Обследованы наиболее характерные для района ландшафтные участки, расположенные в окрестностях пос. Арково, Половинка, Михайловка и г. Александровск-Сахалинский: опушки березово-ивово-ольховых и ольховых высокотравных зарослей на разнотравно-злаковом лугу; пихтово-березовый и осиново-елово-пихтовый лес с прилегающим лугом; смешанный пихтово-березовый лес с зарослями ольхи и рябины. Наблюдениями были охвачены основные типы смешанных лесов и луговых элементов района, осуществлен отлов и учет численности мелких млекопитающих, сбор и учет численности имаго иксодовых клещей и отлов комаров.

**Видовой состав и численность мелких млекопитающих.** Численность мелких млекопитающих варьировалась от 4,8 до 31,2 % попадания на 100 ловушко-суток. Отловлены животные 6 видов: 30 азиатских лесных мышей (10,5 % попадания), 18 красно-серых полевков (6,3 % попадания), по 3 экз. красной полевки и полевки-экономки (1,0 % попадания) и по 1 экз. серой крысы и бурозубки (0,3 % попадания). Среди мелких млекопитающих абсолютно преобладала азиатская лесная мышь. С добытых животных снято 104 экз. эктопаразитов (индекс обилия – ИО – 1,86): 20 блох трех видов (ИО 0,36), 22 вши трех видов (ИО 0,39), 37 гамазовых клещей (ИО 0,66), 14 личинок (ИО 0,25), 7 нимф (ИО 0,12) и 4 самки (ИО 0,07) иксодовых клещей.

**Видовой состав и численность иксодовых клещей на разных участках.** Все собранные с растительности имаго клещей принадлежали к виду *Ixodes persulcatus*. Численность клещей в окрестностях п. Половинка составила 17,2, в районе заброшенной шахты у п. Арково – 42,8 экз. на флаго-час и 32 экз. на флаго-час в ольхово-ивовых зарослях у побережья. Максимальная активность клещей на Сахалине

наблюдается в мае – первой половине июня и достигает в Александровск-Сахалинском районе более 50 экз. на флаго-час [2]. Видовой состав комаров не определен.

**Изучение сывороток крови населения.** Сероположительные сыворотки выявлены ко всем изучаемым патогенам. По результатам исследований иммунной прослойки населения района все сероположительные сыворотки распределены в две группы. В первую вошли пробы, реагирующие только с антигеном одного возбудителя, удельный вес которых составил (37,6±3,2) %. Во вторую – сыворотки, реагирующие перекрестно с антигенами двух и более возбудителей, их доля (40,3±3,2) %. Сравнение величины иммунной прослойки показало неодинаковую степень активности природных очагов различных инфекций. В общей структуре иммунной прослойки по результатам с антигеном к одному возбудителю преобладали сероположительные пробы на туляремию – (15,6±2,4) %, КЭ – (5,3±1,5) %, Батаи – (4,9±1,4) %, риккетсиоз – (3,1±1,1) %.

Образцы трех сывороток, сероположительных в РМАЛ на лептоспирозы серогрупп *Sejroe* и *Icterohaemorrhagiae*, исследованы методом ПЦР в реальном времени и nested-ПЦР. Из них в двух пробах в nested-ПЦР обнаружена ДНК патогенных лептоспир *Icterohaemorrhagiae* и *Sejroe*.

#### Исследование мелких млекопитающих

**Лептоспирозы.** При постановке nested-варианта ПЦР с объединенными пробами от грызунов получен один положительный результат, при расшифровке объединенной пробы положительно реагирующими оказались два смыва грудной полости от азиатских лесных мышей. В смыве от красной полевки выявлены антитела к лептоспирам серогруппы *Sejroe* в титре 1:80 (п. Половинка).

**Туляремия.** Органы грызунов исследовали постановкой биологической пробы на белых мышах – результат отрицательный. Антитела к возбудителю туляремии в РНГА у мелких млекопитающих не обнаружены. Отрицательные результаты указывают на низкий уровень эпизоотической активности природного очага туляремии в районе, хотя последние три случая заболевания туляремией в Александровск-Сахалинском районе отмечены в 2008 г.

**Иерсиниозы.** При бактериологическом исследовании грызунов получен отрицательный результат.

**Хантавирусы.** Результаты исследований показали наличие антигена хантавирусов у трех – (5,5±3,0) % и вирусспецифических антител у одной – (1,8±1,7) % особи азиатских лесных мышей (п. Половинка) В пробах легких РНК хантавирусов не обнаружена. Наши данные дополняют сведения о носителях хантавирусов на Сахалине – известно, что на территории области существуют активные природные очаги хантавирусов, связанные с грызунами лесных биотопов и серыми крысами в Южно-Сахалинске и Корсаковском, Анивском, Ногликском, Холмском, Макаровском, Поронайском, Смирныховском,

Тымовском, Долинском районах. Основными хозяевами вируса в природе являются красная, красно-серая и сахалинская полевки, у которых ранее выявляли антиген с частотой 0,5–4,3 % [2].

**Клещевой энцефалит.** При имеющемся количестве наблюдений нам не удалось обнаружить вирусспецифические антитела в смывах грудной полости мелких млекопитающих и антиген/РНК вируса в пробах мозга и в индивидуально исследованных клещах *I. persulcatus*. Отрицательный результат изучения таежных клещей, вероятно, указывает на низкую концентрацию антигена, не улавливаемого в ИФА. Известно, что в сахалинской популяции вируса КЭ преобладают слабовирулентные варианты. Вирус выделяли из таежных клещей, мышевидных грызунов и птиц (в том числе и в Александровск-Сахалинском районе). Считалось, что болезнь здесь протекает в легкой форме и регистрируется под другими диагнозами [2]. Эндемичными по КЭ являются 15 административных территорий области. Последний случай заболевания КЭ в Сахалинской области зарегистрирован в 1991 г. (с летальным исходом в 1986 г.), до 1991 г. в течение трех десятков лет зарегистрировано 18 случаев с тремя летальными исходами. По данным ФБУЗ «ЦГиЭ» в Сахалинской области (2009 г.), собранные с растительности в Александровск-Сахалинском районе клещи *I. persulcatus* (125 экз.) также не содержали антиген вируса. На основании полученных результатов и многолетнего отсутствия заболеваемости природный очаг КЭ в районе можно характеризовать как очаг с низким риском заражения для населения.

**Лихорадка Западного Нила.** Антиген вируса Западного Нила обнаружен в 8 – (14,8±4,7) % пробах от следующих млекопитающих: красная и красно-серая полевки (п. Арково), азиатская лесная мышь (пос. Половинка), красно-серая полевка (пос. Михайловка и район танкодрома). РНК вируса Западного Нила не обнаружена.

**Исследование искодовых клещей на боррелии и риккетсии.** Из 50 исследованных суспензий клещей методом ПЦР в 15 (30±6,1) % обнаружена ДНК боррелий комплекса *Borrelia burgdorferi sensu lato*. При исследовании в ПЦР 68 суспензий клещей на порядок Rickettsiales (16S РНК) выявлено 34 положительные пробы. Среди них 19 проб оказались положительными на род *Rickettsia* (ген *ompB*). Расшифрованы нуклеотидные последовательности (345 п.н.) семи положительных проб по гену *ompB*. Установлена высокая гомология (98–99 %) четырех образцов ДНК риккетсий с *Rickettsia helvetica*, выделенной в Швейцарии, и на 97 % с *Rickettsia canadensis*, выделенной в Японии. Окончательно их видовая принадлежность будет определена по результатам расшифровки нуклеотидной последовательности ДНК генов *ompA* и *gltA*, что позволит в дальнейшем определить их эпидемический потенциал и роль в инфекционной патологии.

В структуре заболеваемости природно-очаго-

выми болезнями ведущее место принадлежит ИКБ: в 2009 г. зарегистрировано 69 случаев, показатель заболеваемости составил 13,4 ‰ и в два раза превысил показатель по Российской Федерации. С 2007 г. наблюдается рост заболеваемости с 2,7 до 13,4. Наиболее высокие уровни заболеваемости зарегистрированы в Александровск-Сахалинском (60,5 ‰), Макаровском (22,4 ‰) и Холмском (22,3 ‰) районах. Число обращений жителей области с укусами клещей ежегодно растет и достигло в 2009 г. 2361.

**Исследование комаров на арбовирусы.** При исследовании в ИФА 20 пулов комаров на вирус Западного Нила антиген выявлен в трех (15±7,9) %, хотя РНК вируса не обнаружена. С целью изоляции арбовирусов проведено внутримозговое заражение НБМ суспензиями комаров. Из 20 пулов положительный результат получен в одном случае. На 7-е сутки после заражения НБМ наблюдали клинические проявления, характерные для КЭ. При последующем пассаже инкубационный период сократился до 3 сут. В суспензии мозга методом ИФА выявлен антиген, а в ОТ-ПЦР – РНК вируса КЭ. Вирулентность штамма для белых мышей массой 6–8 г составила при внутримозговом заражении 7,3 lg ЛД<sub>50</sub>/мл при подкожном – 5,6 lg ЛД<sub>50</sub>/мл, индекс инвазивности – 1,7. Заражение культуры клеток СПЭВ на 2–3-м пассажах показало наличие цитопатического эффекта.

Таким образом, на основании ретроспективного анализа заболеваемости, результатов эпизоотологического обследования и изучения популяционного иммунитета можно констатировать, что на территории района имеются природные очаги лептоспирозов, туляремии, инфекций, передающихся клещами – КЭ, ИКБ, КР, ГАЧ, МЭЧ, комарами – ЛЗН, Инко, Гета, Батаи, а также хантавирусов с разной степенью проявления их активности. Иммунная прослойка к этим возбудителям выявлена у населения района. Среди мелких млекопитающих установлена циркуляция возбудителей лептоспирозов, хантавирусов, вируса Западного Нила, подтвержденная находками генетического материала (лептоспирозы), сероположительными находками антител (лептоспирозы), антигена (вирус Западного Нила), антител и антигена (хантавирусы). Последующая расшифровка нуклеотидных последовательностей полного генома вируса КЭ, изолированного из комаров, позволит провести его окончательную идентификацию, получить новые данные о местной популяции вируса КЭ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андаев Е.И., Бахум С.В., Борисова Т.И., Титенко А.М., Ботвинкин А.Д., Вершинин Е.А., Немченко Л.С. Результаты серологических исследований на арбовирусы в районах Восточной Сибири, отличающихся по природно-климатическим условиям. *Бюл. ВСНЦ СО РАМН*. Иркутск. 2004; 1(2):16–21.
2. Дакус Н.И., редактор. Атлас природно-очаговых болезней Сахалинской области. Изд. 2-е. Хабаровск; 1998. 38 с.
3. Львов Д.К., Щербин Л.Д., Заиров Г.К., Артюхов Н.И., Львов С.Д., Шилов А.Д., Громашевский В.Л., Кондауров Е.К., Кондрашина Н.Г., Бутенко А.М., Морозова Т.Н., Кузнецов А.А., Скворцова Т.М. Изоляция Тягиня-подобного вируса (*Bunyaviridae*, *Bunyavirus*, комплекс Калифорнийского энцефа-

лита) на севере о. Сахалин. *Вопр. вирусол.* 1987; 5:588–90.

4. Львов Д.К., Клименко С.М., Гайдамович С.Я., Березина Л.К., Бутенко А.М., Громашевский В.Л., Дроздов С.Г., Коренберг Э.И., Львов С.Д., Сидорова Г.А., Скворцова Т.М., Ткаченко Е.А. Арбовирусы и арбовирусные инфекции. М.: Медицина; 1989. 336 с.

5. Львов Д.К., Дерябин П.Г., Аристова В.А., Бутенко А.М., Галкина И.В., Громашевский В.Л., Давыдова А.А., Колобухина Л.В., Львов С.Д., Щелканов М.Ю. Атлас распространения возбудителей природно-очаговых вирусных инфекций на территории Российской Федерации. М.: 2001. 185 с.

6. Jouglard S.D.D., Simionatto S., Seixas F.K., Nassi F.L., Dellagostin O.A. Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospire. Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospire. *Can. J. Microbiol.* 2006; 52:747–52.

#### References

1. Andaev E.I., Bakhum S.V., Borisova T.I., Titenko A.M., Botvinkov A.D., Vershinin E.A., Nemchenko L.S. [Results of serological investigations on Arboviruses in the territories of East Siberia, which are different in natural climatic conditions]. [*RAMS Siberian Branch, East Siberian Scientific Center Bulletin*]. Irkutsk. 2004; 1(2):16–21.

2. Dakus N.I., editor. [Atlas of Natural-Focal Infections in the Sakhalin Region]. 2<sup>nd</sup> edition. Khabarovsk; 1998. 38 p.

3. L'vov D.K., Shcherbin L.D., Zairov G.K., Artyukhov N.I., L'vov S.D., Shilov A.D., Gromashevsky V.L., Kondaurov E.K., Kondrashina N.G., Butenko A.M., Morozova T.N., Kuznetsov A.A., Skvortsova T.M. [Isolation of the Tyaginya-like virus (Bunyaviridae, Bunyavirus, California encephalitis complex) in the North of Sakhalin island]. *Vopr. Virusol.* 1987; 5:588–90.

4. L'vov D.K., Klimenko S.M., Gaidamovich S.Ya., Berезина Л.К., Бутенко А.М., Громашевский В.Л., Дроздов С.Г., Коренберг Э.И., Львов С.Д., Сидорова Г.А., Скворцова Т.М., Ткаченко Е.А. [Arboviruses and Arboviral Infections]. М.: Meditsina; 1989. 336 p.

5. L'vov D.K., Deryabin P.G., Aristova V.A., Butenko A.M., Galkina I.V., Gromashevsky V.L., Davydova A.A., Kolobukhina L.V., L'vov S.D., Shchelkanov M.Yu. [Atlas of Dissemination of Natural Focal Viral Infection

Agents in the Territory of the Russian Federation]. М.: 2001. 185 p.

6. Jouglard S.D.D., Simionatto S., Seixas F.K., Nassi F.L., Dellagostin O.A. Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospire. Nested polymerase chain reaction for detection of pathogenic leptospire. *Can. J. Microbiol.* 2006; 52:747–52.

#### Authors:

Andaev E.I., Chesnokova M.V., Borisova T.I., Vershinin E.A., Tatarnikov S.A., Breneva N.V., Mazepa A.V., Adel'shin R.V., Khudchenko S.E., Sidorova E.A., Mel'nikova O.V., Trushina Yu.N., Klimov V.T. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Darizhapov B.B., Tin T.K. Rosпотребнадзор Administration in the Sakhalin Region. 30-A, Chekhov St., Yuzhno-Sakhalinsk, 693020, Russian Federation. E-mail: sakhnadzor@sakhalin.ru

Legeida N.I., Im En Ok E.A. Center of Hygiene and Epidemiology in the Sakhalin Region. 45, Khabarovskaya St., Yuzhno-Sakhalinsk, 693020, Russian Federation. E-mail: sakhfguz@sakhfguz.ru

#### Об авторах:

Андаев Е.И., Чеснокова М.В., Борисова Т.И., Вершинин Е.А., Татарников С.А., Бренева Н.В., Мазепа А.В., Адельшин Р.В., Худченко С.Э., Сидорова Е.А., Мельникова О.В., Трушина Ю.Н., Климов В.Т. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Дарижапов Б.Б., Тин Т.К. Управление Роспотребнадзора по Сахалинской области. Российская Федерация, 693020, г. Южно-Сахалинск, ул. Чехова, 30-А. E-mail: sakhnadzor@sakhalin.ru

Легида Н.И., Им Эн Ок Е.А. Центр гигиены и эпидемиологии в Сахалинской области. Российская Федерация, 693020, г. Южно-Сахалинск, ул. Хабаровская, д. 45. E-mail: sakhfguz@sakhfguz.ru

Поступила 01.07.13.

Н.Ф.Василенко<sup>1</sup>, А.В.Ермаков<sup>2</sup>, О.В.Малецкая<sup>1</sup>, А.Н.Куличенко<sup>1</sup>

## ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ОБСТАНОВКА ПО ТРАНСМИССИВНЫМ ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫМ ИНФЕКЦИЯМ В РЕГИОНЕ КАВКАЗСКИХ МИНЕРАЛЬНЫХ ВОД

<sup>1</sup>ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация; <sup>2</sup>Управление Роспотребнадзора по Ставропольскому краю, Ставрополь, Российская Федерация

Представлен анализ эпидемиологической обстановки по трансмиссивным природно-очаговым инфекциям в особо охраняемом эколого-курортном регионе России – Кавказских Минеральных Водах Ставропольского края. Климатические особенности Кавказских Минеральных Вод с их ландшафтным разнообразием, обилием иксодовых клещей и комаров, процессами антропогенного влияния на экосистемы создают благоприятные условия для формирования природных очагов трансмиссивных инфекций. Наибольшее эпидемиологическое значение в инфекционной патологии региона имеет иксодовый клещевой боррелиоз. Регистрация заболеваний Крымской геморрагической лихорадкой, лихорадкой Западного Нила (ретроспективно), туляремией, выявление специфических антител в сыворотках крови доноров к возбудителям этих инфекций свидетельствуют о нестабильной эпидемиологической обстановке по трансмиссивным природно-очаговым инфекциям в регионе Кавказских Минеральных Вод, что указывает на необходимость дальнейшего проведения экологического, эпизоотологического и эпидемиологического мониторинга, являющегося составной частью эпидемиологического надзора, направленного на обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

*Ключевые слова:* трансмиссивные природно-очаговые инфекции, эпидемиологическая обстановка, иксодовый клещевой боррелиоз, Крымская геморрагическая лихорадка, лихорадка Западного Нила, клещевой энцефалит, туляремия.

N.F.Vasilenko<sup>1</sup>, A.V.Ermakov<sup>2</sup>, O.V.Maletskaya<sup>1</sup>, A.N.Kulichenko<sup>1</sup>

### Epidemiological Situation on Vector-Borne Natural-Focal Infections in the Territory of Caucasian Mineral Waters

<sup>1</sup>Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation; <sup>2</sup>Rospotrebnadzor Administration in the Stavropol Territory, Stavropol, Russian Federation

Represented is the analysis of epidemiological situation on vector-borne natural-focal infections in the specially protected eco-resort territory of Russia – Caucasian Mineral Waters of the Stavropol Region. Climatic peculiarities of Caucasian Mineral Waters with their landscape diversity, high abundance rates of ticks and mosquitoes, and anthropogenic impact on ecosystems create favorable conditions for natural foci formation. Crucial epidemiological significance in the regional infectious pathology is attributed to tick-borne borreliosis. Registration of Crimean hemorrhagic fever cases, as well as West Nile (retrospectively) fever and tularemia cases, and identification of specific antibodies to etiological agents of these infections in blood sera of donors testify to volatile epidemiological situation on vector-borne natural-focal infections in the region, which means that there is a need for further ecological, epidemiological and epizootiological monitoring as a constituent element of epidemiological surveillance aimed at provision of sanitary-epidemiological welfare of the population.

*Key words:* vector-borne natural-focal infections, epidemiological situation, tick-borne borreliosis, Crimean hemorrhagic fever, West-Nile fever, tick-borne encephalitis, tularemia.

Регион Кавказских Минеральных Вод (КМВ) занимает южную часть Ставропольского края и расположен на северных склонах Главного Кавказского хребта. Южные границы региона – это предгорья Эльбруса, долина рек Хасаут и Малки; на западе – верховья рек Эшакона и Подкумка; северной границей служит город Минеральные Воды. В ландшафтном отношении территория делится на равнинную степную, в основном распаханную часть, предгорную, низкогорную и частично среднегорную часть Большого Кавказа, расчлененную глубокими долинами и ущельями [8].

Проблема болезней, переносчиками которых являются кровососущие членистоногие, в последние годы приобретает все большее значение для многих регионов России, в том числе и для Ставропольского края [1, 2, 5]. Климатические особенности КМВ с их

ландшафтным разнообразием, обилием иксодовых клещей и комаров, процессами антропогенного влияния на экосистемы создают благоприятные условия для формирования природных очагов трансмиссивных инфекций. В связи с тем, что КМВ являются уникальным, особо охраняемым эколого-курортным регионом Российской Федерации, это обуславливает повышенные требования к обеспечению противоэпидемической безопасности населения.

Целью данной работы является оценка современной эпидемиологической обстановки по трансмиссивным природно-очаговым инфекциям в регионе Кавказских Минеральных Вод Ставропольского края.

### Материалы и методы

При изучении эпидемиологической обстанов-

ки использовались ежегодные данные о количестве больных и уровне заболеваемости различными нозологическими формами, отраженные в форме № 2 государственной статистической отчетности «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» и данные, представленные в государственных докладах «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Ставропольском крае». Специфические антитела в сыворотках крови доноров выявляли с помощью иммуноферментных тест-систем производства ЗАО «ВекторБест» (п. Кольцово, Новосибирской обл.). Создание карт проводили при помощи ГИС-технологий, используя программу ArcGIS 10.1.

### Результаты и обсуждение

Одной из наиболее актуальных проблем здравоохранения в регионе КМВ Ставропольского края является эпидемиологическая обстановка по иксодовому клещевому боррелиозу (ИКБ) [4, 7]. В период с 2007 по 2012 год на территории КМВ зарегистрированы 107 случаев заболеваний ИКБ на пяти административных территориях региона: в Георгиевском и Предгорном районах, городах Кисловодске, Пятигорске и Железноводске (табл. 1). Наиболее неблагоприятной территорией является Кисловодск, где зарегистрированы 72 случая ИКБ, что составило 67,3 % от всего числа больных на территории КМВ. Заболеваемость ИКБ отмечалась с февраля по ноябрь. Пик заболеваемости наблюдался в июле–августе. Основную массу больных составляли взрослые – 90,2 %, на долю детей пришлось 9,8 %.

В 2012 г. отмечена стабилизация заболеваемости ИКБ: в регионе КМВ зарегистрирован 21 случай заболевания (в 2011 г. – 33 случая). Показатель заболеваемости составил 0,86 на 100 тыс. населения, что на 43,9 % ниже уровня 2011 г. (1,53). Наиболее неблагоприятной территорией, как и в предыдущие годы, является Кисловодск, где зарегистрировано 15 больных ИКБ, что составило 65,2 % от всех случаев по Ставропольскому краю. Относительно высокий уровень выявления заболеваний связан с хорошо организованной информационно-разъяснительной работой, что способствует своевременному обращению населения и отдыхающих с укусами клещей в лечебно-профилактические учреждения, а также с

улучшением качества лабораторной диагностики болезней. Вместе с тем число пострадавших от нападения клещей в Кисловодске остается намного больше, чем в других курортных местах КМВ, что повышает требования к эффективности проводимой неспецифической профилактики.

Серологическое исследование сывороток крови доноров позволило выявить иммунную прослойку к возбудителю ИКБ у жителей региона КМВ. Из 294 проб 19 (6,5 %) дали положительный результат.

Особый интерес анализу эпидемиологической обстановки в Ставропольском крае придает возникновение здесь ситуации, когда на протяжении 14 лет (1999–2012 гг.) ежегодно регистрируются случаи заболевания Крымской геморрагической лихорадкой (КГЛ). За этот период КГЛ заболели 572 человека (23 из них умерли), что составило 36,3 % от общего числа больных, выявленных в ЮФО и СКФО [3, 6].

В период с 2000 по 2008 год на территории трех районов, входящих в состав КМВ, зарегистрированы 14 случаев заболеваний КГЛ. Случаи заболевания КГЛ регистрировались в период с мая по июль, что соответствует сезонности этой болезни. Наибольшее число больных КГЛ отмечено в Георгиевском районе – 50 % от всех заболевших, 42,9 % больных заразились возбудителем КГЛ в Минераловодском районе, один больной (7,1 %) проживал в Предгорном районе. С 2008 г. и по настоящее время больные КГЛ в регионе КМВ не регистрировались. Это связано с качественным и своевременным проведением акарицидных обработок эндемичных по КГЛ территорий и скота, а также соблюдением населением мер индивидуальной защиты от нападения иксодовых клещей в природных биотопах.

Изучение уровня иммунной прослойки позволило обнаружить специфические антитела к вирусу ККГЛ в сыворотках крови доноров, проживающих на территории КМВ. Из 290 исследованных образцов 14 (4,8 %) дали положительный результат.

На отдельных административных территориях региона регистрируются случаи заболевания туляремией. Так, в 2004 г. один случай заболевания туляремией зарегистрирован в станице Александровской Георгиевского района. С 2005 по 2011 год случаи заболевания туляремией в регионе КМВ не отмечались. В 2012 г. зарегистрированы 9 случаев заболевания туляремией (в 2011 г. – 1) на 5 административных территориях края, два из которых (22,2 % от всего числа заболевших в крае) в Предгорном районе, входящем в состав региона КМВ. Показатель заболеваемости составил 0,33, что выше на 87,9 % показателя 2011 г. Заболеваемость туляремией в 2012 г. имела 2-волновую сезонность: подъемы в декабре–марте и июне–июле.

В 2010 г. в Кисловодске был зарегистрирован один случай заболевания лихорадкой Ку. Эпидемиологическое расследование показало, что этот случай был заносный. Человек проживал в ауле Учккен Карачаево-Черкесской республики, госпи-

Таблица 1

Число больных иксодовым клещевым боррелиозом в регионе КМВ Ставропольского края (2007–2012 гг.)

Административная территория	2007 г.	2008 г.	2009 г.	2010 г.	2011 г.	2012 г.	Итого
Георгиевский район	0	1	0	0	0	0	1
Предгорный район	0	1	0	0	0	0	1
Железноводск	2	0	1	2	1	0	6
Кисловодск	3	5	10	11	28	15	72
Пятигорск	6	2	6	3	4	6	27
<i>Итого</i>	11	9	17	16	33	21	107

тализирован был в Кисловодске, где и была диагностирована лихорадка Ку.

Особого внимания заслуживают данные о выявлении в сыворотках крови жителей Ставропольского края специфических антител к возбудителям клещевого энцефалита и лихорадки Западного Нила (ЛЗН). До настоящего времени случаи заболевания людей клещевым энцефалитом на территории края не регистрировались. Однако впервые при проведении серологических исследований в сыворотках крови людей (доноров), проживающих в лесостепной и предгорной зонах региона КМВ, выявлены специфические антитела к вирусу клещевого энцефалита (ВКЭ). На наличие специфических антител класса G (IgG) исследовано 294 образца. Положительные результаты получены в 6 пробах (2 %). Три пробы выявлены у доноров из Минераловодского района, по одной – из городов Пятигорск, Железноводск и Ессентуки. Титры специфических антител составили от 1:200 до 1:3200.

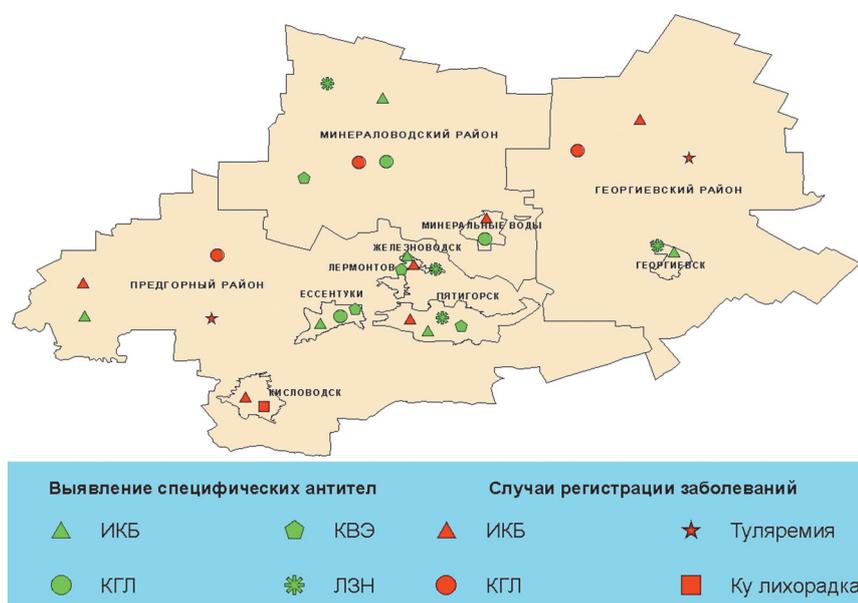
Эти же образцы сывороток крови доноров исследованы на наличие специфических IgG к вирусу Западного Нила (ВЗН). Исследования на IgG к ВЗН проводили в два этапа. Сначала методом ИФА определяли наличие антител класса G, которые появляются у больных ЛЗН уже на 4–5-й день болезни. Далее, при положительном результате, измеряли avidность специфических к вирусу ЗН IgG, позволяющую определить период времени, прошедший после первичного инфицирования. Так, IgG, нарабатанные в первые 3–5 мес. после первичного инфицирования, имели низкую avidность, в то время как IgG в более поздние сроки показывали высокую. Затем определяли критическую оптическую плотность (ОП) и индекс avidности по отношению ОП денатурирующего ИФА к ОП прямого ИФА (согласно инструкции по применению тест-системы). Если индекс avidности составляет менее 50 %, то исследуемая сыворотка крови содержит низкоавидные антитела, что указывает на текущую, либо недавно перенесенную ин-

фекцию (заболевание было 2–3 мес. назад). Если же индекс avidности более 70 %, то сыворотка крови содержит высокоавидные антитела, что свидетельствует о паст-инфекции.

При исследовании 294 сывороток крови доноров выявлены 12 (4,1 %) положительных на наличие IgG к ВЗН, из них в Минераловодском районе 9 проб, по одной пробе в городах Пятигорск, Железноводск и Георгиевск. В 2010 г. при определении индекса avidности оказалось, что в 4 пробах сывороток крови доноров из Минераловодского района выявлены IgG к ВЗН в высоких титрах (1:6400–1:51200). При исследовании положительных проб на avidность установлено, что высокотитражные сыворотки крови содержали низкоавидные антитела (индекс avidности 36–40 %), свидетельствующие о недавно перенесенной болезни. В 2012 г. из трех положительных образцов низкоавидные антитела содержали два – по одному из Железноводска и Георгиевска с титрами антител 1:51200 и 1:1600 соответственно.

В связи с тем, что возбудитель ЛЗН относится так же, как и вирус клещевого энцефалита, к экологической группе арбовирусов, семейству *Flaviviridae*, роду *Flavivirus*, и между ними возможны перекрестные реакции, все положительные на анти-ВЗН пробы сывороток крови доноров были исследованы на наличие специфических антител к вирусу клещевого энцефалита. В одном случае наблюдался положительный результат на КЭ и ЛЗН, только титр антител к вирусу ЗН был в 64 раза выше, поэтому образец оценен как положительный на ЛЗН (табл. 2). Полученные нами данные свидетельствуют о шести не диагностированных случаях заболевания ЛЗН в Ставропольском крае на территории КМВ: четыре – в 2010 г. и два – в 2012 г. (во время эпидемических подъемов заболеваемости ЛЗН в Российской Федерации).

Таким образом, из вышеизложенного следует, что эпидемиологическую обстановку по трансмиссивным природно-очаговым инфекциям следует оце-



Выявление случаев заболевания трансмиссивными природно-очаговыми инфекциями и специфических антител в сыворотках крови доноров в регионе КМВ. Периоды: выявление антител – 2010–2012 гг.; регистрация заболеваний: ИКБ – 2007–2012 гг., КГЛ – 2000–2008 гг., туляремия – 2004–2012 гг., Ку лихорадка – 2010 г.

Таблица 2

## Выявление иммунной прослойки населения к вирусам КЭ и ЗН (2010–2012 гг.)

Административная территория	IgG к ВКЭ	Величина титров	IgG к ВЗН	Величина титров
Минераловодский район	3	1:200–1:3200	9	1:1600–1:51200
Пятигорск	1		1	
Железноводск	1		1	
Ессентуки	1		0	
Георгиевск	0		1	
<i>Итого</i>	6 (2%)		12 (4,1%)	

нить как нестабильную (рисунок), что указывает на необходимость проведения экологического, эпизоотологического и эпидемиологического мониторинга, являющегося составной частью эпидемиологического надзора, направленного на обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Варфоломеева Н.Г., Ермаков А.В., Василенко Н.Ф., Шкарлет Г.П., Малецкая О.В., Кирейцева О.А., Заикина И.Н., Куличенко А.Н. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым вирусным инфекциям на территории Ставропольского края. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 2(108):16–8.
2. Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Тохов Ю.М., Варфоломеева Н.Г., Кирейцева О.А., Харченко Т.В., Ермаков А.В., Куличенко А.Н. Эпидемиологическая обстановка по Крымской геморрагической лихорадке на Юге России в 2010 г. и прогноз на 2011 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 1(107):13–5.
3. Василенко Н.Ф., Смоленский В.Ю., Вольнкина А.С., Варфоломеева Н.Г., Заикина И.Н., Малецкая О.В., Ашибиков У.М., Тохов Ю.М., Ермаков А.В., Куличенко А.Н. Особенности эпидемиологической обстановки по Крымской геморрагической лихорадке в Российской Федерации в 2011 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 1(111):22–5.
4. Ермаков А.В., Василенко Н.Ф., Варфоломеева Н.Г., Кирейцева О.А., Вольнкина А.С., Заикина И.Н., Малецкая О.В., Куличенко А.Н. Иммунологический мониторинг за трансмиссивными природно-очаговыми инфекциями на территории Кавказских Минеральных Вод. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2012; 1(25):43–6.
5. Малецкая О.В., Бейер А.П., Агапитов Д.С., Харченко Т.В., Таран А.В., Татан Т.В., Исмаилова Г.К., Чумакова И.В., Василенко Н.Ф., Куличенко А.Н., Пакскина Н.Д., Скударева О.Н., Яценко Е.В. Эпидемическая ситуация по Крымской геморрагической лихорадке в Южном федеральном округе. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2009; 6:51–4.
6. Малецкая О.В., Харченко Т.В., Брюханова Г.Д., Бейер

А.П., Василенко Н.Ф., Антоненко А.Д., Куличенко А.Н. Эпидемическая ситуация и заболеваемость Крымской геморрагической лихорадкой в Южном федеральном округе. *Здоровье населения и среда обитания*. 2010; 5(206): 35–7.

7. Орлова Т.Н., Василенко Н.Ф., Афанасьев Е.Н., Чумакова И.В., Санникова И.В., Куличенко А.Н. Изучение циркуляции возбудителя Лайм-боррелиоза в Ставропольском крае. *Пробл. особо опасных инф.* 2008; 2(96):20–2.

8. Романов А.А., Саакянц Р.Г. География туризма. М.: Советский спорт. 2004. 44 с.

## References

1. Varfolomeeva N.G., Ermakov A.V., Vasilenko N.F., Shkarlet G.P., Maletskaya O.V., Kireitseva O.A., Zaikina I.N., Kulichenko A.N. [Epidemiological situation on natural focal viral infections in the territory of the Stavropol region]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 2(108):16–8.
2. Vasilenko N.F., Maletskaya O.V., Tokhov Yu.M., Varfolomeeva N.G., Kireitseva O.A., Kharchenko T.V., Ermakov A.V., Kulichenko A.N. [Epidemiological situation of Crimean-Congo hemorrhagic fever (CCHF) in the South of Russia in 2010 and prognosis for the year of 2011]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 1(107):13–5.
3. Vasilenko N.F., Smolensky V.Yu., Volynkina A.S., Varfolomeeva N.G., Zaikina I.N., Maletskaya O.V., Ashibikov U.M., Tokhov Yu.M., Ermakov A.V., Kulichenko A.N. [Peculiar aspects of epidemiological situation on Crimean hemorrhagic fever in the Southern Federal district in 2011]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 1(111):22–5.
4. Ermakov A.V., Vasilenko N.F., Varfolomeeva N.G., Kireitseva O.A., Volynkina A.S., Zaikina I.N., Maletskaya O.V., Kulichenko A.N. [Immunological monitoring over vector-borne natural-focal infections in the territory of Caucasian Mineral Waters]. *Med. Vestnik Severnogo Kavkaza*. 2012; 1(25):43–6.
5. Maletskaya O.V., Beyer A.P., Agapitov D.S., Kharchenko T.V., Taran A.V., Tatan T.V., Ismailova G.K., Chumakova I.V., Vasilenko N.F., Kulichenko A.N., Pakschina N.D., Skudareva O.N., Yatsmenko E.V. [Epidemic situation on Crimean hemorrhagic fever in the Southern Federal district]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2009; 6:51–4.
6. Maletskaya O.V., Kharchenko T.V., Bryukhanova G.D., Beyer A.P., Vasilenko N.F., Antonenko A.D., Kulichenko A.N. [Epidemic situation and morbidity rates on Crimean hemorrhagic fever in Southern Federal district]. *Zdor. Nas. Sreda Obit.* 2010; 5(206):35–7.
7. Orlova T.N., Vasilenko N.F., Afanasiev E.N., Chumakova I.V., Sannikova I.V., Kulichenko A.N. [Studying the circulation of etiological agent of Lyme borreliosis in Stavropol Region]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2008; 2(96):20–2.
8. Romanov A.A., Saakyants R.G. [Geography of Tourist Travel]. M.: Sovetskii sport; 2004. 44 p.

## Authors:

Vasilenko N.F., Maletskaya O.V., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru  
Ermakov A.V. Rospotrebnadzor Administration in the Stavropol Territory. Stavropol, Russian Federation.

## Об авторах:

Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Ермаков А.В. Управление Роспотребнадзора по Ставропольскому краю. Российская Федерация, Ставрополь.

Поступила 07.04.14.

А.К.Гражданов<sup>1</sup>, Т.З.Аязбаев<sup>2</sup>, А.В.Топорков<sup>1</sup>, Ф.Г.Бидашко<sup>2</sup>, А.В.Захаров<sup>2</sup>, Л.Б.Белоножкина<sup>2</sup>,  
М.В.Пак<sup>2</sup>, А.В.Андрющенко<sup>2</sup>

## О ВЫЯВЛЕНИИ НОВЫХ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ АКТУАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ НА ЗАПАДЕ КАЗАХСТАНА

<sup>1</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; <sup>2</sup>ГУ «Уральская противочумная станция» Комитета госсанэпиднадзора Минздрава Республики Казахстан, Уральск, Республика Казахстан

В период 2000–2011 гг. на западе Казахстана выявлено пять новых для этих территорий природных очагов опасных инфекционных болезней: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, Астраханская пятнистая лихорадка, Крымская геморрагическая лихорадка, лихорадка Западного Нила, клещевой вирусный энцефалит. Здесь сформировались основные экологические факторы для укоренения этих инфекций в местных биоценозах. Характерно, что циркуляция возбудителей новых инфекционных болезней установлена на территории давно существующих природных очагов чумы и туляремии. С 2000 г. в Западно-Казахстанской области систематически регистрируется заболеваемость геморрагической лихорадкой с почечным синдромом. Имеются сведения о выявлении в России в 2012 г. больных лихорадкой Западного Нила, прибывших из Казахстана. По пространственному размещению природных очагов разных инфекций территория Западно-Казахстанской области разделена на четыре региона. В целях эффективной профилактики новых болезней необходимо укрепление инфекционной службы и совершенствование эпидемиологического надзора с учетом современных условий.

*Ключевые слова:* новые природные очаги инфекционных болезней, эпизоотологическое обследование, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, Астраханская пятнистая лихорадка, Крымская геморрагическая лихорадка, лихорадка Западного Нила, клещевой вирусный энцефалит.

A.K.Grazhdanov<sup>1</sup>, T.Z.Ayazbaev<sup>2</sup>, A.V.Toporkov<sup>1</sup>, F.G.Bidashko<sup>2</sup>, A.V.Zakharov<sup>2</sup>, L.B.Belonozhkina<sup>2</sup>, M.V.Pak<sup>2</sup>,  
A.V.Andryushchenko<sup>2</sup>

## Concerning the Allocation of Emerging Natural Foci of the Currently Important Infectious Diseases in the West of Kazakhstan

<sup>1</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; <sup>2</sup>Uralsk Plague Control Station of Gossanepidnadzor Committee of the Ministry of Health in the Republic of Kazakhstan, Uralsk, Republic of Kazakhstan

Within the period of 2000–2011, in the West of Kazakhstan, identified have been five, previously unknown in the territory, natural foci of dangerous infectious diseases such as hemorrhagic fever with renal syndrome, Astrakhan spotty fever, Crimean hemorrhagic fever, West Nile fever, and tick-borne viral encephalitis. The reason is that key ecological factors for the persistence of the infections in the local biocoenoses occurred. It is characteristic that circulation of the agents of new infectious diseases is registered in the territory of the long-established natural plague and tularemia foci. Since 2000 and on, hemorrhagic fever with renal syndrome morbidity is registered in the Western-Kazakhstan Region on a regular basis. There is some evidence to identification of West Nile fever patients in the territory of Russia in 2012, which came from Kazakhstan. Based on the spatial distribution of the natural foci of various infections, Western-Kazakhstan Region has been subdivided into four areas. In order to provide for the effective prophylaxis of emerging diseases, it is essential that healthcare facilities and services dealing with infectious diseases are consolidated and reinforced, and epidemiological surveillance is improved with the current conditions in mind.

*Key words:* emerging natural foci of infectious diseases, epizootiological surveillance, hemorrhagic fever with renal syndrome, Astrakhan spotty fever, Crimean hemorrhagic fever, West Nile fever, tick-borne viral encephalitis.

Западный Казахстан, простираясь по обе стороны р. Урал между Европой и Азией, охватывает значительную площадь Прикаспийской низменности. Буферный характер этой территории формирует особую среду обитания для растений и животных, создающих благоприятные условия для существования природно-очаговых инфекций. Центральную часть Западного Казахстана занимает Западно-Казахстанская область (ЗКО), 75 % территории которой составляют известные с 1913 г. природные очаги чумы. По всей области распространены природные очаги туляремии (открыты в 1928 г.). Почти ежегодно здесь регистрируются эпизоотии чумы и туляремии. В самые последние годы на территории ЗКО

начали выявлять ранее неизвестные для этих мест природно-очаговые инфекции.

**Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС).** Первые в Казахстане случаи заболевания ГЛПС обнаружены нами и лабораторно подтверждены в 2000 г. у жителей поселка Жарсуат Бурлинского района ЗКО. В 2001 г. здесь выявлены инфицированные хантавирусом дикие грызуны [1]. Было организовано постоянное наблюдение за состоянием здоровья населения и проведено многолетнее эпизоотологическое обследование на ГЛПС.

В итоге установлено, что на севере ЗКО в пойме среднего течения р. Урал и ее притоков сформировался природный очаг ГЛПС, который непосредственно

граничит с Оренбургской областью, эндемичной по этой инфекции. Природный очаг ГЛПС, получивший название Урало-Илекский (Казахстанский), занимает площадь 54231 км<sup>2</sup> и включает территории девяти административных районов. Зарегистрирована зараженность хантавирусом одиннадцати видов мелких млекопитающих: рыжая полевка, обыкновенная полевка, малая лесная мышь, домовая мышь, обыкновенная бурозубка, малая белозубка, мышь малютка, желтогорлая мышь, водяная полевка, степная пеструшка и общественная полевка. С 2001 по 2011 год исследовано на ГЛПС 49676 мелких млекопитающих. Антиген вируса ГЛПС выявлен у 758 зверьков, в т.ч. у 433 рыжих полевок, 128 обыкновенных полевок, 116 малых лесных мышей, 45 домовых мышей и 37 других млекопитающих. В сумме от четырех видов грызунов получено 95,1 % положительных результатов. Следовательно, рыжая и обыкновенная полевки, малая лесная и домовая мыши, составляющие наибольшую массу населения мелких млекопитающих, играют основную роль в циркуляции и сохранении возбудителя ГЛПС в природе. Периодическая активизация природного очага связана с обусловленными благоприятной погодой подъемами численности рыжей полевки, являющейся основным источником заражения людей. Отмечены два пика сезонного повышения активности природного очага: весной и осенью. Наряду с обследованием открытых биотопов, отлов мелких млекопитающих осуществлялся и в населенных пунктах. За период 2001–2010 гг. пойманы 3152 особи восьми видов, среди которых доминировали домовые мыши (93,4 %). У 0,6 % пойманных в поселках домовых мышей установлен хантавирусный антиген. В сборах из населенных пунктов было всего 33 рыжих полевки, но с наиболее высоким уровнем зараженности хантавирусом (15,2 %). Среди добытых в жилых домах 45 малых белозубок у одной выявлен антиген вируса ГЛПС.

Изучены особенности годовой динамики эпизоотического процесса в природном очаге ГЛПС с участием рыжей полевки и других грызунов, играющих основную роль в энзоотии. Эпизоотический цикл у рыжей полевки начинается в июне. Постепенное нарастание его активности происходит вплоть до января, а затем наступает снижение. Большая часть пойманных рыжих полевок приходится на холодные месяцы года (октябрь–январь), и в это же время наблюдается их высокая зараженность. Значит, в осенне-зимний период возбудитель ГЛПС сохраняется в популяциях рыжих полевок, а их высокая сезонная подвижность вызывает обострение эпизоотии и существенно повышает вероятность заражения людей. У остальных трех видов (обыкновенная полевка, малая лесная и домовая мыши), напротив, наиболее высокая активность наблюдается в летнее время, и в этот же период фиксируется наибольшая доля зараженных хантавирусом особей. Дальнейшие расчеты показали совпадение годовой динамики уровня заболеваемости населения ГЛПС и зараженности

хантавирусом рыжей полевки в природе, что демонстрирует особую эпидемиологическую роль этого грызуна. Обыкновенная полевка, малая лесная и домовая мыши, участвуя в эпизоотическом процессе, обеспечивают трансмиссию возбудителя через летний сезон, чем поддерживают стабильность очага на протяжении года и в многолетнем аспекте. Получено экологическое обоснование эпидемиологической закономерности множественного заражения людей в осенне-зимний период в природном очаге, обусловленное особенностями биологии рыжей полевки.

За период наблюдения с 2000 по 2011 год в ЗКО было зарегистрировано 200 случаев заболевания людей ГЛПС, один с летальным исходом. За этот же период заболеваемость трижды принимала вспышечный характер с числом больных от 27 до 100 случаев в год. Наибольший уровень заболеваемости ГЛПС в ЗКО имел место в 2005 г., когда показатель составил 16,49 на 100 тыс. населения. Спорадические заболевания людей регистрируются в течение всего года, но массовые – только в осенне-зимний период (октябрь–январь) с ярко выраженным пиком в ноябре–декабре. Клинические формы с тяжелым течением болезни отмечались у 45,9 % пациентов, средней степени тяжести – у 46,9 %, легкое течение – у 7,1 %. Изучены проявления острой почечной недостаточности (ОПН) у 158 больных ГЛПС. Полученные данные позволяют прогнозировать в условиях ЗКО развитие ОПН у 86 % больных, причем в 52 % случаев ОПН протекает в олигоанурической форме [4]. Установлены краевые особенности пороговых значений показателей заболеваемости. Так, ординарная заболеваемость ГЛПС в ЗКО составляет 15 случаев в год, а верхний пороговый предел заболеваемости находится на уровне 30 случаев в год [5]. Показана этиологическая роль хантавируса серотипа Пуумала, который обнаружен у людей и грызунов. Основными местами заражения людей являются лесные массивы поймы р. Урал (лесной тип). Среди больных преобладали жители сельской местности (84,7 %). В настоящее время заболеваемость ГЛПС заняла ведущее место в ЗКО среди природно-очаговых инфекций.

Периодически проводилось целевое обследование населения на наличие иммунной прослойки к возбудителю ГЛПС. Выборочно обследованы жители нескольких поселков, расположенных в зоне природной очаговости этой инфекции. Для изучения отбирали лиц, имеющих в анамнезе лихорадочные заболевания неясной этиологии, а также систематически посещающих лес. Все обследуемые были разбиты на две группы: опытную и контрольную. В опытную группу вошли жители поселков поймы р. Урал, в окружении которых была зарегистрирована высокая инфицированность хантавирусом рыжей полевки и где систематически обнаруживали больных ГЛПС. Для контроля обследовали жителей поселков, в окрестностях которых рыжая полевка отсутствовала, а зараженными ГЛПС находили других мелких млекопитающих, заболевания людей здесь никогда не выявляли. В опытной группе

была исследована сыворотка крови 434 чел. в возрасте от 10 до 70 лет. У 40 из них выявлены специфические антитела к вирусу ГЛПС (9,2 %). В контрольной группе на наличие антител к вирусу ГЛПС исследовано 187 чел., положительных результатов не получено. В итоге лабораторного скрининга установлено, что почти у каждого десятого жителя поселков, где постоянно регистрируются больные, сформировался иммунитет к ГЛПС. В то же время контакты населения с вирусом ГЛПС отсутствуют на энзоотической территории, где рыжая полевка не обитает. Полученные материалы подтверждают наличие определенной доли бессимптомных и легких форм заболеваний ГЛПС и еще раз свидетельствуют об исключительном значении рыжей полевки в эпидемиологии ГЛПС на этой территории.

Учитывая определяющую эпидемиологическую роль рыжей полевки, территория природного очага ГЛПС разделена на два района. Первый – эпидемиологически опасный, занимает водосборную часть поймы Урала, где обитает рыжая полевка и отмечены все случаи заболеваний людей. Второй расположен на севере Прикаспийской низменности, где рыжая полевка отсутствует, а носителями хантавируса являются другие мелкие млекопитающие.

Отмечена тенденция к расширению очаговой территории. Так, впервые в 2008 г. хантавирусный антиген был обнаружен у обыкновенных полевок на территории соседней Актюбинской области Республики Казахстан. В 2009 г. зарегистрированы положительно реагирующие на ГЛПС грызуны на новой территории в Казталовском районе в центре ЗКО.

В результате исследований установлена пространственная и биоценотическая структура природного очага ГЛПС, что позволяет с учетом оперативных данных составлять эпидемиологические прогнозы и планировать профилактические мероприятия.

**Астраханская пятнистая лихорадка (АПЛ)** впервые установлена в Астраханской области и является новой нозологической формой инфекционного заболевания [11]. В 2004 г. при эпизоотологическом обследовании территории Жангалинского района ЗКО впервые в Казахстане обнаружена спонтанная зараженность клещей *Rhipicephalus pumilio* возбудителем Астраханской пятнистой лихорадки. Из групповых проб этих клещей, собранных с домашних животных, было выделено два штамма возбудителя АПЛ, которые после дополнительного исследования и проведенного секвенирования идентифицированы как *Rickettsia conorii subsp. caspia* [10]. Данный вид риккетсий впервые в России был определен в 1990-е годы в крови больных людей и клещах *R. pumilio* в Астраханской области, где клещи этого вида являются резервуаром и переносчиком возбудителя АПЛ, а их прокормителями служат зайцы, ежи, собаки и домашний скот.

С целью выяснения особенностей циркуляции возбудителя АПЛ, а также возможности укоренения этой инфекции в местных биоценозах были проведены специальные исследования. Рассматриваемый

регион занимает северо-восточную часть Волго-Уральских песков. Основным видом хозяйственной деятельности местного населения является животноводство. Население содержит коров, овец и других домашних животных. Почти в каждом дворе имеются собаки. Наиболее многочисленным видом клещей здесь является *R. pumilio*. Выявлена высокая численность и доминирующее положение этих клещей на собаках и зайцах [2].

В мае–июне 2007 г. проведено эпизоотологическое обследование на АПЛ пастбищных клещей, собранных с домашних животных из личных хозяйств. Всего обследовано 18 населенных пунктов, расположенных в Жангалинском районе ЗКО и в Исатайском районе Атырауской области Казахстана. Осмотрено 218 сельскохозяйственных животных, собак, кошек и один еж, с них собрано 978 клещей пяти видов. Широко распространенными здесь являются клещи *R. pumilio*, индекс доминирования которых составляет 63,1 %. Причем, на собаках и ежах находили клещей только этого вида. Для лабораторного исследования методом генной диагностики (ПЦР) было отобрано 33 клеща *R. pumilio*. Результаты исследований показали, что два из них содержали ДНК риккетсий АПЛ (6 %). Обе зараженные возбудителем АПЛ самки клещей собраны с дворовых собак. Одна из них добыта 28.05.2007 г. в пункте Бескаска ЗКО, а другая снята с собаки 05.06.2007 г. в пункте Бактыгали Атырауской области.

Полученные данные подтверждают циркуляцию возбудителя АПЛ среди клещей *R. pumilio* на смежных территориях Западно-Казахстанской и Атырауской областей. Здесь имеются все экологические условия для формирования природного и антропоургического очагов этой инфекции.

Следует заметить, что проведенный нами ретроспективный анализ заболеваний на этой территории не позволил выявить ни одного случая, подозрительного на АПЛ. А серологический скрининг местного населения на АПЛ дал отрицательные результаты. Отсутствие больных и отрицательные результаты обследования населения могут свидетельствовать о начальном этапе формирования природного очага нового для Казахстана риккетсиоза.

**Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ).** В 2007 г. нами впервые выявлены специфические антитела к вирусу Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ) у крупного рогатого скота (КРС) на территории Бокейординского и Жангалинского районов ЗКО. В 2008 и 2009 гг. при обследовании домашних животных на этой территории вновь обнаружены антитела к вирусу ККГЛ. Всего за три года (2007–2009) исследовано 1871 животное, вирусспецифические антитела зарегистрированы у 25 коров (1,3 %). Здесь установлена высокая заклещевленность сельскохозяйственных животных *Hyalomma marginatum marginatum*. Известно, что клещи этого вида являются основными хранителями и переносчиками КГЛ на соседней территории европейской

России. Клещи *Hl. marginatum* широко распространены на территории Бокейординского и Жанибекского районов ЗКО, являются здесь единственным массовым видом кровососущих членистоногих и проявляют тенденцию к расширению своего ареала. По данным 2009 г., индекс встречаемости *Hl. marginatum* на КРС составляет 60 %, а индекс обилия равен 5,0. В период наших наблюдений (май–июнь) клещи этого вида были активны, регулярно нападали на домашних животных и усиленно питались. КРС служит основным прокормителем имаго *Hl. marginatum*. Важным эпидемиологическим фактором является предпочтительная локализация клещей для питания на теле коров. Так, особые проблемы создают людям клещи рода *Hyalomma*, которые прикрепляясь к вымени, мешают дойке коров. Клещей бывает так много, что дояркам приходится руками очищать вымя от напавших паразитов [12].

При дальнейшем исследовании антиген вируса ККГЛ обнаружен у клещей *Hl. marginatum*, *Hl. asiaticum* и *R. pumilio*, у малых сусликов и обитающих здесь птиц (главным образом, у степных жаворонков). В 2011 г. на КГЛ исследовали 1519 клещей *Hl. marginatum*, собранных с КРС в Бокейординском и Жанибекском районах. Для иммуноферментного анализа клещей объединили в 505 проб. В результате исследования в 4,1 % проб выявлен антиген вируса ККГЛ. Часть материала, показавшего положительные результаты на КГЛ, дополнительно исследовали методом ПЦР. В итоге в этих пробах обнаружена РНК вируса ККГЛ. В 2010 г. в Бокейординском районе проведено выборочное обследование населения на наличие антител к вирусу ККГЛ. Кровь исследовали у 184 жителей поселков, где были зарегистрированы сероположительные к этой инфекции домашние животные. У пяти человек обнаружены антитела к вирусу ККГЛ в диагностических титрах (2,7 %), что, несомненно, свидетельствует о контакте животноводов с возбудителем этой инфекции.

В результате комплексных исследований на западе Казахстана установлена устойчивая циркуляция вируса ККГЛ среди сельскохозяйственных животных, грызунов, птиц и пастбищных клещей. Обнаружена иммунная прослойка к КГЛ у части местного населения. Выявленная природно-очаговая территория является северной окраиной мирового ареала вируса ККГЛ, которая, по нашим данным, за последние годы значительно расширилась вслед за распространением основного хранителя инфекции – *Hl. marginatum*. Необходимо учитывать, что клещи *Hl. marginatum* еще несколько лет тому назад на западе Казахстана встречались очень редко. В настоящее время идет процесс активного расселения этих членистоногих на соседние территории. Так, только в 2009 г. граница распространения клещей *Hl. marginatum* на западе ЗКО продвинулась на 60 км в северном и восточном направлениях.

**Лихорадка Западного Нила (ЛЗН).** Первые сведения о циркуляции вируса Западного Нила (ЗН) в

Казахстане получены нами в декабре 2010 г., когда было проведено выборочное обследование в ИФА 184 жителей Жанибекского района. В результате установлено, что 5,4 % проживающих здесь людей имеют в крови специфические антитела к вирусу ЗН.

В дальнейшем проведено изучение видового состава комаров, их возможная зараженность возбудителем ЗН. В 2011 г. на территории ЗКО лабораторному исследованию с помощью ПЦР подвергнуты 445 комаров пяти видов. В итоге РНК вируса ЗН обнаружена в четырех пробах *Ocheerotatus flavescens*, в двух – *Oc. subdiversus* и по одной зараженной пробе установлено у *Anopheles maculipennis* и *Culex modestus*. Все положительные результаты получены от комаров, выловленных в Жанибекском и Бокейординском районах. В 2011 г. в Жанибекском районе вновь проведено выборочное обследование на ЛЗН жителей трех поселков. В ИФА исследованы пробы от 497 чел., у 28 обнаружены антитела к вирусу Западного Нила. Доля жителей с антителами к ЛЗН составляла в отдельных поселках от 4,1 до 8 %.

Зараженность местных популяций комаров вирусом ЗН, а также наличие специфических антител у населения свидетельствуют о контакте людей с инфекцией и текущем эпидемическом процессе. Высокая численность биологических хозяев и переносчиков вируса ЛЗН обуславливает формирование на этой территории природного очага. Возможно, в сохранении вирусной популяции определенную роль играют клещи *Hl. marginatum* [6], которые в последние годы интенсивно распространяются на западе ЗКО. До настоящего времени нам не известны достоверные сведения о выявлении больных ЛЗН в Казахстане. По официальным данным [7], в 2012 г. в России зарегистрированы два завозных из Казахстана случая ЛЗН. В других источниках [9] упоминается только об одном завозе больного ЛЗН в 2012 г. в Астраханскую область. Эти сведения являются подтверждением реальности появления в ближайшее время манифестных форм ЛЗН в природных очагах инфекций в Казахстане.

**Клещевой вирусный энцефалит (КВЭ).** Впервые в 2011 г. на территории ЗКО методом генной диагностики выявлена зараженность вирусом клещевого энцефалита иксодовых клещей *Dermacentor marginatus* [3]. Участок отлова этих клещей находится на северо-востоке ЗКО и граничит с Оренбургской областью, которая эндемична по КВЭ. Установлена высокая численность клещей *D. marginatus*, их доминирующее положение и тесный контакт с населением. На этой же территории проведено выборочное обследование местного населения на КВЭ. У двух человек из 94 исследованных выявлены антитела к вирусу клещевого энцефалита в анамнестических титрах. Клещи *D. marginatus* широко распространены на территории ЗКО, и потому возможно обнаружение новых мест циркуляции этого вируса, в первую очередь в долине рек Урал и Илек.

Итак, в течение последнего десятилетия на запа-

де Казахстана выявлены пять новых природных очагов опасных инфекционных заболеваний, которые формируются и укореняются на территории уже существующих старых природных очагов чумы и туляремии. Это грандиозное естественное явление, связанное с современной трансформацией паразитарных систем и биоценологических комплексов на территориях риска, подлежит тщательному изучению. В отличие от однотипной ситуации в сочетанных природных очагах опасных инфекционных болезней в регионе Северо-Западного Прикаспия России [8], на западе Казахстана природные очаги КГЛ, ЛЗН, АПЛ, КВЭ находятся только на начальном этапе своего становления, чаще всего на границе ареала распространения возбудителя, и потому возможно получение новых сведений о причинах глобальной и региональной экспансии этих зоонозов.

Анализ пространственного размещения старых и новых природных очагов позволил территорию ЗКО по количеству инфекций разделить на четыре региона: северный (ГЛПС, туляремия, КВЭ), центральный (чума, туляремия, ГЛПС), южный (чума, туляремия, АПЛ), западный (чума, туляремия, КГЛ, ЛЗН).

Можно полагать, что в ближайшие годы эпидемический фон значимых зоонозных заболеваний будут определять новые для этих территорий инфекции, требующие особого внимания организаций здравоохранения. В целях готовности к приему и ведению таких больных становится важным укрепление инфекционной службы Западного Казахстана. С учетом современных условий необходимо совершенствование эпидемиологического надзора.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гражданов А.К., Захаров А.В., Андрищенко Е.В., Бидашко Ф.Г. О выявлении первых случаев геморрагической лихорадки с почечным синдромом в Казахстане. Социально-гигиенические и эпидемиологические проблемы сохранения здоровья военнослужащих и населения. *Науч. тр. Федерального науч. центра гигиены им. Эрисмана*. 2004; 11:323–6.
2. Гражданов А.К., Танитовский В.А., Бидашко Ф.Г., Белоножжина Л.Б., Рахманкулов Р.Р., Андрищенко В.В., Сатыбаев С.М. Иксодовые клещи – переносчики опасных инфекций на юге Западно-Казахстанской области. *Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане*. 2007; 1–2(15–16):88–93.
3. Гражданов А.К., Белоножжина Л.Б., Бидашко Ф.Г., Аязбаев Т.З., Захаров А.В., Рамазанова С.И., Танитовский В.А., Жунусбекова С.Б., Андрищенко А.В., Сувор В.В. Первые сведения о природной очаговости клещевого энцефалита в Западно-Казахстанской области. *Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане*. 2012; 2(26):3–7.
4. Захаров А.В., Гражданов А.К., Захарова В.М., Нажимова Г.С. Клинические проявления острой почечной недостаточности при геморрагической лихорадке с почечным синдромом. *Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане*. 2010; 1–2(26):18–22.
5. Захаров А.В., Гражданов А.К. О некоторых показателях заболеваемости геморрагической лихорадкой с почечным синдромом в Западно-Казахстанской области в 2000–2011 гг. *Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане*. 2012; 2(26):45–50.
6. Колобухина Л.В., Львов Д.Н. Лихорадка Западного Нила. В кн.: *Медицинская вирусология*. М.; 2008. С. 514–22.
7. Об итогах надзора за ЛЗН в эпидсезон 2012 г. *Дез. дело*. 2012; 4:71–4.
8. Попов Н.В., Куклев Е.В., Топорков В.П., Адамов А.К., Щербаква С.А., Малецкая О.В., Ковтунов А.И., Яшкульов К.Б., Кабин В.В., Подсвилов А.В., Кологоров А.И., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Князева Т.В., Григорьев М.П., Санджиев В.Б., Осипов В.П., Пискунова Н.В., Сангаджиева Г.В. Сочетанные

природные очаги бактериальных, риккетсиозных и вирусных инфекционных болезней в регионе Северо-Западного Прикаспия. *Пробл. особо опасных инф.* 2010; 1(103):44–7.

9. Путинцева Е.В., Антонов В.А., Викторов Д.В., Смелянский В.П., Жуков К.В., Мананков В.В., Погасий Н.И., Ткаченко Г.А., Шпак И.М., Снатенков Е.А. Особенности эпидемической ситуации по лихорадке Западного Нила в 2012 г. на территории Российской Федерации. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 1:25–9.
10. Смирнова С.Е., Карань Л.С., Платонов А.Е., Танитовский В.А., Белоножжина Л.Б., Бидашко Ф.Г., Гражданов А.К. Циркуляция вируса Крымской геморрагической лихорадки в районах северной границы ареала этой инфекции на территории Республики Казахстан. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2009; 5:42–7.
11. Тарасевич И.В. Астраханская пятнистая лихорадка. М.; 2002. 171 с.
12. Танитовский В.А., Гражданов А.К., Бидашко Ф.Г. Распределение, численность и приуроченность к хозяевам пастьбищных иксодовых клещей в разных ландшафтных зонах Западно-Казахстанской области. *Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане*. 2009; 1–2(19–20):73–83.

#### References

1. Grazhdanov A.K., Zakharov A.V., Andryushchenko E.V., Bidashko F.G. [Concerning identification of the first cases of hemorrhagic fever with renal syndrome in Kazakhstan. Social-hygienic and epidemiological issues concerning health preservation among the population and the military]. *Scholarly Works of the Erisman Federal Research Center of Hygiene*. 2004; 11:323–6.
2. Grazhdanov A.K., Tanitovskiy V.A., Bidashko F.G., Belonozhkina L.B., Rakhmankulov R.R., Andryushchenko V.V., Sadybaev S.M. [Ixodidae ticks – vectors of dangerous infections in the South of Western-Kazakhstan region]. *Karantin. Zoonoz. Infek. v Kazakhstane*. 2007; 1–2(15–16):88–93.
3. Grazhdanov A.K., Belonozhkina L.B., Bidashko F.G., Ayazbaev T.Z., Zakharov A.V., Ramazanova S.I., Tanitovskiy V.A., Zhunusbekova S.B., Andryushchenko A.V., Surov V.V. [Early data on natural focality of tick-borne encephalitis in the Western-Kazakhstan Region]. *Karantin. Zoonoz. Infek. v Kazakhstane*. 2012; 2(26):3–7.
4. Zakharov A.V., Grazhdanov A.K., Zakharova V.M., Nazhimova G.S. [Clinical signs of acute kidney failure in case of hemorrhagic fever with renal syndrome]. *Karantin. Zoonoz. Infek. v Kazakhstane*. 2010; 1–2(26):18–22.
5. Zakharov A.V., Grazhdanov A.K. [Regarding certain morbidity indexes on hemorrhagic fever with renal syndrome in the Western-Kazakhstan Region in 2000–2011]. *Karantin. Zoonoz. Infek. v Kazakhstane*. 2012; 2(26):45–50.
6. Kolobukhina L.V., Lvov D.N. [West Nile Fever]. In: [Meditinskaya Virusologia]. M.: 2008. P. 514–22.
7. [Concerning the results of surveillance over the WNF within the epidemiological season in 2012]. *Дез. Дело*. 2012; 4:71–4.
8. Popov N.V., Kouklev E.V., Toporkov V.P., Adamov A.K., Shcherbakova S.A., Maletskaya O.V., Kovtunov A.I., Yashkulov K.B., Kabin V.V., Podsvirov A.V., Kologorov A.I., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Knyazeva T.V., Grigoryev M.P., Sandzhiev V.B.–Kh., Ossipov V.P., Piskunova N.V., Sangadzhieva G.V. [Combined natural foci of bacterial, rickettsial and viral infectious diseases in the North-West Pre-Caspian region]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2010; 1(103):44–7.
9. Putintseva E.V., Antonov V.A., Viktorov D.V., Smelyansky V.P., Zhukov K.V., Manankov V.V., Pogasy N.I., Tkachenko G.A., Shpak I.M., Snatnikov E.A. [Peculiarities of epidemiological situation on the West Nile fever in 2012 in the territory of the Russian Federation]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 1:25–9.
10. Smirnova S.E., Karan' L.S., Platonov A.E., Tanitovskiy V.A., Belonozhkina L.B., Bidashko F.G., Grazhdanov A.K. [Circulation of Crimean-Congo fever virus nearby north border of the infection area in the territory of the Republic of Kazakhstan]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2009; 5:42–7.
11. Tarasevich I.V. [Astrakhan Spotty Fever]. M.; 2002. 171 p.
12. Tanitovskiy V.A., Grazhdanov A.K., Bidashko F.G. [Distribution, abundance, and host specificity of the pastoral Ixodidae ticks in various landscape areas of the Western-Kazakhstan region]. *Karantin. Zoonoz. Infek. v Kazakhstane*. 2009; 1–2(19–20):73–83.

#### Authors:

Grazhdanov A.K., Toporkov A.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru  
Ayazbaev T.Z., Bidashko F.G., Zakharov A.V., Belonozhkina L.B., Pak M.V., Andryushchenko A.V. Uralsk Plague Control Station. 36/1, Chapaeva St., Uralsk, 090001, Republic of Kazakhstan. E-mail: pchum@mail.ru

#### Об авторах:

Гражданов А.К., Топорков А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru  
Аязбаев Т.З., Бидашко Ф.Г., Захаров А.В., Белоножжина Л.Б., Пак М.В., Андрищенко А.В. Уральская противочумная станция. 090001, Республика Казахстан, Западно-Казахстанская область, г. Уральск, ул. Чапаева 36/1. E-mail: pchum@mail.ru

Т.А.Костюкова<sup>1</sup>, В.Ю.Смоленский<sup>2</sup>, М.Н.Ляпин<sup>1</sup>**РАЗРАБОТКА ИНСТРУКТИВНО-МЕТОДИЧЕСКОЙ БАЗЫ УЧРЕЖДЕНИЯ  
КАК ЭЛЕМЕНТА ОБЕСПЕЧЕНИЯ БИОБЕЗОПАСНОСТИ РАБОТ  
С ПАТОГЕННЫМИ БИОЛОГИЧЕСКИМИ АГЕНТАМИ**

<sup>1</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; <sup>2</sup>Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Российская Федерация

Подготовлен и используется в повседневной практике пакет документов по биологической безопасности учрежденческого уровня. Разработаны, обоснованы и введены три уровня допуска специалистов к работе с ПБА I–IV групп. Рассмотрены варианты выполнения сопряженной (одновременной) работы с ПБА разных групп. Положением о проверке дезсредств, поступающих в учреждение, определен порядок проведения контроля вновь поступивших партий дезинфицирующих средств и соответствия концентрации рабочих растворов дезинфектантов в подразделениях требованиям санитарных правил.

Показана целесообразность оценки защитной эффективности фильтров очистки воздуха вытяжных систем вентиляции помещений «заразной» зоны лабораторий, проводящих работу с ПБА, с использованием бактериального аэрозоля и физического метода.

*Ключевые слова:* санитарные правила, инструкция учрежденческого уровня, допуск к работе с ПБА, проверка дезинфицирующих средств.

Т.А.Kostyukova<sup>1</sup>, V.Yu.Smolensky<sup>2</sup>, M.N.Lyapin<sup>1</sup>**Development of Instruction and Methodical Data Basis of the Institution  
as an Element of Biosafety Provision as Regards Works with Pathogenic Biological Agents**

<sup>1</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; <sup>2</sup>Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation

A set of documents concerning biological safety at the institutional level is prepared and put in to practice. Three levels of specialists' admission for works with pathogenic biological agents of the I–IV groups have been developed, substantiated and introduced. Considered are the variants of execution of coupled (simultaneous) work with PBA of different groups. The statement on control of disinfectants received by the institution defines the order of control execution as regards newly received disinfectants and correspondence of disinfectants' working solutions in the laboratories to the requirements of sanitary regulations.

Demonstrated is practicability of the assessment of protective efficacy of air-cleaning filters in the exhaust ventilation systems of "contaminated" area rooms in the laboratories carrying out the works with PBA using bacterial aerosol and physical method.

*Key words:* sanitary regulations, institutional level instruction, admission for works with PBA, control of disinfectants.

Во всем мире в последнее время отмечается повышенное внимание к практическому выполнению принципов биологической безопасности (ББ) в лабораториях, выполняющих работу с использованием возбудителей заболеваний человека, животных и растений. Связано это с появлением новых инфекционных заболеваний, усложнением методик при работе с патогенами, возросшей угрозой использования в террористических целях достижений в изучении патогенов.

Разработки в области обеспечения ББ направлены в первую очередь на снижение опасности возможного воздействия микроорганизмов на экспериментатора и окружающую среду: создание безопасных методов работы с возбудителями опасных инфекций, оснащение лабораторий и эксплуатация современных приборов и оборудования, позволяющих обезопасить экспериментатора и окружающую среду от возможного несанкционированного выхода микроорганизма во внешнюю среду.

Существенным элементом обеспечения биобе-

зопасности является нормирование деятельности с использованием возбудителей особо опасных инфекций, что обусловлено их высокой степенью опасности для здоровья работников и/или эпидемического распространения заболевания [4].

**Материалы и методы**

В России существует многоуровневая система правовых, нормативно-методических документов, регламентирующая обеспечение и контроль выполнения требований ББ при работе с микроорганизмами. основополагающими документами в данной области является закон РФ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» ФЗ № 52 от 30.03.1999 г. и действующие санитарные правила (СП) [1, 2, 3].

Требования безопасной работы с микроорганизмами I–IV групп патогенности, установленные действующими СП, носят общий характер, нуждаются в дополнительной расшифровке и привязке к конкрет-

ным условиям, имеющимся в учреждении.

Целью работы стала разработка документов учрежденческого уровня, которые позволят однозначно трактовать положения СП и неукоснительно выполнять их на практике.

### Результаты и обсуждение

В повседневной практике микробиологических лабораторий в соответствии с требованиями действующих СП необходимо осуществлять допуск сотрудников к работе с патогенными микроорганизмами, оформлять документы на получение (передачу, уничтожение) культур, получать разрешения на проведение экспериментов с использованием патогенных биологических агентов (ПБА), контролировать качество поступающих дезинфекционных средств и рабочих растворов, проводить проверку защитной эффективности фильтров очистки воздуха (ФОВ).

Разработанная и введенная приказом директора РосНИПЧИ «Микроб» «Временная служебная инструкция о порядке оформления документов для работы с ПБА I–IV групп в РосНИПЧИ «Микроб» (далее Инструкция) включает формы, отражающие и детализирующие основные требования СП при выполнении работ с использованием патогенов.

Внедрение в практику учреждения таких форм облегчает осуществление контроля выполнения требований СП при проведении экспериментов, передвижении отдельных штаммов, снижает возможность несанкционированного использования штаммов в работе, позволяет, при необходимости, проверить соответствие выполняемых работ заявленным, участие в них персонала, имеющего соответствующий допуск.

Разработаны и унифицированы формы документов для допуска сотрудников к работе с ПБА. Они отражают положения, соблюдение которых определено п. 2.1.9 СП 1.3.1285-03: базовое образование, вакцинация или противопоказания к ней по результатам медицинского осмотра (предварительного или очередного), наличие подготовки на курсах первичной специализации по особо опасным инфекциям и курсов повышения квалификации, с учетом специфики работы, используемых технологий и методик, проверка теоретических знаний сотрудников по требованиям безопасной работы в рамках нормативных документов [1].

Пакет документов для оформления допуска сотрудника к работе с ПБА включает разные формы актов приема зачета по знаниям требований безопасной работы (в зависимости от уровня допуска), рапорт заведующего подразделением, представляющий сведения об образовании допускаемого сотрудника, прохождении им специального обучения (курсы), вакцинации или наличии противопоказаний к вакцинации (что подтверждается подписью заведующего здравпунктом), а также проект приказа. Сотрудник, имеющий противопоказания к вакцинации, допускается к работе с ПБА отдельным приказом на основа-

нии личного заявления.

В зависимости от базового образования, специальной подготовки к работе с патогенными микроорганизмами сформулированы требования и введены три уровня допуска сотрудников к работе с ПБА.

Первый уровень предусматривает допуск сотрудников (научных сотрудников, врачей, биологов, аспирантов), имеющих высшее медицинское, биологическое или ветеринарное образование, окончивших соответствующие курсы специализации (в соответствии с п.п. 2.1.9, 2.1.11 и 2.2.4 СП 1.3.1285-03 и 2.2.1 и 2.2.2 СП 1.3.2322-08) [1, 2]. Сотрудники с первым уровнем допуска к работе с ПБА самостоятельно выполняют эксперименты, имеют рабочие коллекции культур микроорганизмов и ведут журнал учета движения культур [3].

По второму уровню приказом директора допускаются к работе с ПБА лаборанты, имеющие среднее медицинское, ветеринарное образование, окончившие соответствующие курсы специализации (п.п. 2.1.9, 2.1.11, 2.2.4 СП 1.3.1285-03 и 2.2.1, 2.2.2 СП 1.3.2322-08) [1, 2]. Данный уровень допуска предусматривает выполнение работы с использованием ПБА под контролем сотрудника, имеющего первый уровень допуска.

Третий уровень допуска предусмотрен для дезинфекторов, инженерно-технических специалистов подразделений, в которых проводят исследования с использованием ПБА I–IV групп. Такой уровень допуска дает право на посещение помещений, аттестованных для работы с микроорганизмами I–IV групп патогенности, для выполнения служебных обязанностей и участия в транспортировании отработанного биологического материала для обеззараживания в централизованную автоклавную. Сотрудники, имеющие высшее (среднее) образование, но не прошедшие курсы специализации, также могут быть допущены по третьему уровню после прохождения инструктажа на месте и сдачи зачета по знаниям требований биобезопасности.

Разработан и введен Инструкцией пакет документов для допуска в помещения «заразной» зоны сотрудников административно-хозяйственных подразделений для выполнения их должностных обязанностей (п. 2.1.11 СП 1.3.1285-03 и п. 2.2.3 СП 1.3.2322-08) [1, 2], порядок посещения помещений «заразной» зоны специалистами, не работающими постоянно в институте, но привлекаемыми для определенных видов работ (п.п. 2.1.12 и 2.1.13 СП 1.3.1285-03 и п.п. 2.2.4 и 2.2.5 СП 1.3.2322-08) [1, 2]. Допуск осуществляется приказом директора после сдачи зачета по знаниям требований биобезопасности при посещении помещений «заразной» зоны и выполнении в них работ, определенных должностными обязанностями.

Созданы формы для получения микроорганизмов I–II и III–IV групп патогенности, передачи культур и их уничтожения в соответствии с п.п. 3.3.2 и 3.3.3 СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, пере-

дачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности» [3], а также закреплен порядок передачи культур, числящихся за сотрудником в случае его заболевания и невыхода на работу.

Служебная записка на получение штаммов микроорганизмов составляется от имени сотрудника, получающего культуры.

Специалист согласует документ на получение микроорганизмов I–II групп патогенности с заведующим подразделением, тем самым подтверждается необходимость получения культур для проведения запланированных исследований; с сотрудником, выдающим запрашиваемый штамм, который подтверждает наличие штамма/культур с запрашиваемыми характеристиками; с заведующим подразделением, из которого выдается штамм, он подтверждает согласие на выдачу штамма/культур; с куратором от комиссии по контролю за соблюдением требований биологической безопасности (КББ) подразделения, который подтверждает формальную готовность сотрудника проводить эксперименты с этим штаммом и наличие условий в подразделении для проведения работ с ПБА той или иной группы патогенности.

Для получения культур микроорганизмов III–IV групп патогенности разработана форма, в соответствии с которой сотрудник согласует документ на получение штамма с заведующим подразделением, сотрудником, выдающим штамм, куратором подразделения (подтверждает формальную готовность сотрудника проводить эксперименты с этим штаммом). В соответствии с СП 1.2.036-95 разрешающая резолюция дается заведующим подразделением, из которого будет выдан штамм. Формы находятся в подразделениях, а их копии – в документах КББ.

Разработанные документы позволяют упорядочить документацию и иметь сведения о проведении работ с ПБА в подразделениях института, усилить контроль обращения ПБА, ограничить доступ и исключить несанкционированный доступ к ПБА, исключить проведение несанкционированных работ с ПБА, исключить проведение работ с ПБА в подразделениях, не имеющих санитарно-эпидемиологических заключений о наличии условий для их выполнения.

Инструкцией предусмотрена специальная форма предоставления информации в сектор мониторинга биобезопасности о проведении работ с ПБА I–II групп на неделю, что также направлено на проведение оперативного контроля соблюдения условий выполнения заявленных работ с использованием ПБА I–II групп.

Инструкция также закрепляет порядок оформления и содержание служебных записок на проведение экспериментов. Сведения, представленные в служебных записках, обеспечивают дополнительный контроль выполнения требований биологической безопасности руководителями подразделений и кураторами подразделений от КББ, администрацией.

В качестве примера содержания документа,

касающегося вопросов работы с ПБА, может быть рассмотрена служебная записка на проведение экспериментов с использованием ПБА. Документ составляется от имени заведующего подразделением и содержит следующую информацию: название темы, в рамках которой будет выполняться работа, в каком помещении будет проводиться эксперимент (его аттестация), сроки проведения, виды микроорганизмов (штаммы, группа патогенности, вирулентность, антибиотикочувствительность), фамилии сотрудников, участвующих в эксперименте, номера приказов об их допуске, наличие вакцинации, как элемента защиты сотрудника, обеспечиваемой работодателем.

В служебной записке заведующий подразделением предоставляет информацию о теме работы, готовности специалистов подразделения к проведению исследований (уровень допуска, владение методом, вакцинация), помещениях и средствах защиты, которые будут использованы (боксы микробиологической безопасности, средства индивидуальной защиты), указываются сроки вакцинации специалистов (проводилась ли работа в сроки, когда защита от вакцины эффективна, известно, что вакцинация против чумы проводится один раз в год, а напряженный иммунитет сохраняется примерно в течение полугода). В случае планирования проведения эксперимента с использованием лабораторных животных указывают вид животных, их количество, манипуляции (иммунизация, заражение, операция, вскрытие в конце опыта и посевы органов и т.д.), длительность содержания животных.

Общую готовность к проведению работы и наличие условий для ее выполнения подтверждает своей подписью куратор от КББ. Совокупность данных, приводимых в служебной записке, позволяет осуществлять контроль соответствия заявленной работы фактически выполняемой.

Особое значение такая информация приобретает в случаях возникновения аварийных ситуаций, когда оперативно из одного документа можно получить сведения о возбудителе (вирулентность, чувствительность к антибиотикам), наличии вакцинации сотрудника.

В Инструкцию включена форма служебной записки на прохождение обсервации, отражающая сведения о ее сроках, посещении сотрудником помещений «заразной» зоны и выполнении работы с использованием ПБА I–II групп в предшествующие обсервации дни в соответствии со сроком обсервации, составляющим максимальный инкубационный период для данной инфекции.

Существуют различия в планировке «заразной» зоны подразделений, проводящих работу с ПБА как I–II, так и III–IV групп. Разработана и введена «Инструкция о порядке обеспечения биологической безопасности в подразделениях, проводящих сопряженную (параллельную, одновременную) бактериологическую работу с микроорганизмами I–IV групп патогенности», которая содержит разъяснения

к п. 2.8.44 СП 1.3.1285-03 [1]. Она подробно рассматривает: наличие отдельных микробиологических боксов для работы с ПБА I–II и III–IV групп патогенности, возможность разнесения во времени таких экспериментов в одном боксе, необходимость одновременной работы с ПБА разных групп патогенности, обусловленная требованиями эксперимента. Выбор максимально приближенного к конкретным условиям варианта позволит экспериментатору выполнить работу с соблюдением требований безопасности.

В инструкции также даны рекомендации по использованию защитной одежды, применению дезсредств, порядку проведения работ и хранения объектов с ПБА. В соответствии с перечисленными особенностями проведения работ подробно освещены вопросы, касающиеся порядка передачи ПБА разных групп и обеззараженного материала, полученного с их использованием.

В соответствии с действующими СП 1.3.1285-03 [1] в каждом подразделении разработана инструкция по биобезопасности, в которой отражено деление «заразной» зоны подразделения на помещения, в которых ведется работа с ПБА, осуществляется их хранение, и вспомогательные помещения, через которые проносят ПБА в упакованном виде (например, коридоры), а также помещения, в которых хранение и манипуляции с ПБА не проводятся. Инструкции содержат информацию о конкретной привязке выполняемых работ к помещениям, имеющим соответствующую аттестацию.

Большое внимание в вопросах обеспечения биобезопасности уделяется порядку обеззараживания лабораторных отходов. Для химического обеззараживания используют дезинфицирующие средства, режим применения которых регламентирован действующими санитарными правилами (приложение 1 к СП 1.3.1285-03) [1] и инструкциями производителей дезсредств по их применению.

В соответствии с разделом 2.10 СП 1.3.1285-03 все вновь поступающие на склад дезсредства должны подвергаться проверке на содержание активного вещества [1].

Представлен список нормативно-методических документов, регламентирующих контроль дезсредств, приведен порядок отбора проб поступивших в учреждение дезсредств для проведения химического анализа на содержание активного вещества. Раздел «Контроль рабочих растворов дезинфицирующих средств в подразделениях института» освещает порядок контроля правильности приготовления рабочих растворов дезсредств в подразделениях. Приложения представляют формы документального оформления результатов проверки. Прописан порядок действий в случае несоответствия процентного содержания активного вещества в рабочих растворах дезинфицирующих веществ: результаты контроля доводят до сведения заведующего подразделением и председателя КББ РосНИПЧИ «Микроб».

Для проверки защитной эффективности ФОВ существует несколько методов. Традиционно используется метод проверки с использованием бактериального аэрозоля.

С одной стороны, метод определения защитной эффективности ФОВ с использованием бактериологического аэрозоля давно и успешно используется на практике, не требует дорогостоящих средств и оборудования, специфичен, с другой – имеет ряд недостатков: получение ответа о результате проверки через 48 ч, аналитический этап должен выполняться в условиях лаборатории, метод невозможно применять в «чистых» помещениях рабочих зон производства медицинских иммунобиологических препаратов (МИБП).

Наличие указанных недостатков на фоне повышения требований биологической безопасности, заключающихся в обязательном оснащении действующих и вновь строящихся лабораторий, деятельность которых связана с использованием ПБА, специальной системой вентиляции с ФОВ, проверенными на защитную эффективность, потребовало оптимизировать процесс проверки эффективности ФОВ.

Кроме того, модернизация оснащения специализированных противоэпидемических бригад, обеспечение их мобильными лабораториями, оборудованными вентиляцией с ФОВ, и необходимость проведения экспресс-тестов на их защитную эффективность после передислокации и перед началом работ с ПБА, также потребовали внедрения ускоренного тестирования фильтров.

Анализ предлагаемых в литературе методов испытаний фильтров позволил выделить физический метод определения защитной эффективности высокоэффективных фильтров очистки воздуха HEPA и ULPA, установленных в приточно-вытяжных системах вентиляции, путем распыления аэрозоля диэтил-гексилсебационата со стороны потока воздуха, поступающего на фильтр, и определения концентрации аэрозоля как со стороны поступающего воздуха на фильтр, так и со стороны выходящего потока с помощью счетчика частиц. Метод позволяет получить результаты проверки через 15 мин от момента снятия показаний счетчика.

Скорость получения результатов является важным преимуществом метода, что определяет его использование при проверке ФОВ мобильных лабораторий после передислокации, а также при тестировании эффективности фильтро-вентиляционных установок, вводимых в эксплуатацию или после их ремонта и замены ФОВ, так как позволяет проверить целостность всей системы фильтрации, включая фильтровальный материал, раму, элементы крепления и герметизации. Вторым важным достоинством метода является исключение обсемененности помещений бактериологическим аэрозолем, что отвечает требованиям эксплуатации «чистых» помещений при производстве МИБП.

Оба метода используются в РосНИПЧИ

«Микроб» для оценки защитной эффективности фильтров очистки воздуха.

Таким образом, разработанные документы, направленные на выполнение в повседневной практике требований отечественной нормативно-методической документации, содержащие детальное описание порядка выполнения положений санитарных правил с учетом их привязки к конкретным условиям, существующим в подразделениях учреждения (организации), повышающие персональную ответственность специалистов при выполнении работ с патогенами, являются элементом организационной составляющей системы обеспечения ББ при работе с ПБА.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). СП 1.3.1285-03. *Бюл. норм. и метод. документов Госсанэпиднадзора*. 2003; 3(13):61–144.
2. Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней. СП 1.3.2322-08. М.: 2009. 75 с.
3. Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности. СП 1.2.036-95. М.: 1996. 80 с.
4. Онищенко Г.Г., Дроздов И.Г., Малокова Т.А., Ляпин М.Н., Пчелинцева М.В., Безсмертный В.Е., Кривуля С.Д., Федоров Ю.М., Нетесов С.В., Кутырев В.В. Нормирование как элемент системы обеспечения безопасности работ с биологическими агентами I–II групп патогенности. *Пробл. особо опасных инф.* 2005; 2(90):5–11.

#### References

1. [Safety of works with microorganisms of the I–II groups of pathogenicity (hazard). Sanitary-and-epidemiological regulations]. SR 1.3.1285-03. *Byul. Norm. Metod. Dokum. Gossanepidnadzora*. 2003; 3(13):61–144.
2. [Safety of works with microorganisms of the III–IV groups of pathogenicity (hazard groups) and parasitic disease agents. Sanitary-and-epidemiological regulations]. SR 1.3.2322-08. М.: Rospotrebnadzor Federal Center of Hygiene and Epidemiology; 2009. 75 p.
3. [The order of registration, storage, transfer and transportation of microorganisms of the I–IV groups of pathogenicity. Sanitary-and-epidemiological regulations]. SR 1.2.036-95. М.: 1996. 80 p.
4. Onishchenko G.G., Drozdov I.G., Malyukova T.A., Lyapin M.N., Pchelintseva M.V., Bezsmertny V.E., Krivulya S.D., Feodorov Yu.M., Netesov S.V., Kuttyrev V.V. [Standardization as an Element of the System Guaranteeing Security to Professionals Working with Biologic Agents Pathogenicity Groups I and II]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2005; 2(90):5–11.

#### Authors:

*Kostykova T.A., Lyapin M.N.* Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

*Smolenskiy V.Yu.* Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare. 18, Bld. 5 and 7, Vadkovsky Pereulok, Moscow, 127994, Russian Federation.

#### Об авторах:

*Костюкова Т.А., Ляпин М.Н.* Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

*Смоленский В.Ю.* Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Российская Федерация, 127994, Москва, Вадковский переулок, дом 18, строение 5 и 7.

Поступила 19.07.13.

Б.И.Левченко, Л.В.Дегтярева, А.А.Зайцев, М.П.Григорьев, В.В.Остапович

## РОЛЬ ОТДЕЛЬНЫХ ВИДОВ МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В ПОДДЕРЖАНИИ ПРИРОДНОЙ ОЧАГОВОСТИ НА ТЕРРИТОРИИ ЛЕСОСТЕПНОЙ ЧАСТИ ПРИРОДНОГО ОЧАГА ТУЛЯРЕМИИ СТАВРОПОЛЬСКОГО КРАЯ

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация

Результаты эпизоотологического мониторинга в лесостепной части природного очага туляремии Ставропольского края показывают, что роль отдельных видов мелких млекопитающих в поддержании природной очаговости туляремии неравнозначна. Эпизоотическую активность очага в 1959–1970 гг. определяли многочисленные виды: *Microtus arvalis*, мыши рода *Sylvaemus*, *Mus musculus*. В 1972–2010 гг. в структуре основных носителей возбудителя туляремии в условиях интенсивного антропогенного пресса произошли изменения. В настоящее время ведущая роль принадлежит распространенным и стабильным по численности мышам рода *Sylvaemus*, а также *C. suaveolens*. На долю последних за этот период приходится 31,2 % всех выделенных от мелких млекопитающих штаммов возбудителя туляремии. При этом изменилось эпизоотическое значение *M. arvalis*. Процент изолированных штаммов от полевых снизился с 55,3 до 28,4. Численность *M. arvalis* и *M. musculus* в связи с отсутствием условий для их массового размножения длительное время находится на низком уровне, что значительно снижает их роль в поддержании природной очаговости на изучаемой территории.

**Ключевые слова:** природный очаг, возбудитель туляремии, мелкие млекопитающие, эпизоотическое значение.

B.I.Levchenko, L.V.Degtyareva, A.A.Zaitsev, M.P.Grigor'ev, V.V.Ostapovich

## The Role of Certain Species of Small Mammals in the Persistence of Natural Focality in the Territory of Forest-Steppe Zone of the Natural Tularemia Focus of the Stavropol Region

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Epizootiological monitoring of the forest-steppe area of the natural tularemia focus in the Stavropol region has revealed that the role of particular species of small mammals in the persistence of natural tularemia focality is unequal. Epizootic activity of the focus in 1959–1970 was determined by the numerous species of rodents: *Microtus arvalis*, mice of *Sylvaemus* genus and *Mus musculus*. In 1972–2010 there occurred significant changes in the grouping of the main tularemia agent carriers under the influence of strong anthropogenic pressure. Nowadays the leading role is played by the widely-spread and subsistent mice of *Sylvaemus* genus and *C. suaveolens*, the latter ones being responsible for 31.2 % of overall, isolated from small mammals, tularemia agent strains. In addition to this, epizootic significance of *M. arvalis* has greatly changed. Index of strains isolated from field vole has lowered from 55.3 up to 28.4. Numbers of *M. arvalis* and *Mus musculus* are continuously on the low level, which is due to the absence of favorable breeding conditions. It reduces their impact on the persistence of natural focality in the territory under surveillance significantly.

**Key words:** natural focus, tularemia agent, small mammals, epizootic significance.

Впервые эпизоотии туляремии среди мелких млекопитающих и спорадические случаи заболевания людей в Ставропольском крае были зарегистрированы в 1938 г. С тех пор туляремия в природном очаге не раз проявлялась в виде разлитых и локальных эпизоотий и сопутствующих им эпидемических осложнений. Многолетнее изучение показало, что на Ставрополье существует обширный и стойкий природный очаг туляремии, имеющий полигостальный и поливекторный характер [2, 3].

Природный очаг туляремии в Ставропольском крае имеет сложную биоценологическую структуру и находится на территории четырех ландшафтно-географических зон. Ландшафтно-экологические особенности территории обеспечивают разнообразие животного мира. Это относится к грызунам и насекомоядным, большинство из которых имеют значение в сохранении и трансмиссии как возбудителя туляремии, так и ряда других инфекционных заболеваний.

### Материалы и методы

Материалом для настоящего сообщения по-

служили результаты эпизоотологического обследования на туляремию лесостепной части территории Ставропольского края в период с 1972 по 2010 год. Лабораторному бактериологическому исследованию на туляремию подвергнуты 11130 особей мелких млекопитающих различных видов, в том числе: *Sorex araneus* – 48 экз., *Crocidura suaveolens* – 525, *Sicista subtilis* – 1, *Sicista betulina* – 4, *Cricetulus migratorius* – 478, *Mesocricetus raddei* – 3, *Microtus arvalis* – 1704, мыши рода *Sylvaemus* (*S. fulvipectus* и *S. microps*). Морфологически эти два вида слабо дифференцированы, в полевых условиях до недавнего времени вообще не различались. Приводимые ниже сведения, поэтому относятся к обоим видам, но в большей степени к *S. fulvipectus* – 6259, *Apodemus agrarius* – 298, *Mus musculus* – 1807, *Micromys minutus* – 1, *Rattus norvegicus* – 2.

В период 1972–2010 гг. на территории лесостепной части природного очага было выделено 252 штамма возбудителя туляремии, в том числе от грызунов и насекомоядных – 183 (72,6 %), эктопаразитов – 68 (27,0 %), из объектов внешней среды – 1 (0,4 %). Полевой материал исследовали в лаборато-

риях Ставропольского противочумного института бактериологическими и серологическими методами.

**Результаты и обсуждение**

Лесостепной ландшафтно-географический район занимает юго-западную часть Ставропольского края. Основная территория лесостепи находится на высоких равнинах (до 550 м над уровнем моря) с байрачными лесами и злаково-разнотравными степями. Другая часть лесостепи находится на платообразных останцовых массивах с широколиственными лесами и луговидной степью. В ботанико-географическом отношении район характеризуется чередованием лесов со степями. Лесостепная часть Ставропольской возвышенности находится в зоне неустойчивого увлажнения со среднегодовым количеством осадков до 700 мм и коэффициентом увлажнения 1,0–2,0. Снежный покров неустойчивый, в отдельные годы достигает 100 мм и более. Наиболее жаркий месяц – июнь, (среднемесячная температура 25 °С), самый холодный – январь (среднемесячная температура –10 °С). Территория лесостепной зоны Ставропольской возвышенности характеризуется частыми и сильными ветрами восточного и западного направлений. Степные участки зоны почти на 80 % распаханы и интенсивно используются под возделывание сельскохозяйственных культур. В структуре сельхозугодий большую часть занимают посевы зерновых и пропашных культур. Хорошо развита система оросительных каналов и находятся крупные водохранилища Кубано-Егорлыкской системы: Сенгилеевское, Егорлыкское, Новотроицкое.

За время эпизоотологического обследования на

туляремию в течение 39 лет (в 1995 и 1996 гг. обследование не проводили) эпизоотии туляремии различной интенсивности были зарегистрированы среди мелких млекопитающих в течение 16 лет. В пределах лесостепной части очага естественная зараженность возбудителем туляремии была установлена у 7 видов диких грызунов и одного вида насекомоядных (таблица).

Изучение видового состава и динамики численности мелких млекопитающих в период с 1972 по 2010 год, обитающих на территории лесостепного Ставрополья, показало, что основу зооценоза на данной территории составляют *C. suaveolens* (4,8 %), *C. migratorius* (4,3 %), *M. arvalis* (15,3 %), мыши рода *Sylvaemus* (56,2 %), *M. musculus* (16,2 %).

Благодаря проведенным в 1972–2010 гг. наблюдениям установлено, что показатели численности и видовой структуры в зооценозе на территории лесостепной части природного очага туляремии претерпевают изменения [2, 4].

Наибольшим разнообразием видового состава мелких млекопитающих и их высокой численностью характеризуются ползающие насаждения, где зарегистрировано 7 видов мелких млекопитающих (в том числе мыши рода *Sylvaemus* – *S. fulvipectus* и *S. microps*). Доминируют во все сезоны здесь мыши рода *Sylvaemus*, индекс доминирования которых (суммарно) по среднесезонным данным составил 82,5 %. Мыши рода *M. musculus* гораздо малочисленнее, индекс их доминирования – 4,7 %. Летом и осенью встречается в лесополосах *C. migratorius* – 0,001–0,005 % попадания. Относительно стабильна численность *M. arvalis* – 0,5–0,8 % попадания. На целинных участках видовой состав мелких млекопитающих менее разнообразен (4 вида) и показатели их

**Выделение штаммов *Francisella tularensis* на территории лесостепной части природного очага туляремии Ставропольского края в 1972–2010 гг.**

Объект исследования	осень					зима					весна				
	скирды	лесополосы	целина	Многолетние травы	зерновые	скирды	лесополосы	целина	Многолетние травы	зерновые	скирды	лесополосы	целина	Многолетние травы	зерновые
Мелкие млекопитающие															
<i>Microtus arvalis</i>	2	2	-	1	-	21	10	1	-	11	3	-	1	-	-
<i>Cricetulus migratorius</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Мыши рода <i>Sylvaemus</i>	-	3	1	-	-	10	7	5	-	2	1	-	-	-	-
<i>Mus musculus</i>	3	1	-	-	-	20	-	-	-	9	2	1	-	-	-
<i>Crocidura suaveolens</i>	8	-	1	-	-	33	5	2	2	-	5	1	-	-	-
<i>Apodemus agrarius</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	2	1	-	-	-
<i>Rattus norvegicus</i>	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Micromys minutus</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Эктопаразиты															
<i>Dermacentor marginatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12	36	-	-
<i>Dermacentor reticulatus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1	-	-
<i>Haemaphysalis punctata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-
<i>Ixodes redikorzevi</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	4	2	-
<i>Nosopsyllus consimilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
<i>Stenophthalmus wagneri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
Гамазовые клещи	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Вши	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Прочие объекты внешней среды															
Смыв с овса, зернохранилище	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
<b>Итого</b>	<b>13</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>-</b>	<b>90</b>	<b>22</b>	<b>9</b>	<b>3</b>	<b>23</b>	<b>13</b>	<b>21</b>	<b>45</b>	<b>2</b>	<b>2</b>

численности ниже, чем в полезащитных насаждениях. Однако в годы своей высокой численности *M. arvalis* (процент попадания – 6,5), наряду с лесополосами, заселяет целинные участки и поля с посевами многолетних трав.

Показатели численности *M. musculus* ни в сезонном, ни в многолетнем аспектах не достигают на целине высоких значений (max – 0,9 % попадания). Видовой состав мелких млекопитающих, населяющих агроценозы, характеризуется преобладанием немногих видов: *M. arvalis* (14,5 %), мышей рода *Sylvaemus* (67,2 %), *M. musculus* (18,3 %). Численное соотношение перечисленных видов колеблется в зависимости от структуры посевных площадей, уровня численности того или иного вида грызунов в исследуемом году. На посевах пропашных и зерновых культур доминирующая роль принадлежит *M. musculus*, высока здесь и среднемноголетняя численность *M. arvalis*, а также мышей рода *Sylvaemus*. На полях многолетних трав, занимающих около 15 % всей площади, по многолетним данным, доминируют мыши рода *Sylvaemus* (индекс доминирования – 46,1–65,8 %). В годы увеличения численности *M. arvalis* (1977, 1981, 1988, 1998) показатели численности и доминирования этого вида меняются. Следует отметить, что при увеличении площадей с посевами многолетних трав возрастает вероятность массового размножения *M. arvalis*. Видовая структура грызунов в закрытых стациях меняется в пользу *M. musculus*, индекс доминирования которой в отдельные годы составлял 100 % (1980, 1982 гг.) и по среднемноголетним данным составил 75,5 %. Кодоминант в закрытых стациях – *M. arvalis*, индекс доминирования которой лишь однажды в 1985 г. превысил аналогичный показатель *M. musculus* в два раза и составил 66,7 %.

Изучение взаимоотношений возбудителя туляремии с разными видами животных позволило установить основное эпизоотологическое значение в очаге туляремии животных первой группы, болеющих в острой форме с массовым обсеменением органов и крови бактериями туляремии. Этим обеспечивается передача возбудителя кровососущим членистоногим [1].

Нами установлено и подтверждено, что функцию основных носителей возбудителя туляремии на территории лесостепи выполняют фоновые виды грызунов и насекомых: *M. arvalis*, мыши рода *Sylvaemus*, *M. musculus*, *C. suaveolens*, *C. migratorius*, они же являются и основными прокормителями преимагинальных фаз развития иксодовых клещей – переносчиков этого заболевания.

Для *M. arvalis* характерна весьма неустойчивая численность. В годы с высокой численностью (1972, 1977, 1979.) эти грызуны играли важную роль в возникновении и распространении эпизоотий туляремии. Например, летом 1977 г. *M. arvalis* отлавливали во всех стациях. Процент ее попадания достигал на посевах многолетних трав и зерновых культур 7,0–8,0. Осенью того же года процент попадания полевых увеличился до 9,7, на полях с посевами многолетних

трав он достигал 9,0. Подъем эпизоотической активности проходил на фоне высокой общей численности грызунов и насекомых. В эпизоотии вовлекались *M. arvalis*, *C. migratorius*, мыши рода *Sylvaemus*, *C. suaveolens*. Зараженных микробом туляремии животных отлавливали в лесополосах и на посевах многолетних трав. На долю *M. arvalis* в этот период пришлось 18 % штаммов возбудителя туляремии, выделенных от мелких млекопитающих, на долю *C. suaveolens* – 56,4 %. Степень участия полевых в прокормлении преимагинальных фаз иксодовых клещей была особенно высока за счет их численности, мыши рода *Sylvaemus* и *M. musculus* играли второстепенную роль. Их значение возрастает при резком снижении плотности населения полевых до 0,01–0,05 % попадания. Компенсирующая роль вышеуказанных мышей в период депрессии численности *M. arvalis* заметно возрастает в поддержании и развитии эпизоотического процесса за счет увеличения степени их участия в прокормлении преимагинальных стадий развития гнездово-норовых и пастбищных иксодовых клещей.

В 1959–1970 гг. ведущая роль в поддержании эпизоотического процесса принадлежала *M. arvalis*, на долю которой приходилось 55,3 % от всех выделенных штаммов туляремии, а также мышам рода *Sylvaemus* и *M. musculus* (14,9 и 12,8 % выделенных штаммов соответственно), *C. migratorius* (6,7 %). К второстепенным носителям относили насекомых (C. suaveolens). Начиная с 1975 г. снижается эпизоотическое значение *C. migratorius* и *M. musculus*. Интенсивная сельскохозяйственная деятельность оказывает существенное влияние на микропопуляции этих видов животных, вызывая многолетнее снижение их численности. В таких условиях значительно возросло эпизоотологическое значение *C. suaveolens* как одного из основных носителей возбудителя туляремии.

Численность этих зверьков на протяжении многих лет невысока, но относительно стабильна в многолетнем аспекте. Среднегодовой показатель численности белозубок колеблется от 0,1 до 4,3 % попадания в открытых стациях и от 0,6 до 3,2 % в скирдах [5].

В отдельные годы наблюдали довольно резкие колебания численности этих зверьков в лесополосах, на полях с посевами многолетних трав и целинных участках с прерывистой периодичностью в три–четыре года (1974, 1977, 1981). По территории лесостепной части очага *C. suaveolens* распределена равномерно и занимает все подходящие для нее биотопы. При неблагоприятных условиях наиболее высокие показатели численности белозубок зарегистрированы в лесополосах и на целинных участках. *C. suaveolens* активна круглый год, питается в разные сезоны беспозвоночными, которые находятся в это время в почве и подстилке, а также больными и ослабленными мелкими млекопитающими других видов.

Для землероек характерны сезонные изменения численности, увеличение плотности населения от весны к осени. Например, в 1974 г. в летнее время

попадание землероек в лесополосах составило 2 %, а к осени возросло до 7,7 %, в скирдах – до 3,0 %. В 1982 г. в весенний период белозубки не отлавливались, но уже летом процент попадания их составил 0,2. Осенью землеройки расселились по всем основным биотопам с максимальной численностью на целине (12,0 % попадания) и в лесополосах (3,2 % попадания). С наступлением холодного периода (ноябрь–декабрь) начинается миграция землероек в стадии постоянного (лесополосы) и временного (скирды) переживания, где их численность достигает высоких для этого вида значений (9,4 и 18,0 % попадания соответственно).

За время наблюдения (1972–2010 гг.) на территории лесостепной зоны от мелких млекопитающих были изолированы 183 штамма возбудителя туляремии, в том числе 57 штаммов от *C. suaveolens*, что составляет 32 %.

Из общего количества выделенных штаммов возбудителя туляремии в различных биотопах от *C. suaveolens*, отловленных в лесополосах, изолировано 10,5 %, в скирдах – 80,7, на целине – 5,3, на посевах многолетних трав – 3,5. Это позволяет сделать вывод о том, что наиболее часто зараженные зверьки встречаются в скирдах – местах зимней локализации различных видов мелких млекопитающих. На территории очага солому и скошенные травы скирдуют в непосредственной близости от лесополос, где в осенний период наиболее часто происходят внутривидовые и межвидовые контакты среди основных носителей возбудителя туляремии и с высокой степенью вероятности возможен переход зараженных переносчиков с одного животного на другое.

В начале осенне-зимнего сезона при отсутствии снежного покрова и сильных морозов зараженные возбудителем туляремии зверьки встречаются преимущественно в лесополосах, а при наступлении холодов – в скирдах. Можно предположить, что эпизоотический процесс в осенне-зимний период начинается в лесополосах, на целине и в дальнейшем, за счет миграции зараженных животных, перемещается в скирды, давая начало локальным «скирдовым» эпизоотиям туляремии.

В силу особенностей питания пищей для белозубок могут служить как живые ослабленные, так и павшие от инфекции мелкие млекопитающие, а также зараженные кровососущие членистоногие, через которых происходит инфицирование их микробом туляремии (преимущественно алиментарным путем). Способность *C. suaveolens* при прокормлении на них инфицированных кровососущих членистоногих заражать и в последствии инфицировать других кормящихся на них эктопаразитов, ведет к более широкой диссеминации возбудителя туляремии в пространственном и временном аспектах в связи с длительным сохранением возбудителя этой инфекции в организме клещей на всех стадиях метаморфоза.

Таким образом, в 1959–1970 гг. основными носителями микроба туляремии являлись *M. arvalis*, на долю которой приходилось 55,3 % от всех вы-

деленных штаммов туляремии, а также мыши рода *Sylvaeus* и *M. musculus* (14,9 и 12,8 % выделенных штаммов соответственно). К второстепенным носителям относились насекомоядные – *C. suaveolens*. Однако в 1972–2010 гг. в структуре основных носителей отмечены изменения. Важное значение приобретает *C. suaveolens*, на долю которой за этот период приходится 31,2 % всех выделенных от мелких млекопитающих штаммов возбудителя туляремии. При этом снизилось эпизоотическое значение *M. arvalis*. Процент изолированных штаммов от полевых снизился до 28,4. Следует отметить, что в эти годы возрастает эпизоотологическое значение мышей рода *Sylvaeus* (как носителя данной инфекции, так и прокормителя иксодид). Мыши рода *Sylvaeus* на территории очага являются наиболее многочисленным и относительно стабильным видом в отличие от *M. arvalis* и *M. musculus*, показатели численности которых длительное время находятся на низком уровне, что значительно снижает эпизоотическое значение этих видов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дунаева Т.Н. Экспериментальное исследование туляремии у диких животных (грызунов, хищников и насекомоядных) как основа изучения природных очагов этой инфекции. *Зоол. журн.* 1954; 2(33):296–318.
2. Левченко Б.И., Дегтярева Л.В., Тихенко Н.И., Солодовников Б.В., Брюханов А.Ф. Циклы солнечной активности и динамика численности мелких млекопитающих на территории природного очага туляремии. В кн.: Циклы. Матер. VII междунар. конф. Ставрополь: Сев-КавГТУ; 2005. С. 189–92.
3. Левченко Б.И., Тихенко Н.И., Дегтярева Л.В., Цыганкова Р.Е., Брюханов А.Ф. Эпизоотическая значимость различных биотопов микроочага «Сенгилеевский». В кн.: Сб. науч. трудов, посв. 50-летию Дагестанской противочумной станции. Махачкала: ДПЧС; 2002. С. 81–5.
4. Попов П.Н., Ртищева Л.В., Дегтярева Л.В., Левченко Б.И., Тихенко Н.И., Остапович В.В. Эпизоотическая активность природного очага туляремии в Ставропольском крае. *Мед. вестник Сев. Кавказа.* 2011; 4(24):44–7.
5. Тихенко Н.И., Левченко Б.И., Брюханов А.Ф., Дегтярева Л.В., Цыганкова Р.Е., Антоненко А.Д. Эпизоотическое значение землероек белозубок в природном очаге туляремии степного типа в Ставропольском крае. *Мед. паразитол. и паразитарн. бол.* 2001; 2:46–8.

#### References

1. Dunaeva T.N. [Experimental investigations of tularemia in the wild animals such as rodents, predators, and insects as a basis of its natural foci studies]. *Zool. Zh.* 1954; 2(33):296–318.
2. Levchenko B.I., Degtyareva L.V., Tikhenco N.I., Solodovnikov B.V., Bryukhanov A.F. [Solar cycles and abundance rate dynamics in small mammals habitat in the territory of natural tularemia focus]. In: [Cycles. Proceedings of the VII International Conference]. Stavropol; 2005. P. 189–92.
3. Levchenko B.I., Tikhenco N.I., Degtyareva L.V., Tsygankova R.E., Bryukhanov A.F. [Epizootic significance of various biotopes in micro-focus "Sengilevsky"]. In: [Collection of Scholarly Works Devoted to the 50<sup>th</sup> Anniversary of Dagestan Plague Control Station Establishment]. Makhachkala; 2002. P. 81–5.
4. Popov P.N., Rtishcheva L.V., Degtyareva L.V., Levchenko B.I., Tikhenco N.I., Ostapovich V.V. [Epizootic activity of natural tularemia focus in the Stavropol region]. *Med. Vestnik Severn. Kavkaza.* 2011; 4(24):44–7.
5. Tikhenco N.I., Levchenko B.I., Bryukhanov A.F., Degtyareva L.V., Tsygankova R.E., Antonenko A.D. [Epizootic significance of the musk white-toothed shrews in the natural steppe-type tularemia focus of the Stavropol region]. *Med. Parazitol. Parazitarn. Bol.* 2001; 2:46–8.

#### Authors:

Levchenko B.I., Degtyareva L.V., Zaitsev A.A., Grigor'ev M.P., Ostapovich V.V. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

#### Об авторах:

Левченко Б.И., Дегтярева Л.В., Зайцев А.А., Григорьев М.П., Остапович В.В. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 31.03.14.

А.М.Маркин, М.А.Гришина, Е.Н.Кочубеева

## ЭПИДЕМИОЛОГИЯ БЛАСТОМИКОЗА И ПАРАКОКЦИДИОИДОМИКОЗА

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград,  
Российская Федерация

В последние годы отчетливо наблюдается увеличение туристического потока, укрепление социально-экономических связей между странами. Процессы глобализации мировой экономики, рост уровня транспортного сообщения между странами, миграция больших количеств людей формирует предпосылки к распространению новых инфекционных заболеваний на территории России и стран СНГ. Завозные случаи бластомикоза и паракокцидиоидомикоза уже зарегистрированы во многих странах Европы и Азии у лиц, посетивших эндемичные страны. Учитывая это, весьма вероятно возможность нахождения в России инфицированных или больных. Целью нашего обзора является представление данных, свидетельствующих о необходимости совершенствования методов эпидемиологического контроля бластомикоза и паракокцидиоидомикоза. Диагностические исследования должны проводиться сертифицированным персоналом в специализированных лабораториях, отвечающих необходимым требованиям безопасности. Таким образом, информированность о данных заболеваниях как можно большего количества специалистов гарантирует успешную реализацию стратегий диагностики и лечения.

*Ключевые слова:* эпидемиология, бластомикоз, паракокцидиоидомикоз, Референс-центр.

А.М.Маркин, М.А.Гришина, Е.Н.Кочубеева

### Epidemiology of Blastomycosis and Paracoccidioidomycosis

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation

In recent years, an increase of tourist flow, strengthening of social and economic connections between the countries take place. The processes of the world economy globalization, development of international transport systems, and migration of population form pre-conditions for the spread of new infectious diseases in the territory of Russia and CIS countries. Imported cases of blastomycosis and paracoccidioidomycosis are already registered in many countries of Europe and Asia among persons who returned from endemic countries. Thus, it is likely to find infected persons and patients in Russia. The purpose of our review is to provide data indicating the need for improvement of methods for epidemiological control of blastomycosis and paracoccidioidomycosis. Diagnostic studies should be carried out by competent personnel in specialized laboratories that meet the necessary safety requirements. Thus, awareness about these diseases of as many experts as possible, guarantees the successful implementation of strategies for diagnostics and treatment.

*Key words:* epidemiology, blastomycosis, paracoccidioidomycosis, Reference Center.

На протяжении последних десятилетий исследователи отмечают прогрессивный рост заболеваемости микозами. Так, по данным ВОЗ, 20 % населения всего мира, т.е. каждый пятый житель планеты, поражен грибковой инфекцией [1]. Распространение ятрогенных иммунодефицитных состояний вследствие массивной антибиотикотерапии, длительного использования глюкокортикоидных и иммуносупрессивных препаратов при онкологических заболеваниях, болезнях крови или трансплантации органов, увеличение случаев сахарного диабета, а также пандемия ВИЧ-инфекции привели к увеличению численности иммуноскомпрометированных пациентов с высоким риском развития тяжелых системных микозов.

Среди возбудителей микотических инфекций особое место занимают первично-патогенные грибы, вызывающие глубокие микозы у лиц с нормальным иммунным статусом. К их числу относятся возбудители бластомикоза и паракокцидиоидомикоза – *Blastomyces dermatitidis* и *Paracoccidioides brasiliensis*. Это диморфные грибы, которые в почве существуют в виде мицелия, а попадая в организм млекопитающих, трансформируются в высокоспециализированные паразитарные формы. В соответствии с СП 1.3.1285-03 этиологические агенты указанных заболеваний относятся ко II группе патогенности (опасности). В соответствии с категориями биологи-

ческого риска ВОЗ относит *Blastomyces dermatitidis* и *Paracoccidioides brasiliensis* к 3-й группе риска (BSL 3), что соответствует высокому уровню риска для человека и низкому для человеческой популяции.

Бластомикоз и паракокцидиоидомикоз являются эндемичными для многих стран Америки и Африки, и малоизвестны врачам и биологам нашей страны, поскольку в России случаи заболевания особо опасными микозами официально не зарегистрированы. Учитывая расширяющиеся взаимные связи между странами, увеличение потока туристов, весьма вероятно возможность нахождения в России инфицированных или больных. Завозные случаи бластомикоза и паракокцидиоидомикоза зарегистрированы во многих странах Европы и Азии у лиц, посетивших эндемичные страны. Диагностика бластомикоза и паракокцидиоидомикоза затруднена в связи с отсутствием специфических симптомов и большого разнообразия клинических форм заболеваний, и по причине низкой осведомленности врачей общей практики относительно глубоких микозов. Знание эпидемиологических особенностей бластомикоза и паракокцидиоидомикоза позволяет предположить диагноз, а значит, своевременно провести необходимое лабораторное исследование и назначить адекватное лечение.

*Эпидемиология бластомикоза.* Исследование

распространения возбудителя осложнено трудностью выделения его чистой культуры. Инкубационный период бластомикоза чрезвычайно варьирует и составляет от нескольких недель до нескольких месяцев. По этой причине больные бластомикозом зачастую оказываются не в состоянии точно указать свое местонахождение и вид деятельности на момент заражения [27]. Эпидемиологическая характеристика бластомикоза основывается на результатах исследования вспышек и спорадических случаев инфекции.

В настоящее время в эндемичной зоне бластомикоза находятся южные и восточные штаты центральной области США, расположенные в пределах бассейна рек Миссисипи и Огайо, Средний Запад, канадские провинции, граничащие с Великими Озерами, а также небольшие области вдоль берегов реки св. Лоуренса на территории Нью-Йорка и Канады. Спорадические случаи встречаются на территории американских штатов Колорадо, Техас, Канзас и Небраска, но большая часть регистрируется в штатах Миссисипи, Арканзас, Кентукки, Теннесси и Висконсин [12, 13, 14, 16, 28, 31, 41, 44].

Бластомикоз широко распространен и на африканском континенте. Заболевание известно в 18 странах, но чаще всего микоз встречается в южной части материка, особенно в Южно-Африканской республике и Зимбабве [5, 10]. По данным некоторых исследователей, автохтонные случаи заболевания имеют место также и на территории Индии [20].

Единичные завозные случаи бластомикоза отмечены на Гавайских островах, некоторых странах Европы (Италия, Франция, Венгрия, Польша) и на Среднем Востоке [14, 26].

Основной способ заражения – ингаляционный. Инкубационный период составляет в среднем 30–45 дней [19]. Крайне редко наблюдалась передача бластомикоза от человека к человеку: при половом контакте с больным мужчиной, с диссеминацией возбудителя в предстательную железу [14]; при трансплацентарном инфицировании новорожденного [29]; при вскрытии трупа больного [45]. Известен пример заражения человека бластомикозом при укусе больным животным [25]. Это основной механизм травматической имплантации возбудителя, для развития первичной кожной формы достаточно двух недель.

Заболевание чаще наблюдается у контактирующих с почвой (фермеры, охотники, рыболовы и лица, занимающиеся спортивным туризмом) [40]. Это почва вблизи водоемов, богатая органическими остатками. *B. dermatitidis* вызывает более тяжелые формы заболевания у людей, имеющих дефекты клеточного иммунитета, в том числе ВИЧ-инфицированных, реципиентов органов, лиц, получающих иммуносупрессивную терапию. Пациенты в этой группе имеют более высокий уровень смертности (30–40 %) вследствие более высокого риска развития осложнений [30].

**Эпидемиология паракокцидиоидомикоза.** Географическое распространение паракокцидиоидомикоза ограничено Латинской и Южной Америкой.

В Бразилии зарегистрировано примерно 80 % из всех описанных случаев, затем следуют Колумбия, Венесуэла, Эквадор и Аргентина [4, 37, 38]. Редкие случаи заболевания отмечены в Мексике и странах Центральной Америки.

Неравномерное распределение паракокцидиоидомикоза наблюдается и внутри эндемичных стран. Например, чаще всего заболевание регистрируется в Бразилии [3, 23]. Отмечено также, что в последние десятилетия область распространения паракокцидиоидомикоза даже в Бразилии заметно расширяется, это связывают, в первую очередь, с увеличением площади земель, занятых в сельском хозяйстве.

Информация о случаях инфицирования и распространения этого заболевания ограничена, поскольку паракокцидиоидомикоз так же, как и бластомикоз не подлежит обязательной регистрации в эндемичных странах. Согласно имеющимся данным, из 90 млн человек, живущих в эндемичных регионах, инфицированы, по крайней мере, 10 млн, причем заболевание развивается примерно у 2 % инфицированных [3, 4, 15, 33]. Ежегодная заболеваемость в Бразилии составляет 1–3 случая (летальность – 2–23 %), в Колумбии – 0,05–0,2 на 100 тыс. населения [20, 32].

Экологическая ниша *P. brasiliensis* остается неуточненной. Гриб спорадически был выделен из почвы эндемичных районов [42], помета летучих мышей *Artibeus lituratus* [26], пингвинов *Pygoscelis adeliae* [24], корма собак [21].

Главный недостаток этих работ заключается в том, что все находки были единичны, воспроизвести подобные исследования пока никому не удалось [22]. Кроме того, для паракокцидиоидомикоза характерно наличие длительного латентного периода, а вспышек заболевания никогда не наблюдалось, все это еще больше затрудняет отслеживание возбудителя в окружающей среде [9].

Последние данные свидетельствуют о распространении гриба среди броненосцев (*Dasypus novemcinctus*, *Cabassous centralis*), у которых гриб накапливается во внутренних органах. Возбудитель неоднократно выделялся из селезенки, печени и легких здоровых броненосцев [7, 8, 17, 18, 31, 35, 43].

Подавляющее большинство случаев паракокцидиоидомикоза зафиксировано в районах, расположенных на плоскогорье (до 1500 м над уровнем моря), с тропическим или субтропическим климатом (невысокие температуры: 17–24 °С, умеренные осадки: 500–2500 мм в год) и кислыми почвами [11, 39]. В таких условиях грибы живут как сапрофиты растений или почвы [4]. Развитие инфекции у людей происходит вследствие ингаляции спор. В редких случаях инфицирование опосредовано травматической имплантацией возбудителя. Местное население часто использует веточки и листья как средства гигиены полости рта, что приводит к поражению окружающих тканей, вызывая тотальный некроз и формируя специфическую картину процесса, т.н. «лягушачий рот» [36, 37, 38, 39]. Основная группа пациентов – это сельскохозяйственные рабочие или

ВИЧ-инфицированные [38].

Данные, представленные в обзоре, свидетельствуют о необходимости совершенствования методов эпидемиологического контроля бластомикоза и параккокцидиомикоза, так как до сих пор нет полной информации о распространении данных заболеваний в связи с отсутствием их обязательной регистрации. Также важно отметить сложность своевременной и точной диагностики. Для постановки окончательного диагноза необходимо выделение чистой культуры возбудителя. Диагностические исследования должны проводиться сертифицированным персоналом в специализированных лабораториях с оборудованием, отвечающим необходимым требованиям безопасности, т.к. *B. dermatitidis* и *P. brasiliensis* относятся ко II группе патогенности. Для обеспечения современного уровня лабораторной диагностики, а также предупреждения завоза возбудителей глубоких микозов и их распространения на территории Российской Федерации приказом Руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 17.03.2008 г. № 88 на базе ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» создан Референс-центр по мониторингу за возбудителями глубоких микозов, являющийся научным, консультационно-методическим, диагностическим и экспертным органом на территории Российской Федерации.

Лаборатории организаций здравоохранения или иных учреждений, ведущих исследовательскую, диагностическую и лечебную работу, при наличии подозрений на инфицирование пациента микромицетами, относящихся к группе особо опасных инфекций, должны в кратчайшее время направить биологический материал для исследования в Референс-центр по мониторингу за возбудителями глубоких микозов, функционирующий на базе Волгоградского научно-исследовательского противочумного института. Необходимо учитывать, что к группе риска относятся не только лица, въезжающие на территорию РФ, но и граждане России, посещающие регионы, входящие в число потенциально опасных по данным возбудителям. Учреждения Госсанэпиднадзора и Здравоохранения РФ должны быть готовы столкнуться с данным заболеванием и адекватно подойти к вопросам диагностики и лечения.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аравийский Р.А., Климов Н.Н., Горшкова Г.И. Диагностика микозов. СПб.: СПбМАПО; 2004. 186 с.
2. Abadio A.K., Kioshima E.S., Teixeira M.M., Martins N.F., Maigret B., Felipe M.S. Comparative genomics allowed the identification of drug targets against human fungal pathogens. *BMC Genomics*. 2011; 12:75.
3. Almeida O.P., Jacks J.Jr., Scully C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2003; 14(5):377–83.
4. Almeida S.M. Central nervous system paracoccidioidomycosis: an overview. *Braz. J. Infect. Dis.* 2005; 9(2):126–33.
5. Alvarez G.G., Burns B.F., Desjardins M., Salahudeen S.R., AlRashidi F., Cameron D.W. Blastomycosis in a young African man presenting with a pleural effusion. *Can. Respir. J.* 2006; 13(8):441–4.
6. Arnett M.V., Fraser S.L., Grbach V.X. Pulmonary blastomycosis diagnosed in Hawaii. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*. 2008; 39(4):701–5.
7. Bagagli E., Franco M., Bosco Sde M., Hebel-Barbosa F.,

Trinca L.A., Montenegro M.R. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med. Mycol.* 2003; 41(3):217–23.

8. Bagagli E., Sano A., Coelho K.I., Alquati S., Miyaji M., de Camargo Z.P., Gomes G.M., Franco M., Montenegro M.R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998; 58(4):505–12.

9. Bagagli E., Theodoro R.C., Bosco S.M., McEwen J.G. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia*. 2008; 165(4–5):197–207.

10. Baily G.G., Robertson V.J., Neill P., Garrido P., Levy L.F. Blastomycosis in Africa: clinical features, diagnosis, and treatment. *Rev. Infect. Dis.* 1991; 13(5):1005–8.

11. Barrozo L.V., Mendes R.P., Marques S.A., Benard G., Silva M.E., Bagagli E. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. *Int. J. Epidemiol.* 2009; 38(6):1642–9.

12. Baumgardner D.J., Steber D., Glazier R., Paretsky D.P., Egan G., Baumgardner A.M., Prigge D. Geographic information system analysis of blastomycosis in northern Wisconsin, USA: waterways and soil. *Med. Mycol.* 2005; 43(2):117–25.

13. Baumgardner D.J., Knavel E.M., Steber D., Swain G.R. Geographic distribution of human blastomycosis cases in Milwaukee, Wisconsin, USA: association with urban watersheds. *Mycopathologia*. 2006; 161(5):275–82.

14. Bradsher R.W., Chapman S.W., Pappas P.G. Blastomycosis. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 2003; 17(1):21–40.

15. Butler M.I., Poulter R.T. The PRP8 inteins in *Cryptococcus* are a source of phylogenetic and epidemiological information. *Fungal Genet. Biol.* 2005; 42(5):452–63.

16. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Blastomycosis – Wisconsin, 1986–1995. *MMWR Morb. Mortal Wkly Rep.* 1996; 45:601–3.

17. Corredor G.G., Castaño J.H., Peralta L.A., Díez S., Arango M., McEwen J., Restrepo A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus* in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. *Rev. Iberoam. Micol.* 1999; 16(4):216–20.

18. Corredor G.G., Peralta L.A., Castaño J.H., Zuluaga J.S., Henao B., Arango M., Tabares A.M., Matute D.R., McEwen J.G., Restrepo A. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Med. Mycol.* 2005; 43(3):275–80.

19. Dworkin M.S., Duckro A.N., Froia L., Semel J.D., Huhn G. The epidemiology of blastomycosis in Illinois and factors associated with death. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 41(12):107–11.

20. Felipe M.S., Torres F.A., Maranhão A.Q., Silva-Pereira I., Pocas-Fonseca M.J., Campos E.G., Moraes L.M., Arraes F.B., Carvalho M.J., Andrade R.V., Nicola A.M., Teixeira M.M., Jesuino R.S., Pereira M., Soares C.M., Brígido M.M. Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2005; 45(3):369–81.

21. Ferreira M.S., Freitas L.H., Lacaz Cda S., del Negro G.M., de Melo N.T., Garcia N.M., de Assis C.M., Salebian A., Heins-Vaccari E.M. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dogfood probably contaminated with soil in Uberlandia, Brazil. *J. Med. Vet. Mycol.* 1990; 28(3):253–6.

22. Franco M., Bagagli E., Scapolio S., da Silva Lacaz C. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med. Mycol.* 2000; 38(3):185–91.

23. Franco M., Sano A., Kera K., Nishimura K., Takeo K., Miyaji M. Chlamydospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 1989; 31(3):151–7.

24. Garcia N.M., Del Negro G.M., Heins-Vaccari E.M., de Melo N.T., de Assis C.M., Lacaz Cda S. *Paracoccidioides brasiliensis*, a new sample isolated from feces of a penguin (*Pygoscelis adeliae*). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 1993; 35(3):227–35.

25. Gnann J.W.Jr., Bressler G.S., Bodet C.A. 3rd, Avent C.K. Human blastomycosis after a dog bite. *Ann. Intern. Med.* 1983; 98(1):48–9.

26. Greer D.L., Bolanos B. Role of bats in the ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: the survival of *Paracoccidioides brasiliensis* in the intestinal tract of frugivorous bat, *Artibeus lituratus*. *Sabouraudia*. 1977; 15(3):273–82.

27. Gruszka S.J. Associations of genetic variation and clinical characteristics of *Blastomyces dermatitidis* infections in Wisconsin. College of Science and Health Biology – Clinical Microbiology. 2010; 93 p.

28. Klein B.S., Vergeront J.M., DiSalvo A.F., Kaufman L., Davis J.P. Two outbreaks of blastomycosis along rivers in Wisconsin. Isolation of *Blastomyces dermatitidis* from riverbank soil and evidence of its transmission along waterways. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987; 136(6):1333–8.

29. Lemos L.B., Soofi M., Amir E. Blastomycosis and pregnancy. *Ann. Diagn. Pathol.* 2002; 6(4):211–5.

30. Lemos L.B., Baliga M., Guo M. Acute respiratory distress syndrome and blastomycosis: presentation of nine cases and review of the literature. *Ann. Diagn. Pathol.* 2001; 5(1):1–9.

31. Macoris S.A., Sugizaki M.F., Peraçoli M.T., Bosco S.M., Hebel-Barbosa F., Simões L.B., Theodoro R.C., Trinca L.A., Bagagli E. Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos and patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2006; 101(3):331–4.
32. Malcolm D. Richardson, Warnock D.W. Fungal Infection diagnosis and management. 3rd ed. Blackwell Publishing; 2003. 366 p.
33. McEwen J.G., Garcia A.M., Ortiz B.L., Botero S., Restrepo A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch. Med. Res.* 1995; 26(3):305–6.
34. Meyer K.C., McManus E.J., Maki D.G. Overwhelming pulmonary blastomycosis associated with the adult respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1993; 329(17):1231–6.
35. Nishikaku A.S., Peraçoli M.T., Bagagli E., Sugizaki M.F., Sartori A. Experimental infections with *Paracoccidioides brasiliensis* obtained from armadillos: comparison to clinical isolates. *Braz. J. Infect. Dis.* 2008; 12(1):57–62.
36. Paiva L.J., Lacaz C.S. Oropharyngeolaryngeal lesions. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton (FL): CRC Press; 1994; P. 267–9.
37. Ramos-e-Silva M. Facial and oral aspects of some venereal and tropical diseases. *Acta Dermatovenerol. Croat.* 2004; 12(3):173–80.
38. Ramos-e-Silva M., Luciana do E.S.S. Paracoccidioidomycosis. *Dermatol. Clin.* 2008; 26:257–269.
39. Rivitti E.A., Aoki V. Deep fungal infections in tropical countries. *Clin. Dermatol.* 1999; 17(2):171–90.
40. Saccante M., Woods G.L. Clinical and laboratory update on blastomycosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2010; 23(2):367–81.
41. Sarosi G.A. Fungal infections and their treatment in the intensive care unit. *Curr. Opin. Crit. Care.* 2006; 12(5):464–9.
42. Shome S.K., Batista A.C. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife, Brazil. *Rev. Fac. Med. Univ. Fed. Ceara.* 1963; 3:90–94.
43. Silva-Vergara M.L., Martinez R., Camargo Z.P., Malta M.H., Maffei C.M., Chada J.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasyus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. *Med. Mycol.* 2000; 38(3):193–9.
44. Smith J.A., Kauffman C.A. Blastomycosis. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2010; 7(3):173–80.
45. Wilson J.W., Cawley E.P., Weidman F.D., Gilmer W.S. Primary cutaneous North American blastomycosis. *AMA Arch Derm.* 1955; 71(1):39–45.
- McEwen J., Restrepo A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasyus novemcinctus* in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. *Rev. Iberoam. Micol.* 1999; 16(4):216–20.
18. Corredor G.G., Peralta L.A., Castaño J.H., Zuluaga J.S., Henaó B., Arango M., Tabares A.M., Matute D.R., McEwen J.G., Restrepo A. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Med. Mycol.* 2005; 43(3):275–80.
19. Dworkin M.S., Duckro A.N., Proia L., Semel J.D., Huhn G. The epidemiology of blastomycosis in Illinois and factors associated with death. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 41(12):107–11.
20. Felipe M.S., Torres F.A., Maranhão A.Q., Silva-Pereira I., Pocas-Fonseca M.J., Campos E.G., Moraes L.M., Arraes F.B., Carvalho M.J., Andrade R.V., Nicola A.M., Teixeira M.M., Jesuino R.S., Pereira M., Soares C.M., Brígido M.M. Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2005; 45(3):369–81.
21. Ferreira M.S., Freitas L.H., Lacaz Cda S., del Negro G.M., de Melo N.T., Garcia N.M., de Assis C.M., Salebian A., Heins-Vaccari E.M. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dogfood probably contaminated with soil in Uberlândia, Brazil. *J. Med. Vet. Mycol.* 1990; 28(3):253–6.
22. Franco M., Bagagli E., Scapolio S., da Silva Lacaz C. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med. Mycol.* 2000; 38(3):185–91.
23. Franco M., Sano A., Kera K., Nishimura K., Takeo K., Miyaji M. Chlamydospore formation by *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 1989; 31(3):151–7.
24. Garcia N.M., Del Negro G.M., Heins-Vaccari E.M., de Melo N.T., de Assis C.M., Lacaz Cda S. *Paracoccidioides brasiliensis*, a new sample isolated from feces of a penguin (*Pygoscelis adeliae*). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 1993; 35(3):227–35.
25. Gnann J.W., Jr., Bressler G.S., Bodet C.A. 3rd, Avent C.K. Human blastomycosis after a dog bite. *Ann. Intern. Med.* 1983; 98(1):48–9.
26. Greer D.L., Bolanos B. Role of bats in the ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: the survival of *Paracoccidioides brasiliensis* in the intestinal tract of frugivorous bat, *Artibeus lituratus*. *Sabouraudia.* 1977; 15(3):273–82.
27. Gruszka S.J. Associations of genetic variation and clinical characteristics of *Blastomyces dermatitidis* infections in Wisconsin. College of Science and Health Biology – Clinical Microbiology. 2010; 93 p.
28. Klein B.S., Vergeront J.M., DiSalvo A.F., Kaufman L., Davis J.P. Two outbreaks of blastomycosis along rivers in Wisconsin. Isolation of *Blastomyces dermatitidis* from riverbank soil and evidence of its transmission along waterways. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1987; 136(6):1333–8.
29. Lemos L.B., Soofi M., Amir E. Blastomycosis and pregnancy. *Ann. Diagn. Pathol.* 2002; 6(4):211–5.
30. Lemos L.B., Baliga M., Guo M. Acute respiratory distress syndrome and blastomycosis: presentation of nine cases and review of the literature. *Ann. Diagn. Pathol.* 2001; 5(1):1–9.
31. Macoris S.A., Sugizaki M.F., Peraçoli M.T., Bosco S.M., Hebel-Barbosa F., Simões L.B., Theodoro R.C., Trinca L.A., Bagagli E. Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos and patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2006; 101(3):331–4.
32. Malcolm D. Richardson, David W. Warnock. Fungal Infection diagnosis and management. 3rd ed. Blackwell Publishing; 2003. 366 p.
33. McEwen J.G., Garcia A.M., Ortiz B.L., Botero S., Restrepo A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch. Med. Res.* 1995; 26(3):305–6.
34. Meyer K.C., McManus E.J., Maki D.G. Overwhelming pulmonary blastomycosis associated with the adult respiratory distress syndrome. *N. Engl. J. Med.* 1993; 329(17):1231–6.
35. Nishikaku A.S., Peraçoli M.T., Bagagli E., Sugizaki M.F., Sartori A. Experimental infections with *Paracoccidioides brasiliensis* obtained from armadillos: comparison to clinical isolates. *Braz. J. Infect. Dis.* 2008; 12(1):57–62.
36. Paiva L.J., Lacaz C.S. Oropharyngeolaryngeal lesions. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton (FL): CRC Press; 1994; P. 267–9.
37. Ramos-e-Silva M. Facial and oral aspects of some venereal and tropical diseases. *Acta Dermatovenerol. Croat.* 2004; 12(3):173–80.
38. Ramos-e-Silva M., Luciana do E.S.S. Paracoccidioidomycosis. *Dermatol. Clin.* 2008; 26:257–269.
39. Rivitti E.A., Aoki V. Deep fungal infections in tropical countries. *Clin. Dermatol.* 1999; 17(2):171–90.
40. Saccante M., Woods G.L. Clinical and laboratory update on blastomycosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 2010; 23(2):367–81.
41. Sarosi G.A. Fungal infections and their treatment in the intensive care unit. *Curr. Opin. Crit. Care.* 2006; 12(5):464–9.
42. Shome S.K., Batista A.C. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife, Brazil. *Rev. Fac. Med. Univ. Fed. Ceara.* 1963; 3:90–94.
43. Silva-Vergara M.L., Martinez R., Camargo Z.P., Malta M.H., Maffei C.M., Chada J.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasyus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. *Med. Mycol.* 2000; 38(3):193–9.
44. Smith J.A., Kauffman C.A. Blastomycosis. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2010; 7(3):173–80.
45. Wilson J.W., Cawley E.P., Weidman F.D., Gilmer W.S. Primary cutaneous North American blastomycosis. *AMA Arch Derm.* 1955; 71(1):39–45.

## References

1. Araviysky R.A., Klimko N.N., Gorshkova G.I. [Diagnostics of Mycoses]. SPb.; 2004. 186 p.
2. Abadio A.K., Kioshima E.S., Teixeira M.M., Martins N.F., Maigret B., Felipe M.S. Comparative genomics allowed the identification of drug targets against human fungal pathogens. *BMC Genomics.* 2011; 12:75.
3. Almeida O.P., Jacks J.Jr., Scully C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2003; 14(5):377–83.
4. Almeida S.M. Central nervous system paracoccidioidomycosis: an overview. *Braz. J. Infect. Dis.* 2005; 9(2):126–33.
5. Alvarez G.G., Burns B.F., Desjardins M., Salahudeen S.R., AlRashidi F., Cameron D.W. Blastomycosis in a young African man presenting with a pleural effusion. *Can. Respir. J.* 2006; 13(8):441–4.
6. Arnett M.V., Fraser S.L., Grbach V.X. Pulmonary blastomycosis diagnosed in Hawaii. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 2008; 39(4):701–5.
7. Bagagli E., Franco M., Bosco Sde M., Hebel-Barbosa F., Trinca L.A., Montenegro M.R. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasyus novemcinctus*): an ecological study. *Med. Mycol.* 2003; 41(3):217–23.
8. Bagagli E., Sano A., Coelho K.I., Alquati S., Miyaji M., de Camargo Z.P., Gomes G.M., Franco M., Montenegro M.R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasyus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998; 58(4):505–12.
9. Bagagli E., Theodoro R.C., Bosco S.M., McEwen J.G. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia.* 2008; 165(4–5):197–207.
10. Baily G.G., Robertson V.J., Neill P., Garrido P., Levy L.F. Blastomycosis in Africa: clinical features, diagnosis, and treatment. *Rev. Infect. Dis.* 1991; 13(5):1005–8.
11. Barrozo L.V., Mendes R.P., Marques S.A., Benard G., Silva M.E., Bagagli E. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyperendemic area in Brazil. *Int. J. Epidemiol.* 2009; 38(6):1642–9.
12. Baumgardner D.J., Steber D., Glazier R., Paretsky D.P., Egan G., Baumgardner A.M., Prigge D. Geographic information system analysis of blastomycosis in northern Wisconsin, USA: waterways and soil. *Med. Mycol.* 2005; 43(2):117–25.
13. Baumgardner D.J., Knavel E.M., Steber D., Swain G.R. Geographic distribution of human blastomycosis cases in Milwaukee, Wisconsin, USA: association with urban watersheds. *Mycopathologia.* 2006; 161(5):275–82.
14. Bradsher R.W., Chapman S.W., Pappas P.G. Blastomycosis. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* 2003; 17(1):21–40.
15. Butler M.I., Poulter R.T. The PRP8 intein in *Cryptococcus* are a source of phylogenetic and epidemiological information. *Fungal Genet. Biol.* 2005; 42(5):452–63.
16. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Blastomycosis – Wisconsin, 1986–1995. *MMWR Morb. Mortal Wkly Rep.* 1996; 45:601–3.
17. Corredor G.G., Castaño J.H., Peralta L.A., Diez S., Arango M.,

## Authors:

Markin A.M., Grishina M.A., Kochubeeva E.N. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

## Об авторах:

Маркин А.М., Гришина М.А., Кочубеева Е.Н. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 14.04.14.

Е.В.Сазанова, Т.А.Малюкова, Ю.А.Попов

## УЧЕБНЫЕ ШТАММЫ *YERSINIA PESTIS*: КРИТЕРИИ ПОДБОРА, ПРИНЦИПЫ ПРИМЕНЕНИЯ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Целью работы была разработка критериев подбора штаммов *Yersinia pestis* в качестве учебных, принципов формирования и применения набора штаммов для проведения практических занятий по лабораторной и дифференциальной диагностике чумы. Изучены подзаконные акты Российской Федерации, нормативные и методические документы по лабораторной диагностике чумы и биобезопасности работ с микроорганизмами; программы обучения специалистов для работ с возбудителями особо опасных инфекций. Метод исследования: аналитический. В результате сформулированы определение понятия «учебный штамм», критерии подбора штаммов возбудителя чумы для практических занятий в рамках учебного модуля «Микробиология и лабораторный диагноз чумы» и алгоритм применения его с целью снижения биологических рисков в учебном процессе.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, учебные штаммы, подготовка специалистов, биологическая безопасность.

E.V.Sazanova, T.A.Malyukova, Yu.A.Popov

### Dummy *Yersinia pestis* Strains: Selection Criteria, Usage Guidelines

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

Objective of the work was to develop selection criteria for the dummy *Y. pestis* strains, as well as principles of the setting-up a panel and its application for practicing laboratory and differential diagnostics of plague. Studied were the RF regulations, statutory documents and methodological recommendations on the laboratory diagnostics of plague and safety of works with microorganisms; training courses for specialists to qualify for work with the agents of particularly dangerous infections. Research method: analytical. Consequently, established were the term for "dummy strain"; selection criteria for the *Y. pestis* strains used in the practical course within the frames of the training programme "Microbiology and Laboratory Diagnosis of Plague"; and algorithm of the course application in view of biological risk mitigation during the process of education.

Key words: *Yersinia pestis*, dummy strains, specialists training, biological safety.

Чума – особо опасная инфекционная болезнь, возбудитель которой относится к I группе патогенности. В ходе развития цивилизации известно три пандемии чумы, унесшие миллионы человеческих жизней. В отсутствие эпидемий штаммы *Yersinia pestis* постоянно циркулируют в природных очагах, в том числе на территории Российской Федерации (11 очагов с общей площадью  $\approx 254$  тыс. га) [4]. Одним из основных методов эпидемиологического надзора за очагами является лабораторная диагностика чумы у носителей и переносчиков возбудителя, больных людей, а также лиц, контактировавших с больными и инфицированными объектами окружающей среды [5]. Подготовка специализированных кадров осуществляют на базе противочумных учреждений Роспотребнадзора. Актуальность обучения по микробиологии, эпидемиологии и лабораторной диагностике чумы обусловлена также и тем, что возбудитель отнесен к категории А вероятных агентов биотерроризма [1].

Подготовку специалистов для работ с возбудителями особо опасных инфекций (ООИ) на базе ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» осуществляют с 1924 г., основываясь как на проверенных временем традиционных методиках, так и на активно внедряемых современных обучающих технологиях. При совершенствовании обучения персонала для работы с патогенными биологическими агентами I–II групп (ПБА) нельзя не учи-

тывать государственные подходы к стандартизации и обеспечению безопасности любого вида деятельности, изложенные в ФЗ № 184 «О техническом регулировании» (с последними изменениями от 28.12.13) и «Основах государственной политики в области обеспечения химической и биологической безопасности Российской Федерации на период до 2025 г. и дальнейшую перспективу» (утвержденные Президентом РФ 01.11.2013 г. № Пр-2573). В связи с этим актуальными являются разработка стандартизированных методических подходов, операционных процедур для подготовки специалистов и необходимость проведения научных исследований по снижению биологических рисков обучающих технологий путем максимального сокращения использования патогенных микроорганизмов в технологических процессах.

Обязательным разделом программ профессиональной переподготовки бактериологов, эпидемиологов, зоологов, лаборантов для работы с возбудителями ООИ является учебный модуль «Микробиология и лабораторная диагностика чумы», состоящий из теоретических и практических занятий. Отдельные разделы модуля используют при проведении практических занятий на курсах повышения квалификации по семи учебным программам. Необходимо отметить, что подбор штаммов для практических занятий на курсах определяет преподаватель, ответственный за их проведение. Отсутствуют критерии отбора штаммов воз-

будителя чумы в качестве учебных, а также соответствующие нормативные и методические документы. Не сформулировано само понятие «учебный штамм».

Целью работы была разработка критериев подбора штаммов *Y. pestis* в качестве учебных, а также принципов формирования и применения набора штаммов для обеспечения практических занятий по лабораторной и дифференциальной диагностике чумы.

### Материалы и методы

Законодательные и подзаконные акты Российской Федерации, нормативные и методические документы по лабораторной диагностике чумы и биобезопасности работ с ПБА; учебные программы профессиональной переподготовки для работ с возбудителями ООИ и повышения квалификации. Метод исследования: аналитический.

### Результаты и обсуждение

Для достижения поставленной цели нами были проанализированы учебные планы практических занятий в рамках учебного модуля «Микробиология и лабораторная диагностика чумы» и нормативно-методические документы, регламентирующие диагностические исследования на чуму [3, 6]. Определено, что в Российской Федерации лабораторную диагностику чумы осуществляют учреждения Роспотребнадзора, функционирующие в рамках единой системы мониторинга, индикации и диагностики инфекционных болезней на трех уровнях: территориальном, региональном и федеральном. Для каждого уровня лабораторий нормативно закреплён перечень проводимых ими исследований [6].

Исходя из положений приказа руководителя Роспотребнадзора № 88 от 17.03.2008 г. «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней» и санитарных правил СП 1.3.1285-03 «Безопасность работ с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» специализированную переподготовку обязаны проходить работники учреждений регионального и федерального уровней. Сотрудники учреждений территориального уровня не проводят лабораторную диагностику чумы. Однако для решения определенных для них задач [6] должны освоить технику забора материала с соблюдением правил биобезопасности, хранения, транспортирования, учета, передачи патогенных биологических агентов. Специалисты учреждений регионального уровня должны владеть бактериологическими методами диагностики чумы, в том числе экспресс- и ускоренной диагностики (МФА, ПЦР, ИХ-тест, ИФА и другие), навыками обеспечения биобезопасности работ. Сотрудники учреждений федерального уровня, кроме владения вышеназванными методами и навыками, должны уметь идентифицировать выделенную бактериальную культуру по полной

схеме, включая молекулярно-генетические методы.

Таким образом, обучающий процесс, исходя из современных схем лабораторной диагностики чумы, включает следующие направления: изучение микробиологии возбудителя (морфология клетки, культуральные и физиолого-биохимические свойства), в том числе дифференциация от других патогенных иерсиний и возбудителей массовых эпизоотий грызунов; изучение патологоанатомической картины чумы у лабораторных животных. Финалом подготовки должно стать формирование специалиста, владеющего знаниями, умениями и навыками, позволяющими свободно решать профессиональные задачи. В результате анализа нормативно-методической базы в области лабораторной диагностики чумы и учебных программ нами впервые сформулирован перечень компетенций (знаний, умений, навыков), которые должен приобрести специалист в рамках учебного модуля «Микробиология и лабораторная диагностика чумы» (таблица).

Выработку навыков и умений на практических занятиях в настоящее время осуществляют с использованием как вакцинного штамма возбудителя чумы *Yersinia pestis* EV линии НИИЭГ, так и вирулентных штаммов. Использование последних связано с необходимостью освоения фенотипических и генотипических свойств, отличающихся от вакцинного штамма, а также отработки биологического метода, который является обязательным при лабораторной диагностике чумы. Вместе с тем слушатели курсов профессиональной переподготовки зачастую не владеют навыками выполнения микробиологических манипуляций в соответствии с правилами биобезопасности, что повышает риск неблагоприятного события – возникновения аварийной ситуации. Ранее нами был проведен ретроспективный анализ аварийных ситуаций при работе с ПБА слушателей курсов профессиональной переподготовки (1972–2009 гг.) [8]. Установлено, что 88,3 % аварий произошли в результате невнимательности, неаккуратности, недостаточной выработки навыков лабораторной работы у обучающихся. Следовательно, актуальным и приоритетным направлением совершенствования образовательных технологий является подбор штаммов возбудителя чумы, преимущественно вакцинных и со сниженной вирулентностью, для применения в качестве учебных. Вместе с тем информационный поиск выявил, что отсутствуют определение понятия «учебный штамм», соответствующие критерии подбора штаммов возбудителя чумы в качестве учебных, а также сведения о специализированных наборах штаммов для обучения лабораторной диагностике чумы.

Существует методика использования штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ для подготовки проб при проведении учений по обнаружению ПБА в объектах окружающей среды и материале от больных людей [7]. Однако планы практических занятий включают изучение всего многообразия биологических свойств различных подвидов возбудителя чумы, а также от-

Профессиональные компетенции специалиста

Компетенции	Индикаторы
Знать	Особенности морфологии, биохимии, физиологии, географического распространения и экологии патогенных иерсиний, возбудителя пастереллеза. Характеристику клеточных структур патогенных иерсиний. Антигенное строение чумного микроба, особенности иммунного ответа при чуме. Основы генетики патогенных иерсиний. Закономерности роста патогенных иерсиний в различных условиях культивирования. Методы изучения и применения бактериофагов, бактериоцинов чумного микроба. Схемы лабораторной диагностики чумы. Регламентированные методы исследования при индикации и идентификации возбудителя чумы, дифференциации от других патогенных для человека иерсиний.
Уметь	<p>Определить характер и объем материала, подлежащего исследованию, методы и сроки отбора проб. Организовать отбор и доставку материала в лабораторию. Определить условия, способ транспортировки и хранения материала для исследования. Окрашивать препараты простыми и сложными методами, проводить микроскопическую диагностику иерсиниозов. Выбрать необходимые тесты для индикации возбудителя чумы. Определить целесообразные методы и/или способы посева с целью выделения чистых культур возбудителя чумы. Определить оптимальный выбор питательных сред для посева нативного материала, а при необходимости для его обогащения. Определить качественные и количественные характеристики выросших бактериальных культур. Выделить чистые культуры микроорганизмов. Уметь поставить, учесть и оценить результаты МФА, ИФА, ИХ, ПЦР, реакции агглютинации, непрямои агглютинации и других. Выбрать необходимые тесты для идентификации возбудителя чумы до рода, вида, подвида. Идентифицировать выделенные культуры по морфологическим, тинкториальным, культуральным, биохимическим, антигенным свойствам. Определить антибиотикограмму. Определить чувствительность к бактериофагам. Воспроизводить инфекционный процесс на экспериментальных животных. Уметь определять вирулентность культур чумного микроба на экспериментальных животных и <i>in vitro</i>. Определить титр антител и наличие антигена в сыворотке крови. Трактовать результаты лабораторных методов исследования и дать обоснованный ответ по завершении исследования материала. Оформить учетно-отчетную документацию. Обеспечить обеззараживание инфекционного материала.</p> <p>Выбрать необходимые тесты для дифференциации возбудителя чумы от других патогенных для человека иерсиний и возбудителей массовых эпизоотий грызунов. Оценивать результаты характеристики штаммов возбудителей чумы, циркулирующих на территории природного очага.</p>
Владеть	<p>Методами посева материала на различные питательные среды. Постановкой биохимических тестов. Методикой и техникой постановки иммунологических реакций. Навыками и методами морфологических исследований (приготовление биологического объекта к исследованию, фиксация, окраска, микроскопия с иммерсионной системой светового микроскопа, темнопольная, фазово-контрастная, люминесцентная). Постановкой тестов для индикации и идентификации возбудителя чумы.</p> <p>Методами экспериментальной работы с лабораторными животными (фиксация, заражение, вскрытие биопроб, приготовление мазков-отпечатков из органов, посев крови и органов, расчет LD<sub>50</sub>).</p>

работку биологического метода лабораторной диагностики. С этой целью необходимо задействовать группу штаммов *Y. pestis*, различающихся по способности ферментировать отдельные субстраты (глицерин, мочевины, рамнозу, мелибиозу) [12], аминокислоты [3], по «избирательной» вирулентности для лабораторных животных [9], плазмидному составу [11, 13], чувствительности к специфическим бактериофагам [10] и антибактериальным препаратам [2]. Имитация экспериментальной чумы у лабораторных животных путем заражения вакцинным штаммом не позволяет получать характерную патологоанатомическую картину, а также стабильно выделять микроорганизмы при посеве паренхиматозных органов. Моделирование чумы у лабораторных животных на практических занятиях обеспечивается использованием вирулентного штамма.

В соответствии с необходимостью дифференциации возбудителя чумы от других патогенных иерсиний и бактерий, вызывающих массовые эпизоотии среди грызунов и спорадические заболевания людей, в учебный план включено изучение свойств возбудителей псевдотуберкулеза, кишечного иерсиниоза, пастереллеза.

Учитывая вышеперечисленные данные нами предложены критерии подбора штамма *Y. pestis*:

- авирулентность или сниженная вирулентность;
- наличие свойств, позволяющих изучить типичную морфологию клетки, культуральные и физиолого-биохимические свойства возбудителя чумы;
- наличие свойств, характеризующих биологические особенности различных подвигов или штаммов;
- наличие свойств, необходимых для проведения

индикации и идентификации возбудителя чумы регламентированными методами [6];

- наличие свойств, позволяющих дифференцировать возбудитель чумы от возбудителей псевдотуберкулеза, кишечного иерсиниоза, пастереллеза;

- способность моделировать экспериментальную чуму у лабораторных животных и стабильно выделяться из паренхиматозных органов биопробных животных;

- чувствительность к антибактериальным препаратам, применяемым для специфической профилактики чумы.

Исходя из выделенных критериев, может быть предложено следующее определение: «Учебный штамм» микроорганизма – это авирулентный или аттенуированный штамм, обладающий всем комплексом свойств для проведения в полном объеме индикации, идентификации и дифференциальной диагностики чумы, чувствительный к антибактериальным препаратам, используемым для специфической профилактики.

«Учебный штамм» – идеальный объект. Поэтому, корректнее говорить о наборе штаммов для обеспечения практических занятий в рамках учебного модуля. При формировании набора предпочтение необходимо отдавать штаммам авирулентным, вакцинным и со сниженной вирулентностью.

Следовательно, основной принцип формирования набора учебных штаммов – обеспечение освоения в полном объеме биологических свойств возбудителя чумы для проведения индикации, идентификации и дифференциальной диагностики чумы. На основании этого были определены следующие группы учебных штаммов:

- штаммы возбудителя чумы: вакцинный штамм

*Y. pestis* EV линии НИИЭГ, обладающий свойствами, позволяющими провести индикацию и идентификацию регламентированными методами; штаммы, преимущественно неосновных подвидов, позволяющие изучить биологические свойства, отличные от *Y. pestis* EV;

- штаммы, обеспечивающие моделирование экспериментальной чумы у лабораторных животных (характерная патанатомическая картина и стабильное выделение из паренхиматозных органов), вирулентные и со сниженной вирулентностью;

- штаммы *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* и *Pasteurella multocida*, предназначенные для освоения дифференциально-диагностических признаков.

Включение в набор штаммов авирулентных, со сниженной вирулентностью и вирулентных требует разработки алгоритма их применения. Нами предложен дифференцированный подход к использованию набора учебных штаммов: штаммы (вакцинный штамм, авирулентные, со сниженной вирулентностью), выдаваемые слушателям курсов для работы за лабораторным столом для изучения типичных свойств возбудителя чумы и стандартных методов лабораторной и дифференциальной диагностики; штаммы, используемые преподавателями при подготовке и проведении практических занятий с целью демонстрации свойств возбудителя чумы и лабораторных тестов, которые невозможно провести с помощью *Y. pestis* EV линии НИИЭГ (например, отсутствие ферментации глицерина, мочевины; ауксотрофность по отдельным аминокислотам, резистентность к бактериофагу Л413-С и т.д.); штаммы, используемые для моделирования экспериментальной чумы (вирулентные, которые используют преподаватели для демонстрации типичной клинической и патанатомической картины у лабораторных животных); штаммы возбудителя чумы (вакцинный или со сниженной вирулентностью) для работы слушателей курсов при освоении биологического метода диагностики.

Таким образом, в работе впервые сформулированы определение понятия «учебный штамм», критерии подбора штаммов возбудителя чумы в качестве учебных, принципы формирования специализированного набора учебных штаммов и их дифференцированного применения в образовательном процессе. Создание специализированного набора учебных штаммов, включающего преимущественно штаммы вакцинные, авирулентные и со сниженной вирулентностью, позволяет не только обеспечить в полном объеме выполнение учебных планов в рамках образовательного модуля «Микробиология и лабораторная диагностика чумы», но и снизить биологические риски при проведении практических занятий.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воробьев А.А., Боев Б.В., Бондаренко В.М., Гинцбург А.Л. Проблема биотерроризма в современных условиях. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2002; 3:3–12.
2. Кутырев В.В., Попов Н.В., Ерошенко Г.А., Меркулова Т.К. Чума на о. Мадагаскар. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 2(108):5–11.

3. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: «Шико»; 2013. 555 с.

4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: «Медицина»; 2004. 192 с.

5. Организация и проведение эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации. МУ 3.1.3.2355-08. М.; 2009.

6. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики чумы для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней. МУК 4.2.2940-11. М.; 2011.

7. Приготовление проб с имитаторами патогенных биологических агентов: методические указания. МУ 4.2.1103-02. М.; 2002.

8. Сазанова Е.В., Бойко А.В., Малокова Т.А., Лотманова Е.Ю. Пути снижения вероятности возникновения аварийных ситуаций при подготовке специалистов для работы с возбудителями I–II групп патогенности. *Биозащита и биобезопасность.* 2012; 1(10):16–20.

9. Трухачев А.Л., Лебедева С.А., Иванова В.С. Современное представление о вирулентности и эпидемической опасности штаммов «полевоchей» (рамнозопозитивной) разновидности возбудителя чумы. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2007; 5:4–7.

10. Царева Н.С., Зайцев А.А., Брюханова Г.Д., Щедрин В.И., Шерстюк М.В. Штамм бактерий *Yersinia pestis*, используемый в качестве тест-штамма, резистентного к чумному бактериофагу Л-413 С. Патент РФ 2203316, опубл. 27.04.2003. Бюл. 12.

11. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. Intraspecific Diversity of *Yersinia pestis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17(2):434–64.

12. Devignat R. Varietes de le spece *Pasteurella pestis*. Nouvelle hypothese. *Bull. WHO.* 1951; 4(2):242–63.

13. Kutyrev V.V., Smirnova N.I. Genetic Diversity and Genomic Evolution of Particularly Dangerous Infectious Agents of Plague, Cholera and Anthrax: The Present Status and Future Perspective. In: *New Research on Biotechnology and Medicine.* 2006. P. 29–44.

#### References

1. Vorob'ev A.A., Boev B.V., Bondarenko V.M., Gintsburg A.L. [Bioterrorism issues under current conditions]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2002; 3:3–12.

2. Kutyrev V.V., Popov N.V., Eroshenko G.A., Merkulova T.K. [Plague in Madagascar]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 2(108):5–11.

3. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infections. Practice Guidelines]. М.: "Shiko"; 2013. 555 p.

4. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors [Natural Plague Foci in the Territory of Caucasus, Caspian Sea Region, Central Asia, and Siberia]. М.: "Meditsina"; 2004. 192 p.

5. [Organization and Carrying out of Epidemiological Surveillance in Natural Plague Foci in the Territory of the Russian Federation. Methodological Regulations]. MR 3.1.3.2355-08. М.; 2009.

6. [Management and carrying out of the laboratory diagnostics of plague in local, regional and national facilities. Methodological Guidelines]. MG 4.2.2940-11. М.; 2011.

7. [Sample preparation containing surrogates of pathological biological agents. Methodological Regulations]. MR 4.2.1103-02. М.; 2002.

8. Sazanova E.V., Boiko A.V., Malyukova T.A., Lotsmanova E.Yu. [Ways of decreasing the probability of emergency situations when training specialists for work with the agents of the I-IV groups of pathogenicity]. *Biозashchita i Biobezop.* 2012; 1(10):16–20.

9. Trukhachev A.L., Lebedeva S.A., Ivanova V.S. [Modern view on the virulence and level of epidemic hazard among the "Microtus" (rhamnose-positive) plague agent strains]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2007; 5:4–7.

10. Tsareva N.S., Zaitsev A.A., Bryukhanova G.D., Shchedrin V.I., Sherstyuk M.V. [*Yersinia pestis* strain used as a test-strain resistant to plague bacteriophage L-413 C]. RF Patent 2203316. 27.04.2003. Bull. 12.

11. Anisimov A.P., Lindler L.E., Pier G.B. Intraspecific Diversity of *Yersinia pestis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17(2):434–64.

12. Devignat R. Varietes de le spece *Pasteurella pestis*. Nouvelle hypothese. *Bull. WHO.* 1951; 4(2):242–63.

13. Kutyrev V.V., Smirnova N.I. Genetic Diversity and Genomic Evolution of Particularly Dangerous Infectious Agents of Plague, Cholera and Anthrax: The Present Status and Future Perspective. In: *New Research on Biotechnology and Medicine.* 2006. P. 29–44.

#### Authors:

Sazanova E.V., Malyukova T.A., Popov Yu.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Сазанова Е.В., Малокова Т.А., Попов Ю.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 10.06.14.

А.А.Слудский

## СПИСОК ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ МИРОВОЙ ФАУНЫ – НОСИТЕЛЕЙ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

В результате многолетних исследований в природных и антропоургических очагах чумы Африки, Евразии, Северной и Южной Америки специалисты выявили не менее 340 видов млекопитающих и птиц, инфицированных возбудителем чумы. В работе приводится список носителей чумы, описанных в отечественных и зарубежных публикациях.

*Ключевые слова:* возбудитель чумы, носители чумы, млекопитающие, птицы.

A.A.Sludsky

### List of World Fauna Vertebrate Animals – Carriers of Plague Agent

Consequently to the long-term investigations conducted in natural and anthropourgic foci of plague, situated in Africa, Eurasia, North and South America, identified were not less than 340 species of mammals and birds infected with plague agent. The paper contains the list of plague agent carriers described, both in domestic and foreign publications.

*Key words:* plague agent, carriers of plague, mammals, birds.

Считается, что для возбудителя чумы (*Yersinia pestis*) присуща экологическая специфичность паразито-хозяйственных отношений, т.е. определяющим для акта инфицирования теплокровного животного является возможность встречи (контакта) возбудителя с носителем. Как следствие, возбудитель чумы способен паразитировать в организме многих видов теплокровных животных. С начала XX века накапливались сведения о резервуарах *Y. pestis* и в 1960 г. Ю.М.Ралль опубликовал список всех выявленных на тот момент носителей возбудителя чумы, включавший 214 видов. В последующие годы, в результате изучения известных и открытия новых очагов чумы, в многочисленных публикациях были описаны десятки ранее неизвестных науке носителей. Целью данной работы является сведение воедино имеющейся информации и предоставление максимально полной выборки из литературных источников всех известных к настоящему времени спонтанно зараженных чумой позвоночных животных в очагах Северной и Южной Америки, Африки и Евразии.

В списке виды, которые описаны как носители чумы в результате выявления в их организме антител к Fr I (без выделения возбудителя), отмечены значком \*.

Латинские названия носителей приводятся в соответствии с источниками получения информации и могут отличаться от названий животных, представленных в современных сводках по систематике млекопитающих.

В списке приводятся места обнаружения зараженных животных и, в зависимости от имеющейся полноты информации в первоисточниках, это может быть конкретный очаг чумы, регион, континент или страна.

В инфраклассе сумчатых млекопитающих

(Metatheria) известен только один вид, в инфраклассе плацентарных млекопитающих (Eutheria) описаны носители чумы из семи отрядов (в порядке убывания количества видов-носителей): грызуны (Rodentia) – 273 вида, хищные (Carnivora) – 30, зайцеобразные (Lagomorpha) – 16, насекомоядные (Insectivora) – 10, парнокопытные (Artiodactyla) – 6, приматы (Primates) – 4, даманы (Hyracoidea) – 1 вид (всего 341 вид млекопитающих). В природе заражаются чумой также и птицы (известны 3 вида), чаще всего каменки (*Oenanthe* sp.).

Класс **Млекопитающие – Mammalia**

Инфракласс **Сумчатые млекопитающие – Metatheria**

Семейство **Didelphidae**

1. *Monodelphis domesticus* L. (Опоссум) – Бразилия.

Инфракласс **Плацентарные млекопитающие – Eutheria**

Отряд **Насекомоядные – Insectivora**

2. *Crocidura olivieri* Less. (Египетская землеройка) – Сенегал.

3. *Crocidura suaveolens* Pall. (Малая белозубка) – Прикаспийский песчаный (Россия), Волго-Уральский песчаный (Россия), Урало-Эмбенский пустынный (Казахстан), Волго-Уральский степной (Россия), Зауральский\* степной (Казахстан), Таласский\* высокогорный (Казахстан) очаги.

4. *Diplomesodon pulchellum* Licht. (Пегий поторак) – Волго-Уральский песчаный (Россия, Казахстан), Зауральский (Арыкумско-Дарьялыктыкырский) пустынный (Казахстан), Приаральско-Каракумский пустынный (Казахстан), Каракумский пустынный (Туркмения), Прибалхашский пустынный (Казахстан) очаги.

5. *Hemicentetes nigriceps* Gunther (Черноголовый

тенрек) – Мадагаскар.

6. *Hemiechinus auritus*\* Gmelin (Ушастый еж) – Зауральский степной очаг (Казахстан).

7. *Hylomys suillus*\* Muller (Малая гимнура) – Юго-Восточная Азия.

8. *Sorex sp.* (Землеройка-бурозубка) – Центрально-Кавказский высокогорный очаг (Россия).

9. *Sylvisorex gemmeus* Thom. (Африканская бурозубка) – Конго.

10. *Suncus murinus* L. (Домовая землеройка (многозубка)) – Индия, Камбоджа, Вьетнам, Ява.

11. *Neomys fodiens* Pennant (Обыкновенная кутора) – Закавказский высокогорный очаг (Армения, Грузия).

#### Отряд Приматы – Primates

12. *Macaca radiata* Geoffr. (Индийский макак) – Южная Индия.

13. *Macaca multata* Zimm. (Большой макак) – Индия.

14. *Semnopithecus entellus* Dufur. (Тонкотелая обезьяна (хульман)) – Центральная Индия.

15. *Tupaia glis* Diard (Обыкновенная тупайя\*) – Вьетнам.

#### Отряд Зайцеобразные – Lagomorpha

16. *Ochotona alpina* Pall. (Алтайская (Северная) пищуха) – Алтайский горный очаг (Россия).

17. *Ochotona daurica* Pall. (Даурская пищуха) – Забайкальский степной (Россия), Тувинский горный (Россия), Алтайский горный (Россия), Хэнтейский и Хангайский (Монголия); Маньчжурия (Китай) очаги.

18. *Ochotona pricei* Gray (Монгольская пищуха) – Тувинский горный (Россия), Алтайский горный (Россия), Хэнтейский и Хангайский очаги (Монголия), Гобийский Алтай (Монголия).

19. *Lepus californicus* Gray (Калифорнийский заяц) – США.

20. *Lepus capensis* L. (Капский заяц) – Южная Африка.

21. *Lepus europaeus* L. (Заяц-русак) – Северо-Приаральский, Урало-Эмбинский\* пустынные очаги (Казахстан), Аргентина (акклиматизирован).

22. *Lepus saxatilis* Cuvier (Скалистый (кустарниковый) заяц) – Зимбабве.

23. *Lepus tolai* Pall. (Заяц-толай (песчаник)) – Каракумский (Туркмения), Кызылкумский (Казахстан, Узбекистан, Туркмения), Муонкумский (Казахстан), Мангышлакский\* (Казахстан), Предустюртский\* (Казахстан), Урало-Эмбинский\* (Казахстан), Прибалхашский (Казахстан) пустынные, Тяньшанский высокогорный (Киргизия, Казахстан), Алтайский горный (Россия) очаги.

24. *Oryctolagus cuniculus* L. (Обыкновенный кролик) – Англия, 1910 г.

25. *Sylvilagus andinus* (Андский кустарниковый кролик) – Перу.

26. *Sylvilagus auduboni* Baird (Калифорнийский кустарниковый или Степной кролик) – США.

27. *Sylvilagus bachmani* Water. (Калифорнийский кролик) – США.

28. *Sylvilagus brasiliensis* L. (Бразильский ку-

старниковый кролик) – Аргентина, Боливия.

29. *Sylvilagus caudatus* (Длиннохвостый кустарниковый кролик) – Перу.

30. *Sylvilagus gibsoni* – Боливия.

31. *Sylvilagus nuttalli* Bachm. (Вашингтонский кустарниковый кролик или кролик Нуталла) – США.

#### Отряд Грызуны – Rodentia

##### Семейство Белчьи – Sciuridae

32. *Callosciurus erythraeus* Patt. (Юньнаньская красная белка) – Юньнань (Китай), Юго-Восточная Азия.

33. *Dremomys rufigenis* Blanford (Краснощекая белка) – Юго-Восточная Азия.

34. *Funambulus palmarum* L. (Пальмовая белка) – Пакистан, Шри-Ланка.

35. *Funambulus pennanti* Wrought. (Перохвостая белка) – Индия.

36. *Glaucomys sabrinus* Shaw (Северная летяга) – США, Канада.

37. *Menetes berdmorei* \*Blyth (Многополосая белка) – Вьетнам.

38. *Paraxerus cepapi* A. Smith (Кустарниковая белка) – Зимбабве.

39. *Sciurus niger* L. (Черная белка) – США.

40. *Sciurus stramineus* Geoffr. (Эквадорская белка) – Южная Лойя (Эквадор), Ланковес (Перу).

41. *Spermophilopsis leptodactylus* Licht. (Тонкопалый суслик) – Кызылкумский (Казахстан, Узбекистан, Туркмения), Таукумский (Казахстан), Прибалхашский (Казахстан) пустынные очаги.

42. *Tamiasciurus douglasi* Bachm. (Белка Дугласа) – Калифорния (США).

43. *Tamios maclellandi* \*Hors. (Гималайская белка) – Вьетнам.

44. *Xerus erythropus* Geoffr. (Красная земляная белка) – Сенегал.

45. *Xerus inauris* Zimm. (Капская земляная белка) – ЮАР.

46. *Tamias quadrivittatus* Say (Четырехполосый (колорадский) бурундук) – США.

47. *Tamias minimus* Bach. (Малый бурундук) – США.

48. *Tamias speciosus* Merriam – США.

49. *Tamias townsendi* Bach. (Бурундук Таунсенда) – США.

50. *Tamias umbrinus* J. Allen (Уинтасский бурундук) – США.

51. *Marmota baibacina* Kastsch. (Серый (Алтайский) сурок) – Тяньшанский высокогорный (Казахстан, Киргизия) очаг и хребты этой горной системы в Китае, Алтайский горный очаг (Россия, Монголия).

52. *Marmota caudata* Geoffr. (Красный (длиннохвостый) сурок) – Алайский высокогорный (Киргизия), Таласский высокогорный (Киргизия), Гиссарский высокогорный (Таджикистан) очаги, Хребет Борохоро (Тянь-Шань, Китай).

53. *Marmota himalayana* Hods. (Гималайский (тибетский) сурок) – Китай.

54. *Marmota flaviventris* Aud. Et Bachm. (Желтобрюхий сурок) – США, Канада.

55. *Marmota sibirica* Radde (Тарбаган (Монгольский сурок)) – Забайкальский степной (Россия), Тувинский горный (Россия) очаги; Монголия, Внутренняя Монголия (Китай).

56. *Synomys gunnisoni* Baird. (Аризонская луговая собачка) – США.

57. *Synomys leucurus* Merriam – США.

58. *Synomys ludovicianus* Ord. (Чернохвостая луговая собачка) – США.

59. *Synomys mexicanus* Merriam. (Мексиканская луговая собачка) – Мексика.

60. *Synomys parvidens* All. (Ютская луговая собачка) – США.

61. *Spermophilus (Citellus) alascanicus* Bachner (Алашаньский суслик) – Нинся-Хуэйский очаг (Китай).

62. *Spermophilus armatus* Kenn. (Ютский суслик) – США.

63. *Spermophilus beecheyi* Rich. (Калифорнийский суслик) – США.

64. *Spermophilus beldingi* Merriam. (Орегонский суслик) – США.

65. *Spermophilus columbianus* Ord. (Колумбийский суслик) – США.

66. *Spermophilus dauricus* Br. (Даурский суслик) – Забайкальский степной, Восточно-Монгольский очаги (Россия), Маньчжурия (Северо-Восточный Китай).

67. *Spermophilus erythrogenes* Br. (Краснощечный суслик) – Прибалхашский, Бетпақдалинский пустынные (Казахстан), Приалакольский низкогорный (Казахстан) очаги, Юго-Восточная Монголия, Внутренняя Монголия (Китай).

68. *Spermophilus fulvus* Licht. (Желтый суслик) – Волго-Уральский песчаный (Россия, Казахстан), Волго-Уральский степной (Казахстан), Зауральский (Урало-Уилский) степной (Казахстан), Урало-Эмбенский пустынный (Казахстан), Предустюртский (Казахстан), Устюртский (Казахстан, Узбекистан, Туркмения), Мангышлакский (Казахстан), Кызылкумский (Казахстан, Узбекистан, Туркмения), Каракумский (Туркмения), Приаральско-Каракумский (Казахстан), Северо-Приаральский (Казахстан), Зааральский (Казахстан), Муонкумский (Казахстан), Бетпақдалинский (Казахстан) пустынные очаги.

69. *Spermophilus idahoensis* – США.

70. *Spermophilus lateralis* Say (Золотистый суслик) – США.

71. *Spermophilus leucurus* – США.

72. *Spermophilus major* Pall. (Большой суслик), 1778 – Зауральский степной очаг (Казахстан).

73. *Spermophilus mexicanus* – США.

74. *Spermophilus musicus* Menetrie (Горный суслик) – Центрально-Кавказский высокогорный очаг (Россия).

75. *Spermophilus pygmaeus* Pall. (Малый суслик) – Терско-Сунженский низкогорный (Россия), Дагестанский равнинно-предгорный (Россия), Прикаспийский Северо-Западный степной (Россия), Прикаспийский песчаный (Россия), Волго-Уральский

степной (Россия, Казахстан), Волго-Уральский песчаный (Россия, Казахстан), Зауральский (Урало-Уилский) степной (Казахстан), Урало-Эмбенский (Казахстан), Предустюртский (Казахстан), Устюртский (Казахстан, Узбекистан, Туркмения), Северо-Приаральский (Казахстан), Приаральско-Каракумский (Казахстан) пустынные очаги.

76. *Spermophilus relictus* Kaschk. (Реликтовый суслик) – Тяньшанский (Киргизия, Казахстан), Таласский (Казахстан) высокогорные очаги.

77. *Spermophilus richardsoni* Sab. (Суслик Ричардсона) – США, Канада.

78. *Spermophilus spilosoma* – США.

79. *Spermophilus townsendi* Bach. (Суслик Таунсенда) – США.

80. *Spermophilus tridecemlineatus* – США.

81. *Spermophilus undulatus* Pall. (Длиннохвостый суслик) – Алтайский горный (Россия), Тувинский горный (Россия), Хэнтейский и Хангайский (Монголия) очаги, Китай.

82. *Spermophilus variegatus* Erxl. (Скалистый суслик) – США.

83. *Spermophilus washingtoni* Howell. (Вашингтонский суслик) – США.

Семейство **Гоферы – Geomyidae**

84. *Thomomys bottae* Eud. et Cerv. (Западный гофер) – США.

85. *Thomomys fossor* – США.

Семейство **Мешотчатые прыгуны – Heteromyidae**

86. *Dipodomys ordii* Wood. (Кенгуровый прыгун Орда) – США.

87. *Heteromys anomalus* Thom. (Венесуэльский прыгун) – Венесуэла.

Семейство **Долгоноги – Pedetidae**

88. *Pedetes cafer* Pall. (Кафрский долгоног) – Южная Африка.

89. *Pedetes capensis* (Капский долгоног\*) – Зимбабве. Последний вид как носитель чумы описан в публикации В.М.Неронова и соавт. [3]. Специалисты по систематике млекопитающих говорят о наличии в семействе только одного вида – *Pedetes cafer* или *P. capensis*. Возможно, под разными названиями скрывается один вид.

Семейство **Хомяковых – Cricetidae**

90. *Akodon arviculoides* Wagner – Бразилия.

91. *Akodon dolores* Thom. (Аргентинский тростниковый хомяк) – Аргентина.

92. *Akodon mollis* Thom. (Горный тростниковый хомяк) – Эквадор, Перу.

93. *Akodon orophilus* Osgood – Перу.

94. *Allocrietulus evermanni* Brandt (Хомяк Эверсмана) – Волго-Уральский (Россия, Казахстан), Зауральский (Урало-Уилский) степные (Казахстан) очаги, Урало-Эмбенский, Предустюртский, Северо-Приаральский\*, Приаральско-Каракумский пустынные (Казахстан), Хангайский (Монголия) очаги.

95. *Calomys (Hesperomys) bimaculatus* Waterh. (Двупятнистый западный хомяк) – Боливия.

96. *Calomys calossus* Rengr. – Бразилия.

97. *Calomys fecundus* Thom. (Плодовитый западный хомяк) – Боливия.
98. *Calomys laucha* Desm. (Крикливый западный хомяк) – Аргентина.
99. *Calomys murillus* Thom. (Аргентинский западный хомяк) – Аргентина.
100. *Calomys tener* Winge – Бразилия.
101. *Calomys venustus* Thom. (Темный западный хомяк) – Боливия.
102. *Cricetus cricetus* L. (Обыкновенный хомяк) – Зауральский степной (Казахстан), Джунгарский\* высокогорный (Казахстан) очаги.
103. *Cricetulus barabensis* Pall. (Даурский хомячок) – Забайкальский степной очаг (Россия), Северный Китай.
104. *Cricetulus migratorius* Pall. (Серый хомячок) – Дагестанский (Россия), Закавказский (Армения, Грузия), Гиссарский (Таджикистан), Тяньшанский (Казахстан, Киргизия), Таласский (Киргизия, Казахстан), Джунгарский\* высокогорные очаги, Волго-Уральский (Россия, Казахстан) и Зауральский (Урало-Уилский) степные (Казахстан), Урало-Эмбинский, Предустюртский, Устюртский, Северо-Приаральский, Зааральский, Мангышлакский, Приаральско-Каракумский пустынные (Казахстан), Прикаспийский (Россия) и Волго-Уральский песчаные (Россия, Казахстан) очаги, Приалакольский низкоротный очаг (Казахстан).
105. *Cricetulus triton* Wint. (Крысовидный хомячок) – Северный Китай.
106. *Eligmodontia moreni* Thom. (Аргентинский маисовый хомяк) – Аргентина.
107. *Eligmodontia hirtipes* Thom. (Мохнатый маисовый хомяк) – Аргентина.
108. *Graomys (Phyllotis) cachinus* – Аргентина.
109. *Graomys chacoensis* – Аргентина.
110. *Graomys griseoflavus* Waterh. (Серо-желтый хомяк) – Аргентина, Боливия.
111. *Graomys medius* – Аргентина.
112. *Holochillus balnearum* Thom. (Водяной хомяк) – Аргентина.
113. *Holochillus brasiliensis* Desmarest (Бразильский перепончатопалый хомяк) – Бразилия.
114. *Holochillus sciureus* Wagn. (Сахарный хомяк) – Бразилия.
115. *Mesocricetus brandti* Nehr. (Закавказский (малоазийский) хомяк) – Закавказский высокогорный очаг Армения, Грузия.
116. *Mystromys albicaudatus* Smith. (Белохвостый хомяк) – Южная Африка.
117. *Neotoma albigula* Hart. (Белогорлый кустарниковый хомяк) – США.
118. *Neotoma cinerea* Ord. (Кистехвостый кустарниковый хомяк) – США.
119. *Neotoma desertorum* Merr. (Калифорнийский кустарниковый хомяк) – США.
120. *Neotoma fuscipes* Baird. (Темноногий кустарниковый хомяк) – США.
121. *Neotoma intermedia* Rhoads. (Средний кустарниковый хомяк) – США.
122. *Neotoma lepida* Thom. (Пустынный кустарниковый хомяк) – США.
123. *Neotoma micropus* Baird (Южный лесной хомяк) – США.
124. *leucogaster* W.-N. (Северный кузнечиковый хомяк) – США.
125. *Onychomys torridus* Coues (Южный кузнечиковый хомяк) – США.
126. *Oryzomys andinus* Org. (Андский рисовый хомяк) – Перу.
127. *Oryzomys arenalis* Thom. (Песчаный рисовый хомяк) – Перу.
128. *Oryzomys flavescens* Waterh. (Аргентинский рисовый хомяк) – Аргентина, Боливия.
129. *Oryzomys intermedius* Leche (Средний рисовый хомяк) – Бразилия.
130. *Oryzomys palustris* Harl. (Болотный рисовый хомяк) – США.
131. *Oryzomys phaeopus* Thom. (Эквадорский рисовый хомяк) – Эквадор.
132. *Oryzomys pyrrhorhinus* Vied. (Бразильский рисовый хомяк) – Бразилия.
133. *Oryzomys stolzmanni* Thom. (Рисовый хомяк Стольцмана) – Перу.
134. *Oryzomys subflavus* Wagner – Бразилия.
135. *Oryzomys xantheolus* Thom. (Желтый рисовый хомяк) – Перу, Эквадор.
136. *Oryzomys x. baroni* All. – Эквадор.
137. *Oxymycterus paramensis* Thom. (Боливийский хомяк) – Боливия.
138. *Peromyscus boylii* Baird (Гребенчатый хомячок) – США.
139. *Peromyscus leucopus* Rafin. (Белоногий хомячок) – США.
140. *Peromyscus maniculatus* Wagn. (Олений хомячок) – США.
141. *Peromyscus truei* Shuf. (Хомячок Тру) – США.
142. *Phodopus sungorus* Pall. (Джунгарский хомячок) – Алтайский горный очаг (Россия).
143. *Phyllotis amicus* Thom. (Ушастый хомяк) – Перу.
144. *Phyllotis darwini* Thom. (Хомяк Дарвина) – Аргентина.
145. *Phyllotis fruticolus* Anth. (Кустарниковый хомяк) – Эквадор.
146. *Phyllotis wolfsophni* Thom. (Хомяк Уолфсона) – Боливия.
147. *Rhipidomys equatorius* Thom. (Экваториальный береговой хомяк) – Перу.
148. *Rhipidomys leucodactylus* Tsch. (Белопалый (береговой) хомяк) – Боливия.
149. *Sigmodon hirsutus* Burm. (Венесуэльский хлопковый хомяк) – Венесуэла.
150. *Sigmodon peruanus* All. (Перуанский хлопковый хомяк) – Перу, Эквадор.
151. *Sigmodon puna* – Эквадор.
152. *Zygodontomys lasiurus* Lund (Камышовый хомячок) – Бразилия.
153. *Zygodontomys pixuna* – Бразилия.

154. *Myospalax psilurus* Miln.-Edw. (Маньчжурский (северокитайский) цокор) – Китай.
155. *Alticola argentatus (roylei)* Severtz. (Серебристая полевка) – Алайский (Киргизия), Тяньшанский (Казахстан, Киргизия), Таласский (Киргизия), Гиссарский (Таджикистан) высокогорные, Хангайский (Монголия) очаги.
156. *Alticola strelzovi* Kastsch. (Плоскочерепная полевка) – Алтайский и Тувинский очаги (Россия).
157. *Arvicola terrestris* L. (Водяная полевка) – Закавказский (Армения, Грузия) и Дагестанский (Россия) высокогорные, Урало-Эмбенский пустынный (Казахстан) очаги.
158. *Clethrionomys frater* Thom. – Тяньшанская лесная полевка. Таласский\* (Казахстан), Джунгарский\* (Казахстан) высокогорные очаги.
159. *Ellobius lutescens* Thom. (Горная слепушонка) – Курдистан (Иран).
160. *Ellobius talpinus* Pall. (Обыкновенная слепушонка) – Алайский (Киргизия) высокогорный, Волго-Уральский (Россия, Казахстан) и Зауральский\* (Казахстан) степные, Волго-Уральский (Россия, Казахстан) песчаный, Зааральский, Мангышлакский (Казахстан), Кызылкумский (Казахстан, Узбекистан, Туркмения), Каракумский (Туркмения) пустынные очаги.
161. *Eothenomys melanogaster* Milne-Edw. (Темнобрюхая южноазиатская полевка) – Южный Китай.
162. *Eothenomys miletus* – Северо-западный Юннань (Китай).
163. *Lagurus curtatus* Core (Лемминговая пеструшка) – США.
164. *Lagurus lagurus* Pall. (Степная пеструшка) – Волго-Уральский (Россия, Казахстан) и Зауральский (Казахстан) степные, Волго-Уральский песчаный (Россия, Казахстан) очаги.
165. *Lasiopodomys brandti* Radde (Полевка Брандта) – Забайкальский степной (Россия), Хангайский, Хэнтейский (Монголия) очаги, плато Цилин-Гол (Внутренняя Монголия).
166. *Microtus arvalis* Pall. (Обыкновенная полевка) – Закавказский (Армения, Грузия), Дагестанский (Россия), Центрально-Кавказский (Россия) высокогорные, Волго-Уральский (Россия, Казахстан) и Зауральский (Казахстан) степные, Волго-Уральский песчаный (Россия, Казахстан) очаги.
167. *Microtus daghestanicus* Schidlowski (Дагестанская полевка) – Дагестанский высокогорный очаг (Россия).
168. *Microtus californicus* Peal (Калифорнийская полевка) – Калифорнийский очаг США.
169. *Microtus carruthersi* Thom. (Арчовая полевка) – Гиссарский высокогорный очаг (Таджикистан), Таласский\* высокогорный (Узбекистан, Казахстан).
170. *Microtus gregalis* Pall. (Узкочерепная (стадная) полевка) – Алайский (Киргизия), Тяньшанский (Казахстан, Киргизия), Алтайский\* (Россия) высокогорные, Забайкальский (Россия) степной, Тувинский (Россия) горный, Хангайский (Монголия) очаги.
171. *Microtus (Chionomys) gud* Satun. (Гудаурская снежная полевка) – Закавказский высокогорный очаг (Армения, Грузия).
172. *Microtus fortis* Buchn. (Большая (дальнево-сточная) полевка) – Китай.
173. *Microtus fuscus* – Тибет.
174. *Microtus kirgisorum* Ognev (Киргизская полевка) – Тяньшанский высокогорный (Киргизия, Казахстан), Таласский, Джунгарский\* высокогорные (Казахстан).
175. *Microtus manus* – США.
176. *Microtus minutus* – Южный Китай.
177. *Microtus montanus* Peal (Горная полевка) – США.
178. *Microtus (Chionomys) nivalis* Mart. (Европейская снежная полевка) – Закавказский высокогорный очаг (Армения, Грузия).
179. *Microtus socialis* Pall. (Общественная полевка) – Приараксинский низкогорный (Армения, Азербайджан), Закавказский высокогорный (Армения, Грузия), Дагестанский равнинно-предгорный (Россия), Волго-Уральский, Зауральский степные (Казахстан), Предустюртский, Устюртский, Северо-Приаральский, Приаральско-Каракумский, Таукумский, Прибалхашский пустынные (Казахстан), Прикаспийский песчаный (Россия), Джунгарский\* высокогорный (Казахстан) очаги.
180. *Microtus townsendii* Bachm. (Полевка Таунсенда) – США.
181. *Ondatra zibethica* L. (Ондатра) – Прикаспийский песчаный (Россия), Прибалхашский пустынный\* (Казахстан) очаги.
182. *Desmodillus auricularis* Smith. (Короткоухая песчанка или Намаква) – Южная Африка.
183. *Gerbillus gerbillus* Olivier (Карликовая песчанка) – Мавритания.
184. *Gerbillus nanus* Blanford (Белуджистанская песчанка) – Мавритания.
185. *Gerbillus paebe* Smith. (Песчанка Пэба) – Южная Африка.
186. *Meriones blackleri (tristrami)* Thom. (Малоазийская песчанка) – Приараксинский низкогорный (Армения, Азербайджан), Закавказский равнинно-предгорный (Азербайджан, Грузия), Курдо-Иранский (Иран) очаги.
187. *Meriones erythrorurus (libycus)* Gray (Краснохвостая (ливийская) песчанка) – Предустюртский (Казахстан), Устюртский (Казахстан, Узбекистан, Туркмения), Урало-Эмбенский (Казахстан), Северо-Приаральский (Казахстан), Зааральский (Казахстан), Мангышлакский (Казахстан), Приаральско-Каракумский (Казахстан), Каракумский (Туркмения), Копетдагский (Туркмения), Кызылкумский (Казахстан, Узбекистан, Туркмения), Муонкумский (Казахстан), Таукумский (Казахстан), Прибалхашский (Казахстан), Бетпақдалинский (Казахстан) пустынные, Приалакольский низкогорный (Казахстан), Илийский межгорный (Казахстан), Закавказский равнинно-предгорный (Азербайджан, Грузия), Курдо-Иранский горно-степной, Ирано-

Афганский низкогорный пустынный, Сирийско-Месопотамский пустынный очаги (Ливия\*).

188. *Meriones meridianus* Pall. (Полуденная песчанка) – Прикаспийский Северо-Западный (Россия), Волго-Уральский (Россия, Казахстан), Зауральский (Казахстан) степные, Приараксинский низкогорный (Армения, Азербайджан), Прикаспийский (Россия), Волго-Уральский (Россия, Казахстан), Урало-Эмбенский (Казахстан), Предустюртский (Казахстан), Устюртский (Казахстан, Узбекистан, Туркмения), Северо-Приаральский (Казахстан), Зааральский (Казахстан), Мангышлакский (Казахстан), Приаральско-Каракумский (Казахстан), Каракумский (Туркмения), Кызылкумский (Казахстан, Узбекистан, Туркмения), Муюнкумский (Казахстан), Таукумский (Казахстан), Прибалхашский (Казахстан), Илийский межгорный (Казахстан), Бетпакдалинский (Казахстан) пустынные, (Юго-Восточная Монголия), Внутренняя Монголия (Китай) песчаные очаги.

189. *Meriones persicus* Blanf. (Персидская песчанка) – Приараксинский низкогорный (Армения, Азербайджан), Курдо-Иранский (Иран) очаги.

190. *Meriones shawi* Duv. (Песчанка Шави), 1842 – Курдо-Иранский (Иран) очаг.

191. *Meriones tamariscinus* Pall. (Гребенщикова песчанка) – Дагестанский равнинно-предгорный (Россия), Волго-Уральский (Россия, Казахстан), Зауральский (Казахстан) степные, Прикаспийский (Россия), Волго-Уральский (Россия, Казахстан) песчаные, Урало-Эмбенский (Казахстан), Предустюртский (Казахстан), Устюртский (Казахстан, Узбекистан, Туркмения), Мангышлакский (Казахстан), Приаральско-Каракумский (Казахстан), Северо-Приаральский (Казахстан), Зааральский (Казахстан), Бетпакдалинский (Казахстан), Каракумский (Туркмения), Кызылкумский (Казахстан, Узбекистан, Туркмения), Муюнкумский (Казахстан), Таукумский (Казахстан), Прибалхашский (Казахстан) пустынные, Приалакольский низкогорный (Казахстан).

192. *Meriones unguiculatus* M.-Edw. (Монгольская когтистая песчанка) – Гобийский Алтай (Монголия), Внутренняя Монголия, Маньчжурия (Китай) очаги.

193. *Meriones vinogradovi* Heptn. (Песчанка Виноградова) – Приараксинский низкогорный (Армения, Азербайджан), Курдо-Иранский (Иран) очаги.

194. *Psammotus obesus* Cretzschmar (Дневная песчанка) – Африка.

195. *Rhombomys opimus* Licht. (Большая песчанка) – Зауральский степной (Казахстан), Урало-Эмбенский (Казахстан), Предустюртский (Казахстан), Устюртский (Казахстан, Узбекистан, Туркмения), Северо-Приаральский (Казахстан), Зааральский (Казахстан), Мангышлакский (Казахстан), Приаральско-Каракумский (Казахстан), Каракумский (Туркмения), Копетдагский (Туркмения), Кызылкумский (Казахстан, Узбекистан, Туркмения), Муюнкумский (Казахстан), Таукумский (Казахстан), Прибалхашский (Казахстан), Бетпакдалинский (Казахстан) пустынные очаги, Приалакольский низкогорный (Казахстан),

Ирано-Афганский низкогорный пустынный очаг, Гобийский Алтай (Монголия), Северо-Западный Китай.

196. *Tatera afra* Gray (Гололапая песчанка) – Африка.

197. *Tatera brantsi* Smith. (Песчанка Брантса) – Южная Африка.

198. *Tatera indica* Hardw. (Индийская песчанка) – Курдо-Иранский (Иран) горно-степной, Сирийско-Месопотамский (Сирия) пустынный очаги, Северная, Центральная и Южная Индия.

199. *Tatera leucogaster* Peters (Белобрюхая песчанка) – Африка.

200. *Tatera lobengulae* de Vint. (Траншейная песчанка) – Южная Африка.

201. *Tatera nigrita* Hatt. (Черноватая песчанка) – Африка.

202. *Tatera robusta* Creter (Гребнехвостая песчанка) – Танзания.

203. *Tatera schinzi* Noack. (Песчанка Шинца) – Африка.

204. *Tatera valida* Bosage (Саванная песчанка) – Африка.

#### Семейство Мышиных – Muridae

205. *Acomys cahirinus* Desm. (Каирская мышь) – Египет.

206. *Apodemus agrarius* Pall. (Полевая мышь) – Прикаспийский песчаный очаг, Маньчжурия (Китай).

207. *Apodemus chevrieri* – Северо-западный Юннань (Китай).

208. *Apodemus speciosus* Temminck (Восточноазиатская мышь) – Северо-западный Юннань (Китай).

209. *Apodemus sylvaticus* L. (Лесная мышь) – Прикаспийский Северо-Западный степной (Россия), Зауральский (Урало-Уилский) степной (Казахстан) Приалакольский низкогорный (Казахстан), Терско-Сунженский низкогорный (Россия), Центрально-Кавказский (Россия), Таласский (Киргизия, Казахстан), Джунгарский\* (Казахстан), Алайский (Киргизия), Закавказский (Армения, Грузия), Гиссарский (Таджикистан) высокогорные очаги.

210. *Dasymys incommutus* Sund. (Африканская лохматая мышь) – Африка.

211. *Dendromus haymani* Hatt. (Мышь Хэймена) – Африка.

212. *Dendromus insignis* Thom. (Мышь-древолаз) – Африка.

213. *Dendromus melanotis* Smith – Конго.

214. *Dendromus mesomelas* Brants – Конго.

215. *Dendromus mystacalis* Heuglin – Конго.

216. *Hybomys univittatus* Peters (Однополосая мышь) – Конго.

217. *Lemniscomys griselda* Thom. – Сенегал, Кения\*.

218. *Lemniscomys striatus* L. (Полосатая мышь) – Кения, Танзания\*, Конго.

219. *Lophuromys aguilus* Dollm. (Водяная мышь) – Африка.

220. *Lophuromys flavopunctatus* Thom. (Желто-

точечная мышь) – Танзания, Конго.

221. *Lophuromys sikapusi*\* Temminck – Танзания, Конго.

222. *Malacotrix typicus* Smith. (Широкоухая мышь) – Африка.

223. *Micromys minutus* Pall. (Мышь-малютка) – Китай.

224. *Mus booduga* Gray. (Индийская полевая мышь) – Индия.

225. *Mus bufo* Thom. – Конго.

226. *Mus cervicolor* Hodg. (Желто-коричневая мышь) – Юго-Восточная Азия.

227. *Mus deserti* Thom. (Африканская пустынная мышь) – Африка.

228. *Mus (Leggada) minutoides* A. Smith (Карликовая мышь) – Конго.

229. *Mus musculoides* Temm. (Африканская прыткая мышь) – Африка.

230. *Mus musculus* L. (Домовая мышь) – Дагестанский равнинно-предгорный (Россия), Волго-Уральский (Россия, Казахстан), Зауральский (Казахстан) степные, Центрально-Кавказский (Россия) высокогорный, Урало-Эмбенский, Предустюртский, Северо-Приаральский, Зааральский, Мангышлакский, Приаральско-Каракумский (Казахстан), Каракумский (Туркмения), Кызылкумский (Казахстан, Узбекистан, Туркмения), Муюнкумский (Казахстан) пустынные, Волго-Уральский (Россия, Казахстан), Прикаспийский (Россия) песчаные, Приалакольский (Казахстан), Приараксинский (Армения, Азербайджан) низкогорные, Закавказский равнинно-предгорный (Азербайджан, Грузия), Закавказский высокогорный (Армения, Грузия), Сарыджаский высокогорный (Казахстан) очаги, Внутренняя Монголия, Северо-Восточный Китай, Вьетнам, Южная Америка.

231. *Mus platythrix* Bennett (Колючая мышь) – Индия, Вьетнам\*.

232. *Mus triton* Thom. (Трехцветная мышь) – Африка.

233. *Mylomys cunninghami* Thom. (Мышь озера Альберта) – Африка.

234. *Rhabdomys pumilio* Sparrm. (Полосатая мышь) – Кения, Зимбабве.

235. *Steatomys pratensis* Pet. (Луговая мышь) – Африка.

236. *Aethomys chrysophilus* de Winton (Золотистая крыса) – Африка.

237. *Aethomys hindei* Thom. – Африка.

238. *Aethomys namaquensis* A. Smith (Намакуаская крыса) – Африка.

239. *Arvicanthus abyssinicus* Rupp. (Абиссинская лесная крыса) – Кения, Танзания, Конго.

240. *Arvicanthus niloticus* Desm. (Нильская лесная крыса (травяная мышь)) – Танзания, Сенегал, Кения.

241. *Bandicota bengalensis* Gray. (Бенгальская бандикота) – Южная Индия, Бирма.

242. *Bandicota indica* Vech. (Индийская бандикота) – Южная Индия, Юго-Восточная Азия.

243. *Bandicota gracilis* Nehr. (Стройная бандикота) – Индия, Цейлон.

244. *Bandicota malabarica* Shaw. (Малабарская бандикота) – Цейлон.

245. *Bandicota savilei* Thom. (Бирманская бандикота) – Вьетнам.

246. *Berylmus bowersi* Anderson (Крыса Боверса\*) – Вьетнам.

247. *Cricetomys gambianus* Waterh. (Гвинейская (гамбийская) крыса) – Танзания, Сенегал, Конго.

248. *Dipodomys* sp. (Кенгуровая крыса) – США.

249. *Golunda ellioti* Gray. (Крыса Эллиота) – Индия.

250. *Grammomys dolichurus* Smith. (Кустарниковая крыса) – Конго, Танзания\*, Кения\*.

251. *Grammomys drays* Thom. – Африка.

252. *Leopoldamys edwardsi* Thom. (Крыса Эдвардса) – Юго-Восточная Азия.

253. *Mastomys (Praomys) coucha* – Африка.

254. *Mastomys natalensis* Smith (Многососковая крыса) – Кения, Танзания, Мозамбик, Конго, Сенегал.

255. *Millardia meltada* Gray. (Пушистая крыса) – Северная и Центральная Индия.

256. *Nesokia indica* Gray (Пластинчатозубая крыса) – Индия.

257. *Niviventer niviventer* Hodg. (Белобрюхая крыса\*) – Вьетнам.

258. *Oenomys hypoxanthus* Pucheran (Рыженося крыса) – Конго.

259. *Otomys angoniensis* Wrought. (Кенийская водяная крыса) – Кения, Танзания.

260. *Otomys denti* Thom. – Конго, Танзания\*.

261. *Otomys irroratus* Br. (Южноафриканская водяная крыса) – Африка.

262. *Otomys tropicalis* Wrought. – Африка.

263. *Otomys unisulcatus* Cuvier et Geoffr. (Кювьерова крыса) – Африка.

264. *Paratomys brantsi* Smith. (Южноафриканская пустынная крыса) – Африка.

265. *Pelomys campanae* Huet. (Сенегальская кустарниковая крыса) – Африка.

266. *Pelomys fallax* Pet. (Восточноафриканская кустарниковая крыса) – Замбия, Танзания\*.

267. *Rattus andersoni* Thom. (Крыса Андерсона) – Китай.

268. *Rattus argentiventer* Robinson et Kloss – Юго-Восточная Азия.

269. *Rattus blandfordi* Thom. (Крыса Бланфорда) – Индия.

270. *Rattus concolor* Blyth. (Разноцветная крыса) – Ява.

271. *Rattus exulans* Peale (Малая крыса) – Ява, Вьетнам, Индонезия.

272. *Rattus flavipectus* Milne-Edwards (Желтогрудая крыса) – провинции Юннань, Гуандун, Фьюань в Южном Китае, Вьетнам.

273. *Rattus griseiventer* Bouh. (Серобрюхая крыса) – Ява.

274. *Rattus hawaiiensis* Stone (Гавайская крыса) –

Гавайские острова.

275. *Rattus kajzeri* Noack. (Крыса Кайзера) – Африка.

276. *Rattus losea* Swinh. («Убыточная», полевая, малая рисовая крыса) – Юго-Восточная Азия.

277. *Rattus molliculus*\* Robinson et Kloss (Большая полевая крыса) – Вьетнам.

278. *Rattus nitidus* Hodyson (Гималайская крыса) – Северо-западный Юннань (Китай), Вьетнам.

279. *Rattus norvegicus* Berk. (Серая крыса) – Волго-Уральский (Россия, Казахстан), Прикаспийский (Россия) песчаные очаги, Африка, Индия, Северо-Восточный и Юго-Восточный Китай, Южная Америка.

280. *Rattus rattus* L. (Черная крыса) – Африка, Мадагаскар, Гавайские острова, Индия, Юго-Восточная Азия, Китай, Южная Америка.

281. *Rattus sladeni (koratensis)* Kloss (Лесная крыса) – Юго-Восточная Азия.

#### Семейство **Соневых** – **Gliridae**

282. *Dyromys nitedula* Pall. (Лесная соня) – Закавказский (Армения, Грузия), Гиссарский (Таджикистан), Сарыджаский\* (Казахстан), Таласский\* (Казахстан), Джунгарский\* (Казахстан) высокогорные очаги.

#### Семейство **Тушканчиковых** – **Dipodidae**

283. *Allactaga elater* Licht. (Малый тушканчик) – Волго-Уральский (Россия, Казахстан), Зауральский (Казахстан) степные, Урало-Эмбенский, Предустюртский, Устюртский, Северо-Приаральский, Зааральский, Мангышлакский, Приаральско-Каракумский (Казахстан), Кызылкумский (Казахстан), Муюнкумский (Казахстан), Каракумский (Туркмения) пустынные, Волго-Уральский (Россия, Казахстан), Прикаспийский (Россия) песчаные, Приараксинский низкогорный (Армения, Азербайджан) очаги, Иран.

284. *Allactaga jaculus (maior)* Pall. (Большой тушканчик) – Прикаспийский песчаный (Россия), Волго-Уральский (Россия, Казахстан), Зауральский\* степной (Казахстан), Урало-Эмбенский,\* Предустюртский,\* Устюртский,\* Северо-Приаральский, Приаральско-Каракумский (Казахстан) пустынные очаги.

285. *Allactaga severtzovi* Vinogr. (Тушканчик Северцова) – Зааральский (Арыкумско-Дарьялыктыкырский)\*, Приаральско-Каракумский\* (Казахстан) пустынные очаги.

286. *Allactaga sibirica (saltator)* Forster (Тушканчик-прыгун) – Забайкальский степной (Россия), Тувинский горный (Россия), Алтайский горный (Россия), Устюртский\*, Приаральско-Каракумский\* (Казахстан) пустынные, Сарыджаский\* высокогорный (Казахстан) очаги, Внутренняя Монголия (Китай).

287. *Allactagulus acotion* Pall. (Тарбаганчик) – Зауральский\* степной (Казахстан), Урало-Эмбенский,\* Предустюртский,\* Устюртский,\* Северо-Приаральский,\* Кызылкумский, Таукумский\* (Казахстан), Каракумский (Туркмения) пустынные очаги.

288. *Dipus sagitta* Pall. (Мохноногий тушканчик) – Урало-Эмбенский, Северо-Приаральский\*, Приаральско-Каракумский\* (Казахстан), Кызылкумский (Казахстан, Узбекистан, Туркмения), Прибалхашский (Казахстан), Каракумский (Туркмения) пустынные, Волго-Уральский песчаный (Россия, Казахстан) очаги, Внутренняя Монголия (Китай).

289. *Eremodipus lichtenschteini* Vinogr. (Тушканчик Лихтенштейна) – Кызылкумский (Казахстан, Узбекистан, Туркмения), Прибалхашский (Казахстан) пустынные очаги.

290. *Paradipus ctenodactylus* Vinogr. (Гребнепалый тушканчик) – Каракумский (Туркмения), Кызылкумский (Казахстан, Узбекистан, Туркмения) пустынные очаги.

291. *Pygerethmus platyurus* Licht. (Толстохвостый тушканчик) – Урало-Эмбенский\*, Предустюртский\*, Мангышлакский пустынные очаги (Казахстан).

292. *Scirtopoda telum* Licht. (Емуранчик) – Прикаспийский песчаный (Россия), Прикаспийский Северо-Западный (Россия), Зауральский\* степной (Казахстан), Урало-Эмбенский\*, Предустюртский\*, Устюртский\*, Северо-Приаральский, Зааральский, Мангышлакский\*, Приаральско-Каракумский\*, Кызылкумский, Муюнкумский, Таукумский, Прибалхашский пустынные (Казахстан) очаги.

#### Семейство **Свинковые** – **Caviidae**

293. *Cavia aperea* Erxl. (Бразильская свинка) – Бразилия, Эквадор.

294. *Cavia pamparum* Thom. (Пампасская свинка) – Аргентина.

295. *Cavia porcella* L. (Морская свинка) – Эквадор.

296. *Cavia tschudi* Osg. (Перуанская свинка) – Перу, Эквадор.

297. *Galea musteloides* Burm. – Аргентина, Боливия.

298. *Galea spixii* Wagl. – Бразилия.

299. *Kerodon rupestris* Wied. – Бразилия.

300. *Microcavia australis* Geoffr. et D.Orb. – Аргентина.

#### Семейство **Агутиевых** – **Dasyproctidae**

301. *Dasyprocta variegata* – Боливия.

#### Семейство **Шиншилловых** – **Chinchillidae**

302. *Lagostomus maximus* Thom. – Вискаша. Аргентина.

#### Семейство **Колючих шиншилл** – **Echimyidae**

303. *Cercomys cunicularius* Thom. – Бразилия.

304. *Cercomys inermis* Pict. – Бразилия.

#### Отряд **Хищные** – **Carnivora**

#### Семейство **Псовые** – **Canidae**

305. *Canis familiaris* L. (Собака домашняя) – Африка, Индия\*, Перу\*.

306. *Canis latrans* Say. (Койот) – США.

307. *Vulpes corsak* L. (Корсак) – Урало-Эмбенский\*, Предустюртский\*, Устюртский\*, Северо-Приаральский\*, Зааральский\*, Приаральско-Каракумский\*, Кызылкумский\* (Казахстан), Каракумский (Туркмения) пустынные очаги.

308. *Vulpes vulpes* L. (Обыкновенная лиси-

ца) – Волго-Уральский степной (Россия), Волго-Уральский песчаный\* (Казахстан), Урало-Эмбенский\*, Предустюртский\*, Северо-Приаральский\*, Зааральский\*, Мангышлакский\*, Приаральско-Каракумский\*, Кызылкумский\* (Казахстан) пустынные, Тяньшанский высокогорный (Казахстан, Киргизия) очаги.

309. *Urocyon cinereoargenteus*\* (Серая лисица) – США.

Семейство **Енотовые – Procyonidae**

310. *Procyon lotor* (Енот-полоскун\*) – США.

Семейство **Куны – Mustelidae**

311. *Martes americana* (Американская куница\*) – США.

312. *Meles meles* L. (Обыкновенный барсук) – Зааральский\*, Приаральско-Каракумский\* пустынные (Казахстан), Тяньшанский высокогорный (Казахстан, Киргизия) очаги, США\*.

313. *Mustela altaica* Pall. (Солонгой) – Забайкальский степной очаг (Россия), Иран.

314. *Mustela erminea* (Горностаи) – Тяньшанский высокогорный (Казахстан, Киргизия), Северо-Приаральский пустынный\* (Казахстан), Таласский\* и Джунгарский\* высокогорные (Казахстан), Алтайский\* (Россия), Гиссарский\* (Таджикистан) высокогорные очаги.

315. *Mustela eversmanni* Less. (Степной (светлый) хорек) – Прикаспийский Северо-Западный (Россия), Волго-Уральский (Казахстан), Забайкальский степные (Россия), Урало-Эмбенский\*, Предустюртский\*, Устюртский\*, Северо-Приаральский, Зааральский, Мангышлакский, Приаральско-Каракумский, Прибалхашский, Муонкумский\*, Бетпақдалинский\* (Казахстан), Кызылкумский (Казахстан, Узбекистан, Туркмения) пустынные, Тяньшанский (Казахстан, Киргизия), Таласский\* высокогорные (Казахстан), Тувинский (Россия), Алтайский (Россия) горные очаги.

316. *Mustela furo* (Белый хорек) – Южная Африка.

317. *Mustela nigripes* (Черноногий хорек) – США.

318. *Mustela nivalis* L. (Ласка) – Зауральский степной\* (Казахстан), Устюртский\*, Северо-Приаральский\*, Зааральский\*, Мангышлакский\*, Приаральско-Каракумский\*, Кызылкумский Муонкумский\*, Прибалхашский (Казахстан), Каракумский (Туркмения) пустынные, Закавказский (Армения, Грузия), Гиссарский (Таджикистан), Сарыджаский\* (Казахстан) высокогорные очаги, Китай.

319. *Mustela sibirica* Pall. (Колонок) – Забайкальский степной очаг (Россия).

320. *Mustela putorius* L. (Лесной хорек) – Одесса, 1911 г. (Россия).

321. *Taxidea taxus* (Американский западный барсук) – США.

322. *Vormela peregusna* Gueld. (Перевязка) – Северо-Приаральский\*, Зааральский\*, Мангышлакский\*, Приаральско-Каракумский\* (Казахстан), Кызылкумский (Казахстан, Узбекистан, Туркме-

ния), Муонкумский\* (Казахстан), Каракумский (Туркмения) пустынные очаги.

Семейство **Виверровые – Viverridae**

323. *Cynictis pennicilata* Cuvier (Желтый мангуст) – Африка.

324. *Herpestes aureopunctatus* (Мангуста) – Гавайские острова.

325. *Herpestes javanicus* E. Geoffr. (Яванский мангуст\*) – Вьетнам.

326. *Mangusta ichneumon* L. (Индийский ихневмон) – Индия.

327. *Paradoxurus hermaphrodites* Pal. (Обыкновенный мусанг\*) – Вьетнам.

328. *Helogale parvulus* (Карликовый мангуст\*) – Кения.

329. *Suricata suricata* Erhl. (Африканская вивера) – Индия.

Семейство **Скунсовые – Mephitidae**

330. *Mephitis mephitis* (Полосатый скунс\*) – США.

Семейство **Кошачьи – Felidae**

331. *Felis catus* L. (Домашняя кошка) – Зааральский\* (Казахстан), Каракумский (Туркмения), Кызылкумский (Узбекистан, Туркмения) пустынные, Сарыджаский высокогорный\* (Казахстан) очаги, Китай, Южная Африка, США.

332. *Felis concolor* (Пума\*) – США.

333. *Felis libycus* Forst. (Степная кошка) – Зауральский (Урало-Уилский)\* степной (Казахстан), Зааральский\*, Прибалхашский\* пустынные (Казахстан), Приалакольский низкогорный\* (Казахстан) очаги.

334. *Felis rufa* (*Lynx rufus* Schreb.) (Рыжая рысь) – США.

Отряд **Даманы – Hyracoidea**

335. *Procavia capensis* L. (Капский даман) – Африка.

Отряд **Парнокопытные (Парнопалые) – Artiodactyla**

Семейство **Свиные – Suidae**

336. *Sus scrofa* L. (Кабан\*) – США.

Семейство **Верблюдовые – Camelidae**

337. *Camelus bactrianus* L. (Двугорбый верблюд) – Волго-Уральский песчаный (Россия), Мангышлакский\*, Приаральско-Каракумский\* (Казахстан), Кызылкумский (Казахстан, Узбекистан) пустынные очаги.

338. *Camelus dromedarius* L. (Одногорбый верблюд) – Каракумский пустынный очаг (Туркмения).

Семейство **Полорогие – Bovidae**

339. *Saiga tatarica* L. (Сайга) – Мангышлакский, Муонкумский\*, Бетпақдалинский\* (Казахстан) пустынные очаги.

340. *Vubalus sp.*\* (Буйвол) – Африка.

341. Домашняя коза\* – Ливия. Описан случай заболевания чумой 6 человек при прирезке двух домашних коз; у одной из них выявлены антитела к фракции I (Christie A.B. et al., 1980).

Класс **Птицы – AVES**

Отряд **Воробьиные – Passeriformes**

342. *Eremophila alpestris* L (Рогатый жаворонок\*) – Монголия.

343. *Oenanthe isabellinae* Temm. (Каменка-плясуня) – Волго-Уральский степной, Волго-Уральский\* песчаный (Россия, Казахстан), Зауральский\* степной (Казахстан), Мангышлакский\* (Казахстан), Кызылкумский\* (Казахстан, Узбекистан, Туркмения) пустынные, Алтайский\* (Россия), Гиссарский\* (Таджикистан) высокогорные очаги, Монголия.

344. *Podoces panderi* Fisch. (Саксаульная сойка) – Каракумский (Туркмения), Кызылкумский\* (Казахстан) пустынные очаги.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атлас распространенности бактериальных и вирусных зоонозных инфекций в Казахстане. Алматы; 2010; 122 с.
2. Матросов А.Н., Кузнецов А.А., Слудский А.А., Попов Н.В., Козлова Т.А., Голосовский С.Л., Манжиева В.С., Ким Т.С., Синцов В.К., Ерофеев А.В. Экологические особенности и эпизоотологическое значение общественной полевки в Прикаспийском песчаном очаге чумы. *Поволжский экологический журнал*. 2003; 2:147–57.
3. Неронов В.М., Малхазова С.М., Тикуннов В.С. Региональная география чумы. М.: 1991. 232 с.
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 192 с.
5. Ралль Ю.М. Грызуны и природные очаги чумы. М.: Медгиз; 1960. 224 с.
6. Хрустелевский В.П. Дополнения к спискам теплокровных носителей чумного микроба, опубликованным в 1959 и 1960 гг. В кн.: Грызуны – носители природно-очаговых болезней. Алма-Ата: Кайнар; 1978. С. 30–2.
7. Шевченко В.Л., Мартынов Г.А., Алтухов А.А., Гражданов А.К., Иванов С.И. О случаях выявления в природе зараженных чумой каменок-плясуний и их специфических видов блох. В кн.: Профилактика особо опасных инф. 1981. С. 152–5.
8. Carniel E., Chanteau S., Duchemin J.B., Duplantier J.M., Goodman S.M., Handschumacher P., Jeanne I., Laventure S., Migliani R., Rahalison L., Rasolofonirina N., Ratsifasoamanana L., Rasoamanana B., Ratsitorahina M., Ratovonjato J., Rosso M.L., Roux J., Tall A. Atlas de la peste a Madagascar. 2004.
9. Christie A.B., Chen T.H., Elberg S.S. Plague in camels and goats: their role in human epidemics. *J. infect. Dis.* 1980;141(6):724–6.
10. Davalos V.A., Torres M.A., Mauricci C.O., Laguna-Torres V.A., Chinarro M.P. Outbreak of bubonic plague in Jacocha, Huancabamba, Peru. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2001; 34(1):87–90.
11. Dyer N.W., Huffman L.E. Plague in free-ranging mammals in western North Dakota. *J. Wildl. Dis.* 1999; 35(3):600–2.
12. Gordon D.H., Jssacson M., Taylor P. Plague antibody in large African mammals. *Infect. Immun.* 1979; 26(2):767–9.
13. Nelson James H., Decker Robert H., Barnes Alan M., Nelson Bernard C., Quan Thomas J., Gillogly Alan R., Phillips Gary S. Plague surveillance using wild boar and wild carnivore sentinels. *J. Environ. Health.* 1985; 47(6):306–9.
14. Nguyen Ai Phuong, Nguyen Thai, Dang Tuan Dat, Huy Nam, Ly Thi Vi Huong. Some ascertainments through the results of the epidemiology study on the two provinces of the western highland Gialai-Kontum, Daklak, 1976–1983. *Inst. Hyg. Epidemiol. Tay Nguyen. Sci. Study work 1980–1983.* 1983. С. 25–41.
15. Plague in the Americas. *Scientific Publ.* 1965; 115:1–156.
16. Plague manual: Epidemiology, Distribution, Surveillance and Control. WHO/CDS/CRS/EDC/99.2. World Health Organization. Geneva; 1999. 171 p.
17. Prince F. Ecological notes on wild rodents associated with plague in sylvatic areas in the Western United States of America. *WHO. Vector Control.* 66.217. 1968; 35.
18. Seal S.C. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 1960; 23(2–3):288–9.
19. Tong Z., Zhou D., Song Y., Zhang L., Pei D., Han Y., Pang X., Li M., Cui B., Wang J., Guo Z., Qi Z., Jin L., Zhai J., Du Z., Wang J., Wang X., Yu J., Wang J., Huang P., Yang H., Yang R. Pseudogene accumulation might promote the adaptive microevolution of *Yersinia pestis*. *J Med Microbiol.* 2005; 54(Pt 3):25968.
20. Van Peenen P.F.D., Marshall J.D., Cavanaugh D.C., Rust J.H. Mammals of South Vietnam. II. *Diseas Implications. Mil. Med.* 1970; 135:391–7.
21. World Health Organization technical report series. Geneva; 1959. N 165. 44 p.
22. Zielinski W.J. Plague in pine martens and the fleas associated with its occurs. *Great Basin Natur.* 1984; 44(1):170–5.

#### References

1. [Atlas of Prevalence of Bacterial and Viral Zoonotic Infections in Kazakhstan]. *Almaty; 2010; 122 p.*
2. Matrosov A.N., Kuznetsov A.A., Sludsky A.A., Popov N.V., Kozlova T.A., Golosovsky S.L., Manzhieva V.S., Kim T.S., Sintsov V.K., Erofeev A.V. [Ecological peculiarities and epizootiological significance of the social vole in the Caspian-Sea Region sandy plague focus]. *Povolzhsk. Ekologich. Zh.* 2003; 2: 147–57.
3. Neronov V.M., Malkhazova S.M., Tikunov V.S. [Regional Geography of Plague]. M.: 1991. 232 p.
4. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors [Natural Plague Foci in the Territory of the Caucasus, Caspian-Sea Region, Central Asia and Siberia]. M.: "Meditsina"; 2004. 192 p.
5. Rall' Yu.M. [Rodents and Natural Foci of Plague]. M.: Medgiz; 1960. 224 p.
6. Khrustselevsky V.P. [Amendments to the Lists of warm-blooded carriers of plague agent, published in 1959 and 1960, respectively]. In: [Rodents – Carriers of Natural-Focal Infections]. Alma-Ata: Kainar; 1978. P. 30–2.
7. Shevchenko V.L., Martynov G.A., Altukhov A.A., Grazhdanov A.K., Ivanov S.I. [Concerning detection of plague -infected isabelline chats and their specific species of fleas in the natural environments]. In: [Prophylaxis of Particularly Dangerous Infections]. 1981. P. 152–5.
8. Carniel E., Chanteau S., Duchemin J.B., Duplantier J.M., Goodman S.M., Handschumacher P., Jeanne I., Laventure S., Migliani R., Rahalison L., Rasolofonirina N., Ratsifasoamanana L., Rasoamanana B., Ratsitorahina M., Ratovonjato J., Rosso M.L., Roux J., Tall A. Atlas de la peste a Madagascar. 2004.
9. Christie A.B., Chen T.H., Elberg S.S. Plague in camels and goats: their role in human epidemics. *J. infect. Dis.* 1980;141(6):724–6.
10. Davalos V.A., Torres M.A., Mauricci C.O., Laguna-Torres V.A., Chinarro M.P. Outbreak of bubonic plague in Jacocha, Huancabamba, Peru. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2001; 34(1):87–90.
11. Dyer N.W., Huffman L.E. Plague in free-ranging mammals in western North Dakota. *J. Wildl. Dis.* 1999; 35(3):600–2.
12. Gordon D.H., Jssacson M., Taylor P. Plague antibody in large African mammals. *Infect. Immun.* 1979; 26(2):767–9.
13. Nelson James H., Decker Robert H., Barnes Alan M., Nelson Bernard C., Quan Thomas J., Gillogly Alan R., Phillips Gary S. Plague surveillance using wild boar and wild carnivore sentinels. *J. Environ. Health.* 1985; 47(6):306–9.
14. Nguyen Ai Phuong, Nguyen Thai, Dang Tuan Dat, Huy Nam, Ly Thi Vi Huong. Some ascertainments through the results of the epidemiology study on the two provinces of the western highland Gialai-Kontum, Daklak, 1976–1983. *Inst. Hyg. Epidemiol. Tay Nguyen. Sci. Study work 1980–1983.* 1983. С. 25–41.
15. Plague in the Americas. *Scientific Publ.* 1965; 115:1–156.
16. Plague manual: Epidemiology, Distribution, Surveillance and Control. WHO/CDS/CRS/EDC/99.2. World Health Organization. Geneva; 1999. 171 p.
17. Prince F. Ecological notes on wild rodents associated with plague in sylvatic areas in the Western United States of America. *WHO. Vector Control.* 66.217. 1968; 35.
18. Seal S.C. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 1960; 23(2–3):288–9.
19. Tong Z., Zhou D., Song Y., Zhang L., Pei D., Han Y., Pang X., Li M., Cui B., Wang J., Guo Z., Qi Z., Jin L., Zhai J., Du Z., Wang J., Wang X., Yu J., Wang J., Huang P., Yang H., Yang R. Pseudogene accumulation might promote the adaptive microevolution of *Yersinia pestis*. *J Med Microbiol.* 2005; 54(Pt 3):25968.
20. Van Peenen P.F.D., Marshall J.D., Cavanaugh D.C., Rust J.H. Mammals of South Vietnam. II. *Diseas Implications. Mil. Med.* 1970; 135:391–7.
21. World Health Organization technical report series. Geneva; 1959. N 165. 44 p.
22. Zielinski W.J. Plague in pine martens and the fleas associated with its occurs. *Great Basin Natur.* 1984; 44(1):170–5.

#### Authors:

Sludsky A.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Слудский А.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 21.10.13.

Б.Н.Мишанькин, О.В.Дуванова, Л.В.Романова, Е.С.Шипко, А.С.Водопьянов

**МЕМБРАННЫЙ БЕЛОК *OmpT* ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА  
КАК ВОЗМОЖНЫЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЬ ОМПТИНОВ СЕМЕЙСТВА *VIBRIONACEAE***

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону,  
Российская Федерация

В работе рассматривается состояние проблемы омптинов энтеробактерий, их структура и функции, а также возможная роль в патогенезе вызываемых ими инфекций. У холерного вибриона выделен и очищен с помощью дифференциального центрифугирования и колоночной хроматографии пориновый белок наружных мембран *OmpT* с молекулярной массой около 40 кДа, синтез которого находится под контролем сложной системы регуляции. Он не содержит в своем составе цистеина, наделен протеолитической активностью с широкой субстратной специфичностью: способен гидролизовать фибрин, протамин, желатин, активировать плазминоген человека в плазмин, что обеспечивает известные преимущества вибрионам во время пребывания в кишечнике чувствительного хозяина. Сравнительный компьютерный анализ аминокислотной последовательности показал, что белок *OmpT* холерного вибриона лишь отдаленно родственен омптинам энтеробактерий (13 % идентичности и сходства) и возможно принадлежит к новому классу поринов семейства *Vibrionaceae*.

*Ключевые слова:* *Vibrio cholerae*, омптин, плазминоген, плазмин, порин.

**B.N.Mishan'kin, O.V.Duvanova, L.V.Romanova, E.S.Shipko, A.S.Vodop'yanov**

**Cholera *Vibrio* Membrane Protein *OmpT* as an Ompitin Belonging to *Vibrionaceae* Family**

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Concerned are the issues related to enterobacteria oмпtins, their structure and functionality, as well as alternative role in pathogenesis of the infections induced by them. Isolated from cholera vibrio, and later purified using differential centrifugation and column chromatography has been porin protein of the *OmpT* outer membranes, with the molar mass of approximately 40 kDa. Synthesis of porin is under control of the complex regulatory system. It does not contain cysteine, but possesses proteolytic activity with broad substrate specificity: it hydrolyzes fibrin, protamin, gelatine; transduces human plasminogen into plasmin, which provides for the well-known advantages for the vibrios in the intestine of a susceptible host. Comparative computer-assisted analysis of amino acid sequence has revealed that cholera vibrio *OmpT* protein relates to the oмпtins of enterobacteria as a far-remotely one, and has 13 % identity and similarity to it. *OmpT* protein is probably affiliated to a new class of porins of the family *Vibrionaceae*.

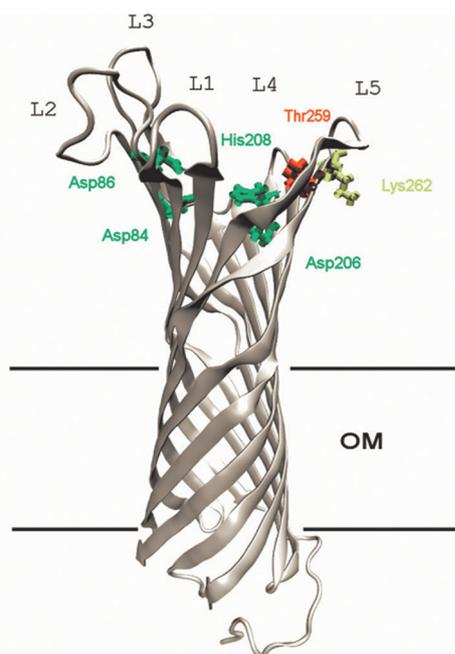
*Key words:* *Vibrio cholerae*, oмпtin, plasminogen, plasmin, porin.

Омптины – семейство протеаз наружных мембран, идентифицированное у многих представителей патогенных для человека или растений энтеробактерий [12]. Эти специализированные белки участвуют в преодолении врожденных неспецифических защитных сил чувствительного хозяина, способствуя колонизации его отдельных органов. У *Vibrio cholerae* упоминания об омптинах мы не встретили, хотя в последнее время внимание исследователей к мембранному белку *OmpT* значительно увеличилось [4, 6, 19, 26]. В настоящем сообщении мы попытались суммировать имеющиеся данные о белке *OmpT* возбудителя холеры в сравнении с омптинами других бактерий, чтобы лучше понять его значение для биологии вибрионов.

Свое название омптины получили благодаря детальной характеристике *OmpT* (outer membrane protein – белок наружной мембраны) белка кишечной палочки, кристаллическую структуру которого с разрешением в 2,6 Å изучили L.Vandeputte-Rutten *et al.* [30]. Полученные координаты были использованы при моделировании омптинов из других источников,

включая *Pla* из *Yersinia pestis*. Структура *OmpT* представлена вазообразным β-бочонком длиной в 70 Å с 10 антипараллельными β-цепями, удерживаемые четырьмя короткими периплазматическими поворотами и пятью внеклеточными петлями (рисунок). Он простирается наружу на 40 Å от липидного бислоя, а его внешне расположенные петли локализируются как раз над краем коровой области липополисахарида (ЛПС). Каталитические остатки находятся в полости, которая сверху ограничена мобильными короткими петлями. Для проявления своей ферментативной активности *OmpT* нуждается в щелочном значении pH и ЛПС с полностью ацилированным липидом А, который, видимо, индуцирует конформационные изменения в белке, необходимые для формирования «нативной геометрии» активного центра протеазы [10]. О смещении плазминогеном нуклеофильной молекулы воды в активном центре, свободном от ЛПС *Pla Y. pestis*, сообщают и другие исследователи [7].

Омптины близки друг к другу по своей структуре, проявляя до 50 % идентичности, состоят из 290–301 аминокислотного остатка и характеризуются



Модель структуры  $\beta$ -бочонка омпитина *Plg* из *Y. pestis* по Kukkonen M. и Korhonen T. [13]:

OM – наружная мембрана, L1–L5 – поверхностные петли, Asp84, Asp86, Asp206 и His208 – каталитические остатки

ся отсутствием или низким содержанием цистеина. Функционально омпиты являются протеазами и до недавнего времени входили в состав 18S семейства сериновых протеаз, отличавшихся каталитической триадой Ser-Asp-His. Однако при изучении их кристаллической структуры в каталитическом сайте была обнаружена пара аспаратов, в связи с чем семейство омпитинов было реклассифицировано в семейство 23A аспарат-протеаз [13]. Сайты расщепления в белковых или пептидных субстратах для *OmpT* и других омпитинов идентифицированы в виде консенсусных последовательностей (Arg/Lys)(Arg/Lys) – Ala [5].

Считается, что биологическая функция омпитинов состоит в поддержании жизненного цикла (life style) конкретного хозяина. Так, показано, что экспрессия активности гена *pla* в составе плазмиды pPCP1 влияет на инвазивность чумного микроба при подкожном заражении мышей, тогда как делеция гена ведет к увеличению значений  $LD_{50}$  *Y. pestis* с 50 до  $10^7$  бактерий, не влияя при этом на результаты внутривенного заражения [23]. В то же время экспрессия гена *pla* особенно не отражалась на вирулентности *Y. pseudotuberculosis* pPCP<sup>+</sup> при подкожном заражении мышей [14]. *Plg* активирует плазминоген, переводя его в плазмин, и эффективно инактивирует ингибитор  $\alpha_2$ -антиплазмин млекопитающих, что важно для активации проколлагеназ, участвующих в разрушении тканевых барьеров. Наличие полной структуры кора ЛПС – необходимое условие для активации плазминогена клетками *Y. pestis* [1].

Центральная роль активации плазминогена в патогенезе чумы была продемонстрирована J.D.Gogen *et al.* [8] в опытах с использованием *Plg*-дефицитных

мышей, которые оказались в сотни раз более устойчивыми к чумной инфекции по сравнению с нормальными животными.

*Pla* наделен адгезивной функцией, опосредующей связывание бактерий с ламинином и протеогликаном базальных мембран, а также с внеклеточным матриксом из клеточных линий эпителия и легких человека. Ламинин не гидролизуется *Pla*, но является хорошим субстратом для плазмина после активации *Plg* [9, 15]. *Pla* деградирует белки комплемента, включая C3, C3b и C4b [25], что в итоге снижает интенсивность опсонофагоцитоза и хемотаксиса фагоцитов в места инфекции, способствуя системному распространению *Y. pestis*.

Интересно, что хотя продукт гена *OmpT* *E. coli* и проявляет невысокую способность к активации плазминогена и не расщепляет  $\alpha_2$ -антиплазмин, небольшие структурные модификации в виде мутационных укорочений его поверхностных петель 3 и 4 до размеров *Pla*, а также замещение некоторых остатков вблизи активного центра резко меняют субстратную специфичность белка, позволяя авторам [12] рассматривать этот факт в качестве примера возможного «эволюционного превращения белка жизнеобеспечения (housekeeping protein) в фактор вирулентности». К тому же *OmpT* и *PgtE* *Salmonella enterica* способны протеолитически расщеплять  $\alpha$ -, но не  $\beta$ -спиральные катионактивные антимикробные пептиды (дефензины, кателицидины, протамины) животных и растений, что повышает выживаемость бактерий и их устойчивость к факторам врожденного иммунитета хозяина [29, 22].

Холерный вибрион уникален по своей способности вызывать мировые пандемии среди диареегенных патогенов бактериальной природы. Он существует в свободноживущем состоянии, но способен колонизировать тонкий кишечник человека и высвободить холерный токсин, приводящий к потенциально смертельной секреторной диарее в случае отсутствия надлежащего лечения. Эти две формы – водное окружение и кишечник человека – и составляют суть его жизненного цикла. Во время пребывания в желудочно-кишечном тракте, благодаря координированной экспрессии генов, он преодолевает врожденные защитные силы чувствительного хозяина (кислотное значение pH желудка, желчь, катионактивные белки и др.). Немалую роль здесь играют и регулируемые геном *toxR* белки внешней мембраны *OmpU* и *OmpT*, синтез которых хотя и не является необходимым для экспрессии факторов вирулентности, но остается важным для выполнения ряда функций, способствующих сохранению холерных вибрионов в кишечнике и окружающей среде [2].

Наружные мембраны *V. cholerae* содержат восемь белков, из которых *OmpT* и *OmpU* являются тримерными поринами с разным диаметром пор, контролирующими ток гидрофильных растворов [26]. Их транскрипция регулируется трансмембранным модулятором *ToxR*, стимулирующим экспрес-

сию *OmpU* и подавляющим *OmpT* [20]. Сведения о возможном участии этих пориновых белков в патогенезе холеры весьма противоречивы [23, 24]. Резкое подавление транскрипции мембранного белка *OmpT* по *ToxR*-независимому типу было отмечено в условиях кислотного стресса, хотя экспрессия *OmpU* при этом не менялась, обеспечивая толерантность вибрионов к кислоте [18]. Помимо повышенной осмолярности (0,4 М *NaCl*), положительным регулятором гена *ompT* оказался цАМФ-связывающий белок (CRP), активирующий транскрипцию по механизму «образования петли» [16], но подавляющий при этом координированную экспрессию генов *ctx* и *tcpA* [27]. И хотя содержание *OmpU* может достигать 30–60 % от суммарного белка наружных мембран [18], сыворотки волонтеров после экспериментального заражения клетками штаммов *V. cholerae* 395 или E7946 содержали сопоставимые количества антител к *OmpU* и *OmpT* [28]. Это свидетельствует о существовании дополнительных регуляторов экспрессии гена *ompT*, возможно, в виде некодирующих малых РНК (sРНК) типа *VrrA*, влияющих через взаимодействие с mРНК на пост-трансляционную модуляцию экспрессии генов в зависимости от условий среды окружения (стресс, температура культивирования и др.) [26]. Тем более что имеются данные об усилении выражения генов *ompT* (VC1854), *ompA* (VC2213) и *ompS* (VC1028) у вариантов *V. cholerae*, дефектных по шаперону *hfq*, связывающему sРНК и mРНК [6, 31]. Возможно, это объясняется присутствием у O1 вибрионов белка, родственного белку *OmpT*, в роли которого может выступать пориновый белок VC0972 (хитопорин), как это описано в случае с геном *ompU* и его паралога *VCA1008* [21]. Отмечена позитивная регуляция экспрессии *ompT* *V. cholerae* под влиянием *Fur* и ионов железа в результате прямого связывания *Fur* с промотором гена *ompT* [4].

Белковый состав наружных мембран *V. cholerae* сильно менялся в зависимости от среды выращивания: в полных средах вибрионы экспрессировали исключительно порин *OmpU*, тогда как в минимальных доминировал *OmpT*. Внесение в минимальную среду смеси из аспарагина, аргинина, глутаминовой кислоты и серина способствовало продукции *OmpU* и подавлению *OmpT*, что было обусловлено повышенным уровнем белка *ToxR*. У мутанта по *toxR*-гену изменений в профиле мембранных белков не обнаружено [19].

Согласно данным литературы и нашим данным [3], очищенный с помощью дифференциального центрифугирования и хроматографии на колонке с целлюлозой DE-52 белок *OmpT* холерного вибриона имеет молекулярную массу около 40 кДа. Он состоит из 344 аминокислотных остатков, несет два сайта гликозилирования (*Asn*<sub>62</sub> и *Asn*<sub>66</sub>) и 23 остатка лизина, не содержит в своем составе цистеина, проявляет всего 13 % идентичности и столько же сходства со структурой омптинов из энтеробактерий (кишечная палочка, сальмонелла и чумной микроб).

Он наделен протеолитической активностью, расщепляет протамин, фибрин, желатин, казеин, коллаген и активирует плазминоген человека в плазмин. Не гидролизует плазмин-специфичный пептидный хромогенный субстрат *p*-нитроанилид трипептида For-Ala-Phe-Lys-pNa.HBr (Ренам, Россия). Чувствителен к фенолметилсульфонилфлуориду, но слабо реагирует на присутствие дитиотреитола, ЭДТА, *p*-хлормеркуриобензоата, ингибируется солями  $Zn^{2+}$  и  $Cu^{2+}$ ,  $\epsilon$ -аминокапроновой кислотой, мочевиной и SDS, что сближает его с сериновыми протеазами.

Кластерный анализ поринов с построением дендрограммы *OmpT* белков небольшой выборки бактерий из GenBank позволил разделить их на три группы, одну из которых составили *V. cholerae*, *V. furnissii* и *V. metschnikovii*, другую – омптины энтеробактерий (*Y. pestis*, *E. coli*, *S. enterica*) и *V. parahaemolyticus*, а третью – *V. vulnificus* (мол. масса – 33,9 кДа, совпадение с последовательностью *OmpT* *V. cholerae* – 23 %, сходство – 14,9 %). Из представителей рода *Vibrio*, только *V. cholerae cholerae*, *V. cholerae eltor* и *V. cholerae O139* реагировали в реакции преципитации в геле с антисывороткой к белку *OmpT* из холерного вибриона. Представители энтеробактерий (возбудители чумы и псевдотуберкулеза, кишечная палочка) и других вибрионов (*V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. furnissii*, *V. vulnificus*) такой способностью не обладали, что согласуется с данными [17] о высокой специфичности антисывороток к белкам наружных мембран возбудителя холеры. Если принять во внимание еще и отрицательный результат исследования указанных вибрионов в ПЦР с праймерами к гену *ompT* холерного вибриона [18], то гетерогенность представителей рода *Vibrio* относительно белка *OmpT* становится очевидной.

Выполненный сравнительный анализ 212 нуклеотидных последовательностей гена *ompT*, содержащихся в GenBank в составе контигов или полных геномов вибрионов, выделенных в разные годы и разных странах (Индия, Афганистан, Индонезия, Гаити, Бразилия и др.), показал достаточную стабильность его структуры. Изменения в виде 19 единичных нуклеотидных замен (преимущественно А на Г и Т на С) и непродолжительных вставок в один и три нуклеотида удалось зарегистрировать лишь у 31 нуклеотидной последовательности штаммов вибрионов, среди которых оказался и *V. cholerae biovar albensis* (индекс разнообразия составил 0,26). Изменения группировались больше по краям гена.

Функции белка *OmpT* в биологии холерного вибриона остаются до конца непонятными. Выяснено, что его синтез строго регулируется микробом в ответ на различные сигналы: рН и температура – через регулон *ToxR*, источники углеводов – через комплекс *cAMP-CRP* и далее через  $\sigma^E$ -регулон посредством sРНК *VrrA* [26]. Кроме защиты от антимикробных белков и активации плазминогена, обеспечивающих известное преимущество вибрионам в условиях кишечника чувствительного хозяина, увеличение син-

теза *OmpT* в присутствии высоких концентраций *NaCl*, пониженной (28 °C) температуре и в минимальных средах позволяет предположить его вклад в выживаемость *V. cholerae* во внешней среде. В составе мембранных пузырьков *OmpT* может принимать участие в транспорте различных бактериальных факторов (токсины, ферменты, ДНК и др.) в клетки хозяина во время колонизации кишечника [11]. Учитывая известные на сегодня свойства белка *OmpT* наружных мембран холерного вибриона, в том числе результаты сравнительного компьютерного анализа аминокислотной последовательности, его можно отнести к омптинам семейства *Vibrionaceae*, число которых будет увеличиваться по мере изучения представителей других патогенных для человека видов вибрионов рода *Vibrio*.

В заключение хотелось бы отметить, что само по себе широкое распространение омптинов среди бактерий указывает на вероятность того, что они могут оказаться одними из древних систем/средств защиты в мире микробов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дентовская С.В., Платонов М.Е., Бахтеева И.В., Анисимов А.П. Наличие полной структуры кора липополисахарида необходимо для активации плазминогена возбудителя чумы. *Пробл. особо опасных инф.* 2007; 93:49–51.
2. Заднова С.П. Функциональная роль *ToxR*-регулируемых белков внешней мембраны *Vibrio cholerae*. *Пробл. особо опасных инф.* 2004; 1(87):9–13.
3. Шипко Е.С., Мишанькин Б.Н., Дуванова О.В., Романова Л.В., Ерибемян А.К. Плазминоген-активирующая способность холерного вибриона и участие мембранного белка *OmpT* в этом процессе. *Защита населения и среда обитания*. 2012; 4(229):17–9.
4. Craig S.A., Carpenter C.D., Mey A.R., Wickoff E.E., Payne S.M. Positive regulation of the *Vibrio cholerae* porin *OmpT* by iron and *Fur*. *J. Bacteriol.* 2011; 193(23):6505–11.
5. Dekker N., Cox R.C., Kramer R.A., Edmond M.R. Substrate specificity of the integral membrane protease *OmpT* determined by spatially addressed peptide libraries. *Biochemistry*. 2001; 40:1694–701.
6. Ding Y., Davis B.M., Waldor M.K. *Hfq* is essential for *Vibrio cholerae* virulence and downregulates  $\sigma^c$  expression. *Mol. Microbiol.* 2004; 53(1):345–54.
7. Eren E., van den Berg B. Structural basis for activation of an integral membrane protease by lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(28):23971–6.
8. Goguen J.D., Bugge T., Degen J.L. Role of pleiotropic effects of plasminogen deficiency in infection experiment with plasminogen-deficient mice. *Methods*. 2000; 21:179–83.
9. Kienle Z., Emody L., Svanborg C., O'Toole P.W. Adhesive properties conferred by the plasminogen activator of *Yersinia pestis*. *J. Gen. Microbiol.* 1992; 138:1679–87.
10. Kramer R.A., Brandenburg K., Vandenputte-Rutten L., Werkhoven M., Gros P., Dekker N., Egmond M.R. Lipopolysaccharide regions involved in the activation of *Escherichia coli* outer membrane protease *OmpT*. *Eur. J. Biochem.* 2002; 269:1746–52.
11. Kuehn M.J., Kesty N.C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev.* 2005; 19:2645–55.
12. Kukkonen M., Lahteenmaki K., Suomalainen M., Kalkkinen N., Emody L., Lang H., Korhonen T.K. Protein regions important for plasminogen inactivation and inactivation of  $\alpha$ -antiplasmin in the surface protease *Pla* of *Yersinia pestis*. *Mol. Microbiol.* 2001; 40(5):1097–111.
13. Kukkonen M., Korhonen T.K. The omptin family of enterobacterial surface proteases/ adhesines: from housekeeping in *Escherichia coli* to systemic spread of *Yersinia pestis*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2004; 294(1):7–14.
14. Kutyrev V., Mehig R.J., Motin V.L., Pokrovskaya M.S., Smirnov G.B., Brubaker R.R. Expression of the plague plasminogen activator in *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1999; 67(3):1359–67.
15. Lahteenmaki K., Virkola R., Saren A., Emody L., Korhonen T.K. Expression of plasminogen activator *pla* of *Yersinia pestis* enhances bacterial attachment to the mammalian extracellular matrix. *Infect. Immun.* 1998; 66(12):5755–62.
16. Li C.C., Crawford J.A., DiRita V.J., Kaper J.B. Molecular

- cloning and transcriptional regulation of *ompT*, a *ToxR*-repressed gene in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 2000; 35(1):189–203.
17. Martinez-Govea A., Ambrosio J., Gutierrez-Coogco L., Flisser A. Identification and strain differentiation of *Vibrio cholerae* by using polyclonal antibodies against outer membrane proteins. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001; 8(4):768–71.
18. Merrell D.S., Bailey C., Kaper J.B., Camilli A. The *ToxR*-mediated organic acid tolerance response of *Vibrio cholerae* requires *OmpU*. *J. Bacteriol.* 2001; 183(9):2746–54.
19. Mey A.R., Craig S.A., Payne S.M. The effects of amino acids supplementation on porin expression and *ToxR* levels in *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2012; 80(2):518–28.
20. Miller V., Mekalanos J.J. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* 1988; 170(6):2575–83.
21. Osorio C., Martinez-Wilson H., Camilli A. The *ompU* paralog *vca1008* is required for virulence of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2001; 186(15):5167–71.
22. Potempa J., Pike R.N. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *J. Innate Immun.* 2009; 1(2):70–87.
23. Provenciano D., Klose K.E. Altered expression of the *ToxR*-regulated porins *OmpU* and *OmpT* diminishes *Vibrio cholerae* bile resistance, virulence factors expression and intestinal colonization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 2000; 97(18):10220–4.
24. Provenciano D., Lauriano C.M., Klose K.E. Characterization of the role of the *ToxR*-modulated outer membrane porins *OmpU* and *OmpT* in *Vibrio cholerae* virulence. *J. Bacteriol.* 2001; 183(12):3652–62.
25. Sodeinde O.A., Subrahmanyam Y.V., Stark K., Quan T., Bao Y., Goguen J.D. A surface protease and the invasive character of plague. *Science*. 1992; 258:1004–7.
26. Song T., Sabharwal D., Wai S.N. *VrrA* mediates *Hfq*-dependent regulation of *OmpT* synthesis in *Vibrio cholerae*. *J. Mol. Biol.* 2010; 400:682–8.
27. Skorupski K., Taylor R.K. Cyclic AMP and its receptor protein negatively regulate the coordinate expression of cholera toxin and toxin-coregulated pilus in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997; 94:265–70.
28. Sperandio V., Giron J.A., Silveira W.D., Kaper J.B. The *OmpU* outer membrane protein, a potential adherence factor of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 1995; 63(11):4433–8.
29. Stumpe S., Schmid R., Stefens D.L., Georgious G., Bakker E.P. Identification of *OmpT* as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of *E. coli*. *J. Bacteriol.* 1998; 180(15):4002–6.
30. Vandeputte-Rutten L., Kramer R.A., Kroon J., Dekker N., Egmond M.R., Gros P. Crystal structure of the outer membrane protease *OmpT* from *E. coli* suggest a novel catalytic site. *EMBO J.* 2001; 20:5033–9.
31. Vogel J., Papenfort K. Small non-coding RNA's and the bacterial outer membrane. *Curr. Opin Microbiol.* 2006; 9(6):605–11.

#### References

1. Dentovskaya S.V., Platonov M.E., Bakhteeva I.V., Anissimov A.P. [The presence of the complete lipopolysaccharide core structure is necessary for the activation of *Yersinia pestis* plasminogen]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2007; 93:49–51.
2. Zаднова S.P. [Functional role of *ToxR*-regulated proteins of *Vibrio cholerae* outer membrane]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2004; 1(87):9–13.
3. Shipko E.S., Mishan'kin B.N., Duванова O.V., Романова L.V., Ерибемян А.К. [*Vibrio cholerae* plasminogen activating capacity and participation of *OmpT* membrane protein in the process]. *Zashchita Naselen. Sreda Obit.* 2012; 4(229):17–9.
4. Craig S.A., Carpenter C.D., Mey A.R., Wickoff E.E., Payne S.M. Positive regulation of the *Vibrio cholerae* porin *OmpT* by iron and *Fur*. *J. Bacteriol.* 2011; 193(23):6505–11.
5. Dekker N., Cox R.C., Kramer R.A., Edmond M.R. Substrate specificity of the integral membrane protease *OmpT* determined by spatially addressed peptide libraries. *Biochemistry*. 2001; 40:1694–701.
6. Ding Y., Davis B.M., Waldor M.K. *Hfq* is essential for *Vibrio cholerae* virulence and downregulates  $\sigma^c$  expression. *Mol. Microbiol.* 2004; 53(1):345–54.
7. Eren E., van den Berg B. Structural basis for activation of an integral membrane protease by lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 2012; 287(28):23971–6.
8. Goguen J.D., Bugge T., Degen J.L. Role of pleiotropic effects of plasminogen deficiency in infection experiment with plasminogen-deficient mice. *Methods*. 2000; 21:179–83.
9. Kienle Z., Emody L., Svanborg C., O'Toole P.W. Adhesive properties conferred by the plasminogen activator of *Yersinia pestis*. *J. Gen. Microbiol.* 1992; 138:1679–87.
10. Kramer R.A., Brandenburg K., Vandenputte-Rutten L., Werkhoven M., Gros P., Dekker N., Egmond M.R. Lipopolysaccharide regions involved in the activation of *Escherichia coli* outer membrane protease *OmpT*. *Eur. J. Biochem.* 2002; 269:1746–52.
11. Kuehn M.J., Kesty N.C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev.* 2005; 19:2645–55.
12. Kukkonen M., Lahteenmaki K., Suomalainen M., Kalkkinen N., Emody L., Lang H., Korhonen T.K. Protein regions important for plasmino-

- gen inactivation and inactivation of  $\alpha$ -antiplasmin in the surface protease *Pla* of *Yersinia pestis*. *Mol. Microbiol.* 2001; 40(5):1097–111.
13. Kukkonen M., Korhonen T.K. The ompin family of enterobacterial surface proteases/ adhesines: from housekeeping in *Escherichia coli* to systemic spread of *Yersinia pestis*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2004; 294(1):7–14.
  14. Kuttyrev V., Mehig R.J., Motin V.L., Pokrovskaya M.S., Smirnov G.B., Brubaker R.R. Expression of the plague plasminogen activator in *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1999; 67(3):1359–67.
  15. Lahteenmaki K., Virkola R., Saren A., Emody L., Korhonen T.K. Expression of plasminogen activator *pla* of *Yersinia pestis* enhances bacterial attachment to the mammalian extracellular matrix. *Infect. Immun.* 1998; 66(12):5755–62.
  16. Li C.C., Crawford J.A., DiRita V.J., Kaper J.B. Molecular cloning and transcriptional regulation of *ompT*, a *ToxR*-repressed gene in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 2000; 35(1):189–203.
  17. Martinez-Govea A., Ambrosio J., Gutierrez-Coogco L., Flisser A. Identification and strain differentiation of *Vibrio cholerae* by using polyclonal antibodies against outer membrane proteins. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2001; 8(4):768–71.
  18. Merrell D.S., Bailey C., Kaper J.B., Camilli A. The *ToxR*-mediated organic acid tolerance response of *Vibrio cholerae* requires *OmpU*. *J. Bacteriol.* 2001; 183(9):2746–54.
  19. Mey A.R., Craig S.A., Payne S.M. The effects of amino acids supplementation on porin expression and *ToxR* levels in *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2012; 80(2):518–28.
  20. Miller V., Mekalanos J.J. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J. Bacteriol.* 1988; 170(6):2575–83.
  21. Osorio C., Martinez-Wilson H., Camilli A. The *ompU* paralog *vca1008* is required for virulence of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2001; 186(15):5167–71.
  22. Potempa J., Pike R.N. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. *J. Innate Immun.* 2009; 1(2):70–87.
  23. Provenciano D., Klose K.E. Altered expression of the *ToxR*-regulated porins *OmpU* and *OmpT* diminishes *Vibrio cholerae* bile resistance, virulence factors expression and intestinal colonization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 2000; 97(18):10220–4.
  24. Provenciano D., Lauriano C.M., Klose K.E. Characterization of the role of the *ToxR*-modulated outer membrane porins *OmpU* and *OmpT* in *Vibrio cholerae* virulence. *J. Bacteriol.* 2001; 183(12):3652–62.
  25. Sodeinde O.A., Subrahmanyam Y.V., Stark K., Quan T., Bao Y., Goguen J.D. A surface protease and the invasive character of plague. *Science.* 1992; 258:1004–7.
  26. Song T., Sabharwal D., Wai S.N. *VrrA* mediates *Hfq*-dependent regulation of *OmpT* synthesis in *Vibrio cholerae*. *J. Mol. Biol.* 2010; 400:682–8.
  27. Skorupski K., Taylor R.K. Cyclic AMP and its receptor protein negatively regulate the coordinate expression of cholera toxin and toxin-coregulated pilus in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94:265–70.
  28. Sperandio V., Giron J.A., Silveira W.D., Kaper J.B. The *OmpU* outer membrane protein, a potential adherence factor of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 1995; 63(11):4433–8.
  29. Stumpe S., Schmid R., Stefens D.L., Georgious G., Bakker E.P. Identification of *OmpT* as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of *E. coli*. *J. Bacteriol.* 1998; 180(15):4002–6.
  30. Vandeputte-Rutten L., Kramer R.A., Kroon J., Dekker N., Egmond M.R., Gros P. Crystal structure of the outer membrane protease *OmpT* from *E. coli* suggest a novel catalytic site. *EMBO J.* 2001; 20:5033–9.
  31. Vogel J., Papenfert K. Small non-coding RNA's and the bacterial outer membrane. *Curr. Opin Microbiol.* 2006; 9(6):605–11.

**Authors:**

Mishan'kin B.N., Duvanova O.V., Romanova L.V., Shipko E.S., Vodopyanov A.S. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru

**Об авторах:**

Мишанькин Б.Н., Дуванова О.В., Романова Л.В., Шипко Е.С., Водопьянов А.С. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru

Поступила 04.04.14.

К.А.Никифоров, Л.В.Анисимова, Г.Н.Одинокоев, А.В.Фадеева, Л.А.Новичкова, Г.А.Ерошенко,  
В.В.Кутырев

## КОНСТРУИРОВАНИЕ КОМПЛЕКТА ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГЕНОВ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ У ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОПАСНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ПРИМЕРЕ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS*, *VIBRIO CHOLERAЕ*, *ESCHERICHIA COLI*

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов,  
Российская Федерация

Для быстрого и эффективного выявления антибиотикоустойчивых штаммов возбудителей опасных бактериальных инфекций с помощью ПЦР сконструирован комплект праймеров для детекции генов устойчивости к стрептомицину (*strA*, *strB*), тетрациклину (*tetA*, *tetR*), хлорамфениколу (*catA*), канамицину (*npt*, *aphA*), ванкомицину (*sanA*), полимиксину (*pmrD*). Эффективность сконструированных праймеров подтверждена на выборке из 40 штаммов *Yersinia pestis*, 49 штаммов *Vibrio cholerae* и двух штаммов *Escherichia coli* из Государственной коллекции патогенных бактерий при РосНИПЧИ «Микроб». У штаммов возбудителя чумы выявлены гены антибиотикоустойчивости – *ntp* и *catA*; у штаммов возбудителя холеры – *strA*, *strB*, *npt*, *aphA*, *tetA* и *tetR*; у патогенного штамма кишечной палочки O157:H7 – *strA*, *tetR*, *ntp* и *aphA*. Установлена универсальность рассчитанных праймеров для детекции генов антибиотикоустойчивости у этих видов патогенных бактерий.

*Ключевые слова:* антибиотикоустойчивость, гены, полимеразная цепная реакция, возбудители опасных инфекций.

К.А.Nikiforov, L.V.Anisimova, G.N.Odinokov, A.V.Fadeeva, L.A.Novichkova, G.A.Eroshenko, V.V.Kutyrev

## Development of a Set of Primers for Drug-Resistance Genes Detection in the Agents of Dangerous Bacterial Infections as Exemplified by *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* Strains

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

A set of primers for detection of genes encoding resistance to streptomycin (*strA*, *strB*), tetracycline (*tetA*, *tetR*), chloramphenicol (*catA*), kanamycin (*npt*, *aphA*), vancomycin (*sanA*), polymyxin (*pmrD*) has been developed with the aim of rapid and effective detection of drug-resistant strains of dangerous bacterial infections agents. Efficacy of constructed primers has been confirmed against a panel of 40 *Yersinia pestis*, 49 *Vibrio cholerae*, and 2 *Escherichia coli* strains from the State collection of pathogenic bacteria of the RAPI "Microbe". Drug-resistance genes *ntp* and *catA* have been detected in plague agent strains, *strA*, *strB*, *npt*, *aphA*, *tetA* and *tetR* – in cholera agent; *strA*, *tetR*, *ntp* and *aphA* – in pathogenic strain *E. coli* O157:H7. Determined is universal character of the designed primers for drug-resistance genes detection in these pathogenic bacteria species.

*Key words:* drug-resistance, genes, polymerase chain reaction, dangerous infections agents.

Широкое применение антибиотиков для лечения опасных бактериальных инфекций приводит к отбору и распространению штаммов с множественной лекарственной устойчивостью. Примером этому явилась произошедшая в 2011 г. в Европе вспышка кишечной инфекции, обусловленная антибиотикоустойчивой энтерогеморрагической кишечной палочкой *Escherichia coli* O104:H4, вызвавшей инфицирование нескольких тысяч человек со значительным количеством летальных исходов. Другим примером опасного штамма бактерий с множественной лекарственной устойчивостью является *E. coli* O157:H7, который был впервые выявлен в 1982 г. Эшерихиоз O157:H7 вызывает вспышечные и спорадические случаи инфекции, преимущественно протекающей в виде геморрагического колита, который может осложняться гемолитическим уремическим синдромом [3, 6]. В настоящее время инфекции, обусловленные *E. coli* O157:H7, регистрируются практически повсеместно, а штаммы этой группы обладают множественной лекарственной устойчивостью к различным лекарственным препаратам.

Неоднократно выявлялись и антибиотикоустойчивые штаммы возбудителей особо опасных инфекций, в том числе *Yersinia pestis* и *Vibrio cholerae*. В 1995 г. на о. Мадагаскар от больного человека был изолирован штамм возбудителя чумы *Y. pestis* 17/95 с множественной лекарственной устойчивостью к хлорамфениколу, канамицину, ампициллину, стрептомицину, спектиномицину, тетрациклину, миноциклину, сульфониламидам и другим антибиотикам. Детерминанты устойчивости к антибиотикам были локализованы на конъюгативной плазмиде rIP1202 (150 т.п.н.), которая могла с высокой частотой передаваться между штаммами возбудителя чумы [4]. В 1995 г. на этой же территории был выделен и другой клинический штамм *Y. pestis* с высоким уровнем резистентности к стрептомицину, который содержал конъюгативную плазмиду rIP1203 (40 т.п.н.) с генами *strA* (801 п.н.) и *strB* (804 п.н.) [5].

В 2004 г. rIP1202-подобная плазида (устойчивость к стрептомицину, гентамицину, тетрациклину, хлорамфениколу, и триметоприму-сульфаметоксазолу) была обнаружена уже у штамма *V. cholerae*

O139 в Восточном Китае. В 2006 г. 92,16 % изолятов *V. cholerae* O139 в Восточном Китае содержали эту плазмиду. В 2002–2005 гг. идентичные плазмиды выявлены в изолятах *Salmonella enterica*, *Yersinia ruckeri* и у штаммов энтеробактерий, выделенных в США [7]. Появление в природе устойчивых к антибиотикам патогенных бактерий и быстрое распространение среди них генов резистентности к лекарственным препаратам требуют разработки простых и эффективных методов их идентификации.

Ранее нами были сконструированы праймеры для детекции генов антибиотикоустойчивости *strA*, *strB*, *tetA*, *tetR*, *cat*, *npt*, которые были апробированы на коллекции авторских антибиотикорезистентных штаммов *Yersinia pestis* из ГКПБ при РосНИПЧИ «Микроб» [1].

Целью этой работы было конструирование праймеров на другие гены антибиотикоустойчивости и исследование эффективности всего комплекта праймеров для выявления генов резистентности к лекарственным препаратам у штаммов возбудителей опасных инфекций *Y. pestis*, *V. cholerae* и патогенных *E. coli*.

### Материалы и методы

В работе использовано 40 штаммов *Y. pestis*, 49 штаммов *V. cholerae* и 2 штамма *E. coli*. Штаммы культивировали на агаре или бульоне LB при 37 °С. ДНК штаммов выделяли стандартным методом [2] и анализировали в ПЦР с помощью рассчитанных нами праймеров на гены антибиотикоустойчивости (таблица). Полимеразную цепную реакцию проводили по следующей программе: 1 цикл – 94 °С в течение 5 мин, затем 35 циклов при 94 °С – 45 с, 56 °С – 1 мин, 72 °С – 45 с и завершающий цикл 72 °С в течение 3 мин. Определение наличия амплифицированного фрагмента осуществляли методом электрофореза в 1–2 % агарозном геле.

### Результаты и обсуждение

Ранее нами на последовательности генов антибиотикорезистентности, кодируемых плазмидой pIP1202 (*strA*, *strB*, *tetA*, *tetR*, *catA*) и транспозоном Tn5 (*npt*), представленных в базе данных NCBI GenBank, был сконструирован набор праймеров, эффективность которых проверена на коллекции антибиотикоустойчивых штаммов *Y. pestis* из ГКПБ при РосНИПЧИ «Микроб» [1]. Гены устойчивости к канамицину (*npt*) были выявлены у 4 штаммов *Y. pestis*, а к хлорамфениколу – у 2. В связи с небольшой выборкой доступных нам антибиотикоустойчивых штаммов *Y. pestis* эффективность других сконструированных праймеров на гены *strA*, *strB*, *tetA*, *tetR* не была определена.

В данной работе эффективность этих праймеров проверена на штаммах других возбудителей опасных бактериальных инфекций – *V. cholerae* и патогенной *E. coli*. Это стало возможным в связи с тем, что у различных бактерий распространены одни и те же гены устойчивости, передаваемые в результате горизонтального переноса генетической информации с помощью содержащих эти гены мобильных генетических элементов – плазмид, транспозонов. В рамках этого исследования нами также сконструированы новые праймеры на другие гены: ген устойчивости к ванкомицину *sanA* (транспозон Tn1546), ген *aphA* (устойчивость к канамицину за счет аминогликозид 3'-фосфотрансферазной активности, транспозон Tn903), ген *pmrD* (устойчивость к полимиксину, *E. coli* O104:H4). Эффективность всего комплекта ранее и вновь сконструированных праймеров была проверена на выборке штаммов *Y. pestis*, *V. cholerae* и патогенных *E. coli*.

В коллекции авторских антибиотикоустойчивых и природных штаммов *Y. pestis* различного происхождения с помощью вновь сконструированных праймеров гены *sanA*, *aac3-VI*, *pmrD* и *aphA* выявить не

Последовательности использованных в работе праймеров для детекции генов антибиотикоустойчивости

Ген	Праймеры	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Размер амплификата, п.н.	Источник
<i>strA</i> (pIP1202)	<i>strA</i> -S <i>strA</i> -As	CATTCTGACTGGTTGCCTG ATTGCGGGACACCACATCA	387	[1]
<i>strB</i> (pIP1202)	<i>strB</i> -S <i>strB</i> -As	ACCTGTTCTCATTGCGGAC GAAAGGCACCCATAAGCGT	105	[1]
<i>tetA</i> (pIP1202)	<i>tetA</i> -S <i>tetA</i> -As	TACAGTGCCGTGCCAATCA TCTGCCGTTTGTCAATGCCG	648	[1]
<i>tetR</i> (pIP1202)	<i>tetR</i> -S <i>tetR</i> -As	ATGAGACAGGGATTGACGG TGACTGACCGCTGAAATCG	364	[1]
<i>catA</i> (pIP1202)	<i>cat</i> -S <i>cat</i> -As	ATTCAATCTTGCCCGCC ATCAGCACCTTGTCGCCTT	377	[1]
<i>npt</i> (Tn5)	Tn5(Kan)-S Tn5(Kan)-As	ATTCGGCTATGACTGGGCA ATGTTTCGCTTGGTGGTCCG	361	[1]
<i>sanA</i> (Tn1546)	<i>sanA</i> (Vank)-S <i>sanA</i> (Vank)-As	TTGCTGCTGTTGACTGTG ATAATGCCCGCTCACAGT	421	Данная работа
<i>pmrD</i> ( <i>E. coli</i> O104:H4)	<i>pmrD</i> (Pol)-S <i>pmrD</i> (Pol)-As	AATGCAATGGAATGGCTGG TTTCCCTGCCGCTTACA	246	Данная работа
<i>aphA</i> (Tn903)	<i>aphA</i> (Kan)-S <i>aphA</i> (Kan)-As	ACAGCCGGTATAAAGGGA TTTCGCAATCCACATCGG	333	Данная работа

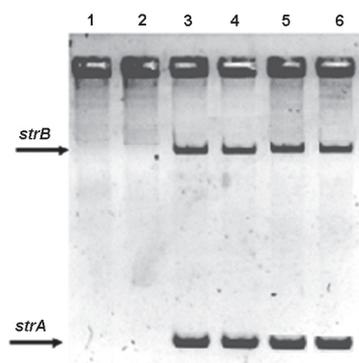


Рис. 1. ПЦР-анализ штаммов *V. cholerae* разных серогрупп с праймерами на гены *strA* и *strB* устойчивости к стрептомицину: Штаммы *V. cholerae*: 1 – P8845 (неO1/неO139, Ростовская область); 2 – M259 (неO1/O139, Саратовская область); 3 – 7007-62 (неO1/неO139, зарубежный); 4 – 218-68 (неO1/неO139, зарубежный); 5 – SG24 (O139, зарубежный); 6 – 8502/66 (O1, биовар эльтор, зарубежный)

удалось, что, как и в ранее проведенном исследовании, объясняется небольшим количеством имевшихся в нашем распоряжении антибиотикорезистентных штаммов *Y. pestis* [1].

Эффективность разработанного комплекта праймеров проверена также на 49 природных штаммах *V. cholerae* разного происхождения. Были исследованы штаммы *V. cholerae* неO1/неO139, изолированные в Астраханской (14 штаммов), Ростовской (5), Саратовской (5) областях, Республике Калмыкия (5) и дальнем зарубежье (15), а также штаммы O1 (3) и O139 (2) серогрупп из дальнего зарубежья.

Среди 15 штаммов неO1/неO139 серогруппы из дальнего зарубежья (Юго-Восточная Азия) выявлено 4 штамма с генами устойчивости к антибиотикам: стрептомицину (гены *strA*, *strB*), стрептомицину и канамицину (*strA*, *strB*, *npt*, *aphA*), стрептомицину, канамицину и тетрациклину (*strA*, *strB*, *npt*, *aphA*, *tetA*, *tetR*), стрептомицину (*strA*, *strB*), что коррелировало у этих штаммов с наличием резистентности к соответствующим антибиотикам. Гены *strA* и *strB* устойчивости к стрептомицину выявлены и у штамма O1 серогруппы биовара эльтор и двух штаммов O139 серогруппы O139 зарубежного происхождения (рис. 1).

Среди 22 штаммов *V. cholerae* неO1/неO139, выделенных в России, генов устойчивости к антибиотикам с помощью сконструированного комплекта праймеров не выявлено, что связано с отсутствием их распространенности у этих циркулирующих пре-

имущественно в водной среде вибрионов.

Генов устойчивости к ванкомицину, полимиксину и гентамицину нам не удалось выявить ни у одного из изученных штаммов *V. cholerae*.

Комплект сконструированных праймеров был использован и для изучения патогенного штамма *E. coli* O157:H7 и лабораторного штамма *E. coli* K12, широко применяемого в практике научно-исследовательских работ. Установлено наличие у штамма O157:H7 генов устойчивости к ванкомицину – *sanA*, полимиксину – *pmrD* в монолокусных ПЦР, и обоих генов одновременно – в мультилокусной ПЦР (рис. 2, а). В геноме штамма *E. coli* O157:H7 также присутствовали гены *strA* и *tetR* устойчивости к стрептомицину и тетрациклину (рис. 2, б). У штамма *E. coli* K12 все эти гены отсутствовали (рис. 2, а, б). Также были обнаружены гены устойчивости к канамицину: *npt* (неомицинфосфотрансфераза) и *aphA* (аминогликозид 3'-фосфотрансфераза).

Таким образом, нами разработан комплект праймеров на ряд генов антибиотикоустойчивости, эффективность которого проверена на штаммах возбудителей опасных инфекций *Y. pestis*, *V. cholerae* и патогенных *E. coli*. Показана эффективность и универсальность рассчитанных праймеров на гены *strA*, *strB*, *tetR*, *tetA*, *pmrD*, *sanA*, *npt*, *cat*, *aphA*, которые выявляются у штаммов разных патогенных видов *Y. pestis*, *V. cholerae* и *E. coli*. В дальнейшем предстоит расширить комплект сконструированных праймеров и проверить его универсальность для детекции генов антибиотикоустойчивости у других бактериальных патогенов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Анисимова Л.В., Шавина Н.Ю., Виноградова Н.А., Кутырев В.В. Антибиотикоустойчивые штаммы возбудителя чумы и разработка способа их детекции методом полимеразной цепной реакции. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 1(107):33–7.
2. Организация работ лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. МУ 1.3.2569-09.
3. Ряпис Л.А., Филатов Н.И., Сомова Н.Я., Сизых Е.В., Герасимов А.И., Светоч Э.А., Степашин Ю.Г., Баннов В.А., Ерусланов Б.В., Борзинов В.А., Храмов М.В., Гусев В.В. Характеристика штаммов *Escherichia coli* O157:H7, изолированных на территориях Центрального Федерального округа. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2005; 1:7–11.
4. Galimand M., Guiyoule A., Gerbaud G., Rahalison L., Chanteau S., Courvalin P., Carniel E. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferrable plasmid. *N. Engl. J. Med.* 1997; 337:677–80.
5. Guiyoule A., Gerbaud G., Buchrieser C., Galimand M.,

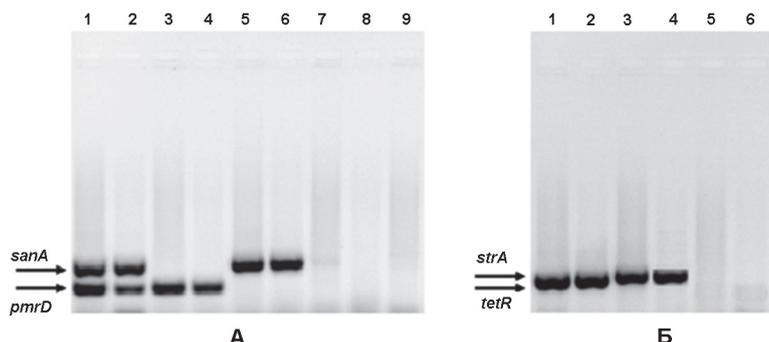


Рис. 2. ПЦР-анализ штаммов *E. coli* O157:H7 и K12 на гены антибиотикоустойчивости:

А. *E. coli* O157:H7: 1, 2 – *sanA* и *pmrD* (устойчивость к ванкомицину и полимиксину в мультилокусной ПЦР); 3, 4 – *pmrD* (к полимиксину); 5, 6 – *sanA* (к ванкомицину в монолокусных ПЦР); *E. coli* K12: 7 – *sanA* и *pmrD*; 8 – *pmrD*; 9 – *sanA*. Б. *E. coli* O157:H7: 1, 2 – *strA* (устойчивость к стрептомицину); 3, 4 – *tetR* (устойчивость к тетрациклину) в монолокусных ПЦР; *E. coli* K12: 5 – *strA*; 6 – *tetR*

Rahalison L., Chanteau S., Courvalin P., Carniel E. Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in a clinical isolate of *Yersinia pestis*. *Emerging Infect. Dis.* 2001; 7(1):43–8.

6. Hayashi T., Makino K., Ohnishi M., Kurokawa K., Ishii K., Yokoyama K., Han C.G., Ohtsubo E., Nakayama K., Murata T., Tanaka M., Tobe T., Iida T., Takami H., Honda T., Sasakawa C., Ogasawara N., Yasunaga T., Kuhara S., Shiba T., Hattori M., Shinagawa H. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.* 2001; 8(1):11–22.

7. Pan J.C., Ye R., Wang H.Q., Xiang H.Q., Zhang W., Yu X.F., Meng D.M., He Z.S. *Vibrio cholerae* O139 multiple-drug resistance mediated by *Yersinia pestis* pIP1202-like conjugative plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52(11):3829–36.

#### References

1 Eroshenko G.A., Odinkov G.N., Anisimova L.V., Shavina N.Yu., Vinogradova N.A., Kutyrev V.V. [Drug-resistant strains of plague agent and development of their detection method using polymerase chain reaction]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 1(107):33–7.

2. [Organization of work of the laboratories using methods of nucleic acids amplification while working with material containing microorganisms of I–IV pathogenicity groups]. MR 1.3.2569-09.

3. Ryapis L.A., Filatov N.I., Somova N.Ya., Sizykh E.V., Gerasimov A.I., Svetoch E.A., Stepashin Yu.G., Bannov V.A., Eruslanov B.V., Borzinov V.A., Khramov M.V., Gusev V.V., [Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated in the territory of Central Federal District]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2005; 1:7–11.

4. Galimand M., Guiyoule A., Gerbaud G., Rahalison L., Chanteau S., Courvalin P., Carniel E. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a

transferrable plasmid. *N. Engl. J. Med.* 1997; 337:677–80.

5. Guiyoule A., Gerbaud G., Buchrieser C., Galimand M., Rahalison L., Chanteau S., Courvalin P., Carniel E. Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in a clinical isolate of *Yersinia pestis*. *Emerging Infect. Dis.* 2001; 7(1):43–8.

6. Hayashi T., Makino K., Ohnishi M., Kurokawa K., Ishii K., Yokoyama K., Han C.G., Ohtsubo E., Nakayama K., Murata T., Tanaka M., Tobe T., Iida T., Takami H., Honda T., Sasakawa C., Ogasawara N., Yasunaga T., Kuhara S., Shiba T., Hattori M., Shinagawa H. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.* 2001; 8(1):11–22.

7. Pan J.C., Ye R., Wang H.Q., Xiang H.Q., Zhang W., Yu X.F., Meng D.M., He Z.S. *Vibrio cholerae* O139 multiple-drug resistance mediated by *Yersinia pestis* pIP1202-like conjugative plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52(11):3829–36.

#### Authors:

Nikiforov K.A., Anisimova L.V., Odinkov G.N., Fadeeva A.V., Novichkova L.A., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Никифоров К.А., Анисимова Л.В., Одинокоев Г.Н., Фадеева А.В., Новичкова Л.А., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 10.04.14.

Т.В.Сенина, Е.В.Шубникова

**МЕЛИОИДОЗ: ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ***ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград, Российская Федерация*

Обзор посвящен 100-летию открытия возбудителя мелиоидоза. Показаны основные достижения мировой науки в области экологии *Burkholderia pseudomallei*, эпидемиологии, клиники и лечения заболевания. Одновременно в статье обобщены данные по 50-летней разработке основных проблем мелиоидоза специалистами противочумной системы Российской Федерации.

*Ключевые слова:* мелиоидоз, экология, эпидемиология, химиотерапия.

T.V.Senina, E.V.Shubnikova

**Melioidosis: Milestones of the Scientific Studies***Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation*

The review is devoted to the 100<sup>th</sup> Anniversary of melioidosis agent discovery. Discussed are the key advances of world science in the sphere of *Burkholderia pseudomallei* ecology, epidemiology, clinical picture, and treatment of the disease. Apart from this, summarized are the data on the 50-years long study of melioidosis, carried out by the specialists of Plague Control Agency of the Russian Federation.

*Key words:* melioidosis, ecology, epidemiology, chemotherapy.

В Бирме в 1912 г. майор британской медицинской службы А. Whitmore при вскрытии трупов погибших от сепсиса морфинистов обнаружил у них патоморфологические проявления (абсцессы, язвения), напоминающие поражения при сапе. Из содержимого абсцессов внутренних органов была выделена подвижная грамотрицательная палочка, по своим фенотипическим признакам напоминающая возбудителя сапа. Тогда же он дал возбудителю этого заболевания первое биномиальное название – *Bacillus pseudomallei* [31, 32]. В дальнейшем А. Stanton и W. Fletcher [28, 29] обнаружили аналогичный микроорганизм у больных домашних животных и грызунов в этом регионе. Выделенный ими микроб проявил свою патогенность в экспериментах на подопытных обезьянах. Предложенное авторами наименование заболевания «melioidosis» официально было признано Дальневосточной ассоциацией тропической медицины [28].

По своим основным фенотипическим свойствам возбудитель мелиоидоза длительное время входил в обширный род *Pseudomonas*, в дальнейшем было показано, что уровень гомологии рРНК псевдомонад различных групп отличался в большей степени друг от друга, нежели от *Escherichia coli* [22]. Дальнейшие исследования уровня филогенетического родства различных видов псевдомонад по результатам секвенирования 16S рРНК позволили Е. Yabuuchi *et al.* [33] в 1992 г. выступить с предложением о выделении псевдомонад 2-й группы рРНК-ДНК-гомологии, куда входил и возбудитель мелиоидоза, в самостоятельный род – *Burkholderia*. Род *Burkholderia* входит в семейство *Burkholderiaceae*, порядок *Burkholderiales*, класс *Betaproteobacteria*, тип *Proteobacteria* и включает в

настоящее время порядка 30 видов бактерий, подавляющее большинство которых состоит из свободноживущих сапрофитов и фитопатогенов. В этот род, помимо *B. pseudomallei*, входят также филогенетически близкие ей виды *B. mallei* и *B. thailandensis*, уровень фенотипического сходства которых с возбудителем мелиоидоза позволяет их объединить в одну таксономическую группу. При этом есть основания считать, что *B. mallei* и *B. thailandensis* можно рассматривать как биовары (патовары) *B. pseudomallei*, отличающиеся от него по признакам патогенности и способности к существованию во внешней среде [4].

В течение длительного времени мелиоидоз рассматривался в качестве зоонозной инфекции, источником заболевания считались дикие и домашние животные. При эпидемиологических исследованиях в эндемичных районах, было показано, что в естественных условиях мелиоидозом болеют более 50 видов млекопитающих и птиц [7, 14, 24, 29]. Однако при тщательном анализе эпидемиологических вспышек заболевания было установлено, что ни в одном случае заболевание мелиоидозом не удается связать с непосредственным заражением человека от больных животных. Заболевание не имеет характерного для зоонозов профессионального характера. В то же время легко прослеживается взаимосвязь вспышек мелиоидоза среди людей и животных со степенью обсемененности возбудителем объектов внешней среды. Концентрация *B. pseudomallei* в почве и воде отчетливо коррелирует с сезоном дождей на территориях влажных субтропиков, на этот же период приходится пик заболеваемости мелиоидозом среди людей и животных [3, 14, 15, 19, 24, 27]. Все это позволило причислить возбудитель мелиоидоза к классическим

представителям сапронозов с типичной структурой источника заражения, эпидемиологией и профилактическими мероприятиями в очаге [2, 7, 8, 14, 19, 24]. Характер эпидемиологических особенностей мелиоидоза во многом определяет и формирование резервуара возбудителя инфекции. *B. pseudomallei* считается типичным незавершенным паразитом, поэтому объекты внешней среды в его экологии нельзя рассматривать в качестве фактора передачи, поскольку в них проходят все циклы его жизнедеятельности [6, 7, 19, 27].

В естественных условиях возбудитель мелиоидоза не обнаруживается в виде планктонной взвеси. В природных условиях *B. pseudomallei* существует в 3 состояниях. Первое – в виде биопленки, состоящей из популяции бактерий с замедленным ростом, связанных между собой экстраклеточным полисахаридом, при этом микробы в биопленке обладают более высокой степенью устойчивости к неблагоприятным факторам внешней среды, в том числе и к антибиотикам [16, 19, 25]. Вторым вариантом сохранения и существования во внешней среде *B. pseudomallei* является интернализация в фагосомах простейших, чаще всего в *Acanthamoeba astronyxys*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *Hartmanella vermiformis*, где в состоянии симбиоза поддерживается рост популяции *B. pseudomallei*. В период накопления бактерий в фагосомах простейших происходит не только сохранение популяции, но и отмечено повышение вирулентности культур [8]. Наконец, третьим вариантом сохранения популяции в природе является существование *B. pseudomallei* во внешней среде и в макроорганизмах в виде так называемых жизнеспособных, но не культивируемых клеток (VBNC), которые при определенных условиях превращаются в типичные клетки, способные вызывать патологические процессы в организме животных [23].

Основными симптомами пациентов, поступивших в клинику с подозрением на мелиоидоз, являются лихорадка, головные боли, катаральные явления, кожные поражения (сыпь, абсцессы, бубоны), нарушения функций различных органов и систем (сердечно-сосудистой, пищеварительной, мочеполовой). Поэтому вполне понятны проблемы постановки диагноза мелиоидоза на основании клинической симптоматики. В случае четко установленного срока с момента заражения (внутрилабораторная авария, травма с повреждением кожного покрова) инкубационный период при мелиоидозе обычно протекает за 3–4 дня [17, 24, 26]. Однако мелиоидоз относится к заболеваниям, при которых проявления клинической симптоматики может наблюдаться через несколько месяцев и даже лет после исходного заражения [3, 14, 15, 24]. Чаще всего заболевание протекает на фоне других патологических состояний, ведущих к снижению иммунного статуса макроорганизма: диабет, истощение, тяжелые травмы, онкологические заболевания [14, 24]. Однако отнести мелиоидоз к оппортунистической инфекции нельзя, поскольку

наблюдаются зафиксированные случаи заболевания среди абсолютно здоровых молодых людей (военнослужащих, спортсменов), сюда входят и заболевания у медицинского персонала в случае внутрилабораторного заражения во время работы со штаммами *B. pseudomallei* [17, 18, 26].

При лечении больных мелиоидозом необходимо учитывать возраст, иммунный статус, характер сопутствующих заболеваний и обязательно спектр чувствительности возбудителя к антибиотикам. Показано, что *B. pseudomallei* резистентен к большинству антибактериальных химиопрепаратов [5, 14, 16, 21]. В настоящее время при лечении больных чаще всего используют тетрациклины, цефалоспорины, карбапенемы, хинолоны и комбинированные сульфаниламиды. Нужно отметить, что многие препараты, активные *in vitro*, могут оказаться малоэффективными при использовании их для лечения мелиоидоза из-за неспособности воздействовать на внутриклеточно расположенные микробы и сформировавшиеся *in vivo* биопленки. В этих состояниях *B. pseudomallei* становится менее чувствительной к антибиотикам [25, 27]. Так как в процессе химиотерапии возможно формирование резистентных клонов *B. pseudomallei*, рекомендуется проводить серийные исследования антибиотикограмм.

При лечении тяжелых острых форм мелиоидоза рекомендуется внутривенное введение цефтазидима (100 мг/кг/день) в сочетании с ко-тримоксазолом (48 мг/кг/день). Суточная доза препаратов делится на три приема и вводится с перерывом 8 ч. Курс парентеральной терапии длится до улучшения состояния больного, обычно он составляет 10–14 дней. Вторым этапом лечения является пероральная поддерживающая терапия с использованием доксициклина, ко-тримоксазола, амоксициллин-клавулата длящаяся от 8 до 20 недель. Курс терапии прекращается по окончательному выздоровлению пациента, при этом обязательно учитываются клинические проявления и результаты серологических анализов [3, 14, 15, 16, 24]. Длительность лечения локальных форм заболевания значительно короче (обычно 6 недель) и назначенные препараты вводят перорально. Курс лечения назначается строго индивидуально с учетом физического состояния пациента и его сопутствующих заболеваний [14, 24].

От уровня качества медицинской помощи в конкретном эндемичном регионе зависит эффективность лечения при различных формах заболевания. Так, показатель летальности при острых формах заболевания в клиниках стран Юго-Восточной Азии находится в пределах 50 %, а в Австралии он существенно ниже (< 25 %). Показатель летальности при локальных формах мелиоидоза практически везде ниже 10 % [14].

В процессе лечения любой формы мелиоидоза всегда имеется опасность возникновения рецидивов заболевания, процент которых, по данным различных авторов, доходит до четверти от количества

излеченных пациентов [14, 16, 24]. В большинстве своем культуры, выделенные при рецидивах, являются изогенными по отношению к исходным штаммам в начале заболевания. Хотя не исключается вероятность повторного заражения гетерогенными культурами [24].

Из различных источников следует, что в перечень биологических агентов входят около 40 возбудителей инфекционных болезней различной этиологии, среди которых постоянно присутствует возбудитель мелиоидоза. По своим военно-прикладным характеристикам возбудитель мелиоидоза в аэрозолированной форме практически не уступает сибиреязвенному микробу: высокая патогенность для человека и многих видов животных, большая смертность, реальная возможность получения биомассы в больших количествах при низких затратах, относительно высокая стабильность во внешней среде, наличие эффективных путей инфицирования, в первую очередь аэрогенного, отсутствие средств специфической профилактики, трудность лечения и клинической диагностики [3, 14, 24]. По критерию «восприятие заболевания населением» мелиоидозный микроб имеет нулевой рейтинг. Однако этот показатель отражает не только степень осведомленности широких слоев населения об этом заболевании, но и низкий уровень знаний по этой инфекции работников здравоохранения, что повышает потенциал данного возбудителя как биологического агента.

Обеспокоенность мировой медицинской общности сложившейся ситуацией подтверждается проведением международных конгрессов по мелиоидозу, которые проходили в 1998 г. в Таиланде, в 2001 г. – Австралии, в 2004 – Сингапуре, в 2007 – Таиланде, в 2010 – в Австралии. Анализ материалов этих конгрессов дает возможность составить представление о ретроспективном и современном состоянии проблемы мелиоидоза в мире [12, 13, 20, 30].

В 1962 г. на базе Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института была создана лаборатория сапа и мелиоидоза. В течение 10-летнего периода сотрудниками этой лаборатории была сформирована коллекция типичных штаммов возбудителя мелиоидоза (17 культур), начаты разработки по созданию диагностических препаратов, схем лечения и экстренной профилактики мелиоидоза, получен набор маркированных мутантов *B. pseudomallei* как основа будущих генетических экспериментов. Результаты этих исследований были обобщены в коллективной монографии «Мелиоидоз» [11].

С 1972 г. проблема изучения этих инфекций была передана в Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. В 2008 г. на основании приказа № 88 Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на базе Волгоградского научно-исследовательского противочумного института организован референс-центр по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза. В соответствии с этим же приказом все выделен-

ные на территории РФ культуры, подозрительные на принадлежность к видам *B. pseudomallei* и *B. mallei*, следует направлять для окончательной идентификации в Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт.

К настоящему времени в Волгоградском НИПЧИ создана репрезентативная коллекция патогенных буркхольдерий (более 100 штаммов 5 видов, выделенных в различных регионах мира). В ходе исследований были изучены системы генетического обмена у *B. pseudomallei*, получен набор маркированных штаммов, необходимых для проведения исследований по изучению патогенности и антибиотикочувствительности мелиоидозного микроба [9]. Проведены исследования по изучению чувствительности штаммов *B. pseudomallei* к антибактериальным препаратам, разработаны схемы эффективного лечения и экстренной профилактики мелиоидоза [2, 3, 5]. Подробно изучена антигенная структура *B. pseudomallei*, разработана схема идентификации и выделения отдельных антигенов, необходимых для разработки диагностических препаратов [11]. Проведены молекулярно-биологические исследования, в ходе которых отработаны генетические методы идентификации и типирования культур *B. pseudomallei* [1]. Разработан набор препаратов для лабораторной диагностики заболевания и идентификации патогенных буркхольдерий [3, 10, 11]. Методические приемы диагностики и схемы их применения оформлены в виде Методических указаний по лабораторной диагностике мелиоидоза, утвержденных Роспотребнадзором [10].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонов В.А., Илюхин В.И. Молекулярно-биологические подходы к диагностике и внутривидовому типированию возбудителей сапа и мелиоидоза. *Мол. генет., микробиол., вирусол.* 2005; 2:3–9.
2. Батманов В.П., Илюхин В.И., Антонов Ю.В. Лабораторный контроль эффективности химиотерапии при мелиоидозе. *Антибиотики и химиотерапия.* 1995; 2:415.
3. Илюхин В.И., Алексеев В.В., Королев Ю.С. Буркхольдерии – возбудители сапа и мелиоидоза. В кн.: *Руководство по медицинской микробиологии.* Кн. 2. М.: 2010. С. 755–87.
4. Илюхин В.И., Сенина Т.В., Плеханова Н.Г., Антонов В.А., Меринова Л.К., Сеимова И.К. *Burkholderia thailandensis*: биологические свойства, идентификация и таксономическая позиция. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2002; 1:7–11.
5. Илюхин В.И., Сенина Т.В., Трушкина М.Н., Шубникова Е.В., Антонов Ю.В., Андропова Н.В. Проблемы соответствия антибиотикочувствительности *in vitro* и эффективности химиотерапии инфекций, вызванных патогенными буркхольдериями. *Антибиотики и химиотерапия.* 2009; 7–8:19–23.
6. Калина Г.П. Род *Pseudomonas*: новые аспекты старой проблемы. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1985; 5:91–8.
7. Ларионов Г.М. Заносы мелиоидоза и эпидемиологический надзор за его распространением. *Микробиол. журн.* 1987; 3:93–7.
8. Литвин В.Ю., Гинцбург А.Л., Пушкарева В.И. Эпидемиологические аспекты экологии бактерий. М.: 1998. 256 с.
9. Меринова Л.К., Антонов В.А., Замараев В.С., Викторов Д.В. Мобилизация криптических плазмид возбудителя мелиоидоза в гетерологичные виды микроорганизмов. *Мол. генет., микробиол., вирусол.* 2002; 2:37–40.
10. Пивень Н.Н., Илюхин В.И., Замарин А.Е., Алексеев В.В., Васильев В.П. Адекватный выбор антигенов при серодиагностике экспериментального мелиоидоза. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2007; 2:49–53.
11. Ширяев Д.Т., редактор. Мелиоидоз. М.: «Медицина»; 1976. 110 с.

12. Antonov V.A. Molecular identification and typing of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*: when is enough enough? The 5th World Melioidosis Congress, Khon Kaen, Thailand. 2007. 198 p.
13. Batmanov V.P., Ilyukhin V.I., Andropova N.V. Susceptibility of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* to antibacterial drugs. The 4th World Melioidosis Congress, Singapore. 2004. 78 p.
14. Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(2):383–416.
15. Deris Z.Z., Hasan H., Suraiya M.N. Clinical characteristics and outcomes of bacteraemic melioidosis in a teaching hospital in a northeastern state of Malaysia: a five – year review. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2010; 4:430–5.
16. Estes D.M., Dow S.W., Schweizer H.P., Torres A.G. Present and future therapeutic strategies for melioidosis and glanders. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 2010; 8:325–38.
17. Green R.N., Tuffnell P.G. Laboratory acquired melioidosis. *Am. J. Med.* 1968; 44:599–605.
18. Howe C., Sampath A., Spotnitz M. The *pseudomallei* group: a review. *J. Infect. Dis.* 1971; 124(6):598–606.
19. Inglis T.J.J., Sagripanti J.L. Environmental factors that affect the survival and persistence of *Burkholderia pseudomallei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72:6865–75.
20. Ilyukhin V.I., Merinova L.K. Genetic transfer systems of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. International Congress on melioidosis. Bangkok. 1998. 57 p.
21. Mukhopadhyay C., Chawla K., Krishna S., Nagalakshmi N., Rao S.P., Bairy I. Emergence of *Burkholderia pseudomallei* and pandrug-resistant non-fermenters from southern Karnataka, India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 102:12–7.
22. Palleroni N.J., Kunisawa R., Contopoulou R. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1973; 23:333–9.
23. Pumpuang A., Chantaratita N., Wikraiphath C., Saipron N., Day N.P., Peacock S.J., Wuthiekanum V. Survival of *Burkholderia pseudomallei* in distilled water for 16 years. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2011; 105 (10):598–600.
24. Puthucheary S.D., Vadivelu J. Human melioidosis. Singapore. 2002; 95.
25. Sawasdidoln C., Taweekhaisupapong S., Sermwan R.W., Tattawasart U., Tungpradabkul S., Wongratanaheewin S. Growing *Burkholderia pseudomallei* in biofilm stimulating conditions significantly induces antimicrobial resistance. *PLoS One.* 2010; 5:91–6.
26. Schlech W.F., Turchik J.B., Westlake R.E., Klein G.C., Band J.D., Weaver R.E. Laboratory-acquired infection with *Pseudomonas pseudomallei* (melioidosis). *N. Engl. J. Med.* 1981; 305:1133–5.
27. Shams A.M., Rose L.J., Hodges L., Arduino M.J. Survival of *Burkholderia pseudomallei* on environmental surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73:8001–4.
28. Stanton A.T., Fletcher W. Melioidosis: a new disease of the tropics. *Trans. 4-th congress Far East Assoc. Trop. Med.* 1921; 2:196–8.
29. Stanton A.T., Fletcher W. Melioidosis, a disease of rodents communicable to man. *Lancet.* 1925; 1:10–3.
30. Viktorov D.V., Alekseev V.V., Zakharova I.B., Antonov V.A., Merinova L.K. High-level resistance to fluoroquinolones and cephalosporins in *Burkholderia pseudomallei* and closely related species. The 5th World Melioidosis Congress, Khon Kaen, Thailand. 2007. 247 p.
31. Whitmore A. An account of a glanders-like disease occurring in Rangoon. *J. Hyg. London.* 1913; 18:1–34.
32. Whitmore A., Krishnaswami C.S. An account of the discovery of the hitherto undescribed infective disease occurring among the population of Rangoon. *Indian Med. Gazette.* 1912; 47:262–7.
33. Yabuuchi E., Kosako Y., Oyaizu H., Hotta H., Hashimoto Y., Ezaki T., Arakawa M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 1992; 36 (12):1251–75.
5. Ilyukhin V.I., Senina T.V., Trushkina M.N., Shubnikova E.V., Antonov Yu.V., Andropova N.V. [Matters of correspondence between antibiotic susceptibility *in vitro* and chemotherapy efficacy of the infections caused by pathogenic *Burkholderia*]. *Antibiotiki i Khimioterapiya.* 2009; 7–8:19–23.
6. Kalina G.P. [Genus *Pseudomonas*: modern aspects of pressing from an earlier time issues]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1985; 5:91–8.
7. Larionov G.M. [Imported cases of melioidosis and epidemiological surveillance over its dissemination]. *Mikrobiol. Zh.* 1987; 3:93–7.
8. Litvin V.Yu., Gintsburg A.L., Pushkareva V.I. [Epidemiological Aspects of Bacteria Ecology]. M.; 1998. 256 p.
9. Merinova L.K., Antonov V.A., Zamaraev V.S., Viktorov D.V. [Induction of melioidosis agent cryptic plasmids into the heterologous species of microorganisms]. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* 2002; 2:37–40.
10. Piven' N.N., Ilyukhin V.I., Zamarin A.E., Alekseev V.V., Vasil'ev V.P. [Relevant selection of antigens for serological diagnostics of experimental melioidosis]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2007; 2:49–53.
11. Shiryayev D.T., editor [Melioidosis]. M.: "Meditsina"; 1976. 110 p.
12. Antonov V.A. Molecular identification and typing of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*: when is enough enough? The 5th World Melioidosis Congress, Khon Kaen, Thailand. 2007. 198 p.
13. Batmanov V.P., Ilyukhin V.I., Andropova N.V. Susceptibility of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* to antibacterial drugs. The 4th World Melioidosis Congress, Singapore. 2004. 78 p.
14. Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(2):383–416.
15. Deris Z.Z., Hasan H., Suraiya M.N. Clinical characteristics and outcomes of bacteraemic melioidosis in a teaching hospital in a northeastern state of Malaysia: a five – year review. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2010; 4:430–5.
16. Estes D.M., Dow S.W., Schweizer H.P., Torres A.G. Present and future therapeutic strategies for melioidosis and glanders. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 2010; 8:325–38.
17. Green R.N., Tuffnell P.G. Laboratory acquired melioidosis. *Am. J. Med.* 1968; 44:599–605.
18. Howe C., Sampath A., Spotnitz M. The *pseudomallei* group: a review. *J. Infect. Dis.* 1971; 124(6):598–606.
19. Inglis T.J.J., Sagripanti J.L. Environmental factors that affect the survival and persistence of *Burkholderia pseudomallei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72:6865–75.
20. Ilyukhin V.I., Merinova L.K. Genetic transfer systems of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. International Congress on melioidosis. Bangkok. 1998. 57 p.
21. Mukhopadhyay C., Chawla K., Krishna S., Nagalakshmi N., Rao S.P., Bairy I. Emergence of *Burkholderia pseudomallei* and pandrug-resistant non-fermenters from southern Karnataka, India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 102:12–7.
22. Palleroni N.J., Kunisawa R., Contopoulou R. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1973; 23:333–9.
23. Pumpuang A., Chantaratita N., Wikraiphath C., Saipron N., Day N.P., Peacock S.J., Wuthiekanum V. Survival of *Burkholderia pseudomallei* in distilled water for 16 years. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2011; 105 (10):598–600.
24. Puthucheary S.D., Vadivelu J. Human melioidosis. Singapore. 2002; 95.
25. Sawasdidoln C., Taweekhaisupapong S., Sermwan R.W., Tattawasart U., Tungpradabkul S., Wongratanaheewin S. Growing *Burkholderia pseudomallei* in biofilm stimulating conditions significantly induces antimicrobial resistance. *PLoS One.* 2010; 5:91–6.
26. Schlech W.F., Turchik J.B., Westlake R.E., Klein G.C., Band J.D., Weaver R.E. Laboratory-acquired infection with *Pseudomonas pseudomallei* (melioidosis). *N. Engl. J. Med.* 1981; 305:1133–5.
27. Shams A.M., Rose L.J., Hodges L., Arduino M.J. Survival of *Burkholderia pseudomallei* on environmental surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73:8001–4.
28. Stanton A.T., Fletcher W. Melioidosis: a new disease of the tropics. *Trans. 4-th congress Far East Assoc. Trop. Med.* 1921; 2:196–8.
29. Stanton A.T., Fletcher W. Melioidosis, a disease of rodents communicable to man. *Lancet.* 1925; 1:10–3.
30. Viktorov D.V., Alekseev V.V., Zakharova I.B., Antonov V.A., Merinova L.K. High-level resistance to fluoroquinolones and cephalosporins in *Burkholderia pseudomallei* and closely related species. The 5th World Melioidosis Congress, Khon Kaen, Thailand. 2007. 247 p.
31. Whitmore A. An account of a glanders-like disease occurring in Rangoon. *J. Hyg. London.* 1913; 18:1–34.
32. Whitmore A., Krishnaswami C.S. An account of the discovery of the hitherto undescribed infective disease occurring among the population of Rangoon. *Indian Med. Gazette.* 1912; 47:262–7.
33. Yabuuchi E., Kosako Y., Oyaizu H., Hotta H., Hashimoto Y., Ezaki T., Arakawa M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* 1992; 36 (12):1251–75.

## References

1. Antonov V.A., Ilyukhin V.I. [Molecular-biological approaches to diagnostics and intraspecific typing of melioidosis and glanders agents]. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* 2005; 2:3–9.
2. Batmanov V.P., Ilyukhin V.I., Antonov Yu. V. [Laboratory control over chemotherapy efficacy in case of melioidosis]. *Antibiotiki i Khimioterapiya.* 1995; 2:415.
3. Ilyukhin V.I., Alekseev V.V., Korolev Yu.S. [*Burkholderia* - melioidosis and glanders agents]. In: [Guidelines on Medical Microbiology]. Book 2. M.; 2010. P. 755–87.
4. Ilyukhin V.I., Senina T.V., Plekhanova N.G., Antonov V.A., Merinova L.K., Seimova I.K. [*Burkholderia thailandensis*: biological properties, identification and taxonomy position]. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.* 2002; 1:7–11.

## Authors:

Senina T.V., Shubnikova E.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

## Об авторах:

Сенина Т.В., Шубникова Е.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 22.10.13.

Н.С.Червякова, Т.В.Валова, А.В.Осин

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛИОФИЛЬНЫХ АППАРАТОВ КАМЕРНОГО ТИПА В КОЛЛЕКЦИЯХ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

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

На примере установки Martin Christ Epsilon 2-6D проведена оценка возможности применения лиофильных установок камерного типа для консервации коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов. Разработан алгоритм лиофилизации штаммов бактерий III–IV групп патогенности, включающий условия лиофилизации и обеспечение биологической безопасности при осуществлении этого процесса. Определены показатели жизнеспособности и выживаемости лиофилизированных клеток штаммов патогенных бактерий. С помощью теста термостабильности рассчитаны прогнозируемые сроки хранения препаратов коллекционных штаммов, сублимированных во флаконах на установке Martin Christ Epsilon 2-6D. Установлено, что наиболее перспективно лиофилизаторы камерного типа могут использоваться в коллекциях патогенных микроорганизмов для консервации бактерий III–IV групп патогенности, требующих массового воспроизводства и не подлежащих длительному хранению. В то же время их применение в лиофилизации штаммов I–II групп патогенности, закладываемых на долгосрочное хранение, требует дальнейшей адаптации этих аппаратов по направлениям обеспечения биологической безопасности и увеличения сроков хранения образцов.

*Ключевые слова:* коллекционные штаммы, лиофилизация, выживаемость клеток, прогнозируемый срок хранения.

N.S.Chervyakova, T.V.Valova, A.V.Osin

## Application of Freeze-Dryers of Chamber Type in the Collections of Pathogenic Microorganisms

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

By the example of Martin Christ Epsilon 2-6D device carried out was assessment of the possibility to use freeze-dryers of the chamber type for conservation of pathogenic microorganisms collection strains. Elaborated was algorithm of lyophilisation of the III–IV pathogenicity groups bacteria, which incorporated conditions of freeze-drying and biological safety provision of this process. Indices of viability and survivability were defined for freeze-dried cells of pathogenic bacteria strains. Using thermostability test calculated were predicted timelines of storage of collection strains preparations freeze-dried in the flasks in Martin Christ Epsilon 2-6D. It was determined that in the collections of pathogenic microorganisms freeze-dryers of the chamber type could be used most prospectively for the III–IV pathogenicity groups bacteria conservation requiring mass reproduction and not intended for long storage. At the same time their application for freeze-drying of the strains of the I–II pathogenicity groups bacteria intended for a long storage, requires further adaptation of these devices as regards biological safety provision and prolongation of the shelf life.

*Key words:* collection strains, freeze-drying, survivability of cells, predicted shelf life.

Одной из важных задач, решаемых в коллекциях микроорганизмов, является поддержание сохраняемых культур в жизнеспособном, неизменном состоянии в течение максимально возможного времени. Для реализации этого направления деятельности существует широкий выбор методов, одним из которых является лиофилизация [2, 4]. Лيوфилизированные культуры микроорганизмов хранятся длительное время при температуре 4 °С, кроме того они способны выдерживать без особых последствий и более высокие температуры, что позволяет транспортировать законсервированные этим способом штаммы на большие расстояния без потери жизнеспособности и заявленных свойств с минимальными затратами [1, 4, 7].

Лيوфилизация патогенных микроорганизмов обычно осуществляется в ампулах на лиофильных аппаратах коллекторного типа. К настоящему времени единственным документом, регламентирующим лиофилизацию микроорганизмов I–IV групп патогенности на федеральном уровне, является «Инструкция по лиофильному высушиванию возбудителей инфек-

ционных заболеваний I–IV групп на коллекторном аппарате системы К.Е.Долинова». Данная установка, по сравнению с современными аппаратами, по своим рабочим характеристикам морально и физически устарела, однако с точки зрения обеспечения биологической безопасности превосходит их, поскольку может тотально обрабатываться любыми дезинфекционными средствами, а также подвергаться процедуре автоклавирования. Тем не менее, аппарат К.Е.Долинова необходимо модернизировать или заменить на более современные, производительные установки. Примером такого решения может являться лиофильная сушка камерного типа Martin Christ Epsilon 2-6D, процесс лиофилизации на которой происходит в изолированной камере во флаконах.

Таким образом, целью нашего исследования явилась оценка возможности применения лиофильной сушки камерного типа для консервации коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов, разработка алгоритма их лиофилизации, обеспечение биологической безопасности этого процесса, опреде-

ление жизнеспособности и оценка длительности хранения полученных бактериальных препаратов.

### Материалы и методы

В работе использовано восемь тест-штаммов микроорганизмов III–IV групп патогенности: *Escherichia coli* 18 и 675, *Shigella flexneri* 17, 58573, 8516, *Shigella sonnei* «S-форма», *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (209-P), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Выращивание микроорганизмов проводили на агаре Хоттингера с соблюдением необходимых условий, требующихся для нормального роста вышеуказанных видов бактерий. Лиофилизацию культур осуществляли на сублимационной установке камерного типа фирмы Martin Christ Epsilon 2-6D согласно ее правилам эксплуатации.

Жизнеспособность микробов определяли путем посева их на питательные среды с последующим подсчетом к первоначальному числу жизнеспособных клеток (до начала хранения), принятому за 100 %. Для определения возможного времени хранения при 4 °C использовали ускоренный тест прогнозирования выживаемости лиофилизированных культур бактерий (тест термостабильности) [5, 9]. Статистическая обработка данных осуществлялась с помощью методов вариационной статистики. Определяли среднюю арифметическую ( $M$ ), стандартную ошибку ( $m$ ) [3].

### Результаты и обсуждение

**Определение условий лиофилизации.** Штаммы выращивали до ранней стационарной фазы, а затем их клетки ресуспендировали в среде высушивания в объеме 2–2,5 мл до конечной концентрации  $n \cdot 10^{10}$  КОЕ/мл. В качестве среды высушивания использовали сахарозо-желатиновую среду (среда Файбича), состоящую из 10 % сахарозы, 1,5 % желатинины и 0,1 % агара (рН 7,1–7,2). Суспензии клеток в среде высушивания разливали в стерильные флаконы для лиофилизации стандарта 2R по 0,5 мл и помещали их в лиофильную камеру, где осуществлялся весь цикл высушивания препарата.

В ряде экспериментов нами была определена оптимальная программа сублимации, которая включает пять этапов: охлаждение препарата до температуры –45 °C при давлении (1000 мбар) в течение 1 ч; начальная лиофилизация при температуре –45 °C и давлении 0,18 мбар в течение 1 ч; последующая лиофилизация при давлении 0,18 мбар с постепенным повышением (шаг в 3 °C) температуры до 20 °C в течение 1 ч; заключительная лиофилизация при давлении 0,18 мбар и температуре 20 °C в течение 1 ч; досушивание при температуре 20 °C и давлении 0,001 мбар в течение 1 ч и при температуре 30 °C и давлении 0,001 мбар в течение 2 ч соответственно. Полный цикл лиофилизации составил 7 ч. Полученный препарат имел вид таблетки кремового цвета, хорошо отстающей от стенок флакона.

**Обеспечение биологической безопасности процесса лиофилизации.** Одной из важнейших составляющих лиофилизации штаммов возбудителей инфекционных заболеваний является обеспечение биологической безопасности этого процесса. Поскольку при лиофилизации в камере пробки флаконов находятся в приоткрытом состоянии, необходимым для обеспечения сублимации воды, существует вероятность попадания клеток высушиваемых образцов в пространство лиофильной камеры. Чтобы проверить такую возможность, сразу после окончания лиофилизации были сделаны смывы с поверхностей камеры, выявившие наличие клеток высушиваемого образца, что может повлечь за собой создание аварийной ситуации с ПБА. В связи с этим нами был выработан комплекс необходимых мер для ее предотвращения.

Все этапы работы с ПБА III–IV групп патогенности проводили согласно СП 1.3.2322-08. Воздух, откачиваемый из сушильной камеры, во избежание проскока клеток лиофилизируемых микроорганизмов через НЕРА-фильтр, располагающийся внутри камеры, проводили через приемник с дезраствором. По окончании лиофилизации все внутренние поверхности лиофильной камеры, полки и поддоны, а также внутренний фильтр воздухозабора обрабатывали 70 % этиловым спиртом, помещение бокса лиофилизации облучали ультрафиолетом. Флаконы с высушенным ПБА перед завальцовкой двукратно обрабатывали снаружи 70 % этиловым спиртом с интервалом в 3–5 мин. В смывах, сделанных после проведения указанных процедур, живых микроорганизмов не выявлено. Наличие жизнеспособных клеток лиофилизируемых микроорганизмов на рабочих поверхностях лиофильной камеры указывает на возможность их попадания в помещение бактериологического бокса при открытии дверцы по окончании процесса сушки, что, в случае работы с возбудителями I–II групп патогенности, недопустимо. В связи с этим для лиофилизации штаммов возбудителей особо опасных инфекций необходима доработка лиофилизатора либо системой стерилизации камеры газообразным дезинфектантом до момента открытия дверцы, либо совмещения ее с боксом биологической безопасности III класса, в котором и будут проводиться все манипуляции по загрузке, выемке и обработке лиофильной камеры.

**Жизнеспособность лиофилизированных препаратов.** В процессе лиофилизации клетки микроорганизмов попадают в экстремальные условия, часть их погибает, что делает необходимым контролировать жизнеспособность высушиваемых образцов. В результате проведенных исследований было установлено, что полученные препараты ПБА содержали значительное количество живых клеток коллекционных штаммов (табл. 1).

Количество жизнеспособных клеток после лиофилизации у большинства микроорганизмов снизилось в среднем в 1,3–2 раза. Рассчитанный показатель выживаемости клеток соответствует средним

Таблица 1

Показатели жизнеспособности лиофилизированных препаратов коллекционных штаммов патогенных бактерий

Штамм	Количество жизнеспособных бактерий (м.к./мл)		Показатель выживаемости клеток %
	Перед лиофилизацией	После лиофилизации	
<i>S. flexneri</i> 17	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$	$(8,6 \pm 0,04) \cdot 10^9$	(71,7±8,5)
<i>S. flexneri</i> 58573	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$	$(8,0 \pm 0,04) \cdot 10^9$	(72,7±9,3)
<i>S. flexneri</i> 8516	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$	$(8,2 \pm 0,02) \cdot 10^9$	(68,3±8,4)
<i>S. sonnei</i> «S-форма»	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$	$(9,0 \pm 0,04) \cdot 10^9$	(75,0±8,3)
<i>E. coli</i> 18	$(4,0 \pm 0,2) \cdot 10^{10}$	$(2,6 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$	(65,0±5,4)
<i>E. coli</i> 675	$(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$	$(1,3 \pm 0,04) \cdot 10^{10}$	(65,0±5,0)
<i>S. aureus</i> ATCC 6538 (209-P)	$(9,3 \pm 0,7) \cdot 10^{10}$	$(6,8 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$	(73,1±7,7)
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	$(1,1 \pm 0,04) \cdot 10^{10}$	$(5,5 \pm 0,01) \cdot 10^9$	(50,0±9,0)

значениям, характерным для каждого из указанных микроорганизмов при их консервации методом лиофильного высушивания, и колеблется в пределах 50–75 % (табл. 1). Полученные результаты могут указывать на правильно подобранные условия лиофилизации, пригодные для консервации коллекционных штаммов микроорганизмов.

**Определение времени хранения лиофилизированных микроорганизмов.** Достоверность результатов определения численности живых бактерий в лиофилизированных препаратах подтверждали путем посева микроорганизмов на плотные питательные среды через выбранные промежутки времени их хранения при различных температурах, составлявшие при 4 °С – 12 мес., 25 °С – 14 дней и 37 °С – 14 дней. Было установлено, что выживаемость клеток лиофилизированных микроорганизмов изученных нами штаммов резко падает с увеличением температуры их хранения (табл. 2).

При этом лиофилизированные препараты *S. aureus* ATCC 6538 (209-P) и *E. faecalis* ATCC 29212 проявляли в десятки раз большую устойчивость к действию повышенных температур, чем штаммы шигелл и кишечной палочки. Также следует отметить, что инкубация препаратов коллекционных штаммов, лиофилизированных во флаконах при 25 °С в течение двух недель, не приводит к существенной гибели клеток. Потеря жизнеспособных клеток у изучаемых штаммов составила от 4,5 до 24,5 %. Полученный результат указывает на то, что данная форма упаковки подходит для транспортировки коллекцион-

ных штаммов почтовыми отправлениями, согласно Санитарным правилам СП 1.2.036-95, без необходимости сохранения холодной цепи.

На основании теста термостабильности был сделан прогноз времени хранения лиофилизированных культур. Рассчитанное нами время 50 % снижения количества жизнеспособных бактерий в высушенных образцах при хранении их в температурных условиях 4 °С ( $t_{50}$ ) сильно варьировало от штамма к штамму в зависимости от их видовой принадлежности (табл. 3). Так, для штаммов шигелл показатель  $t_{50}$  в среднем равнялся 2 годам, в то время как количество жизнеспособных клеток *S. aureus* ATCC 6538 (209-P) будет сокращаться до 50 % порога на протяжении почти 12 лет (табл. 3). В среднем штаммы, лиофилизированные во флаконах, могут храниться 4–6 лет до полной утраты жизнеспособных клеток [6].

Достоверность сделанного прогноза была подтверждена экспериментальным путем, на основе сравнения количества сохранившихся жизнеспособных клеток в лиофилизированных препаратах в течение 1 года хранения, рассчитанного в тесте термостабильности (37 °С – 14 дней), с таковым при поддержании штаммов в температурных условиях 4 °С – 12 мес. (табл. 3). Расхождения между рассчитанными прогнозируемыми величинами количества живых клеток и экспериментально полученными оказались весьма незначительными и колебались в пределах от 1,02 до 1,10, что может свидетельствовать о справедливой оценке времени хранения полученных препаратов коллекционных штаммов.

Таблица 2

Показатели выживаемости лиофилизированных клеток коллекционных штаммов патогенных бактерий после хранения их при разных температурах

Штамм	Количество клеток жизнеспособных бактерий					
	Хранение при 4 °С 1 год		Хранение при 25 °С 14 сут		Хранение при 37 °С 14 сут	
	м.к./мл	%	м.к./мл	%	м.к./мл	%
<i>S. flexneri</i> 17	$(5,4 \pm 0,04) \cdot 10^9$	(62,8±5,9)	$(6,7 \pm 0,03) \cdot 10^9$	(77,9±9,7)	$(2,0 \pm 0,1) \cdot 10^8$	(2,3±10)
<i>S. flexneri</i> 58573	$(5,0 \pm 0,04) \cdot 10^9$	(62,5±7,4)	$(6,2 \pm 0,04) \cdot 10^9$	(77,5±4,4)	$(1,9 \pm 0,2) \cdot 10^8$	(2,3±10)
<i>S. flexneri</i> 8516	$(5,1 \pm 0,04) \cdot 10^9$	(62,2±4,9)	$(6,5 \pm 0,04) \cdot 10^9$	(79,3±8,8)	$(1,7 \pm 0,1) \cdot 10^8$	(2,0±10,4)
<i>S. sonnei</i> «S-форма»	$(5,6 \pm 0,06) \cdot 10^9$	(62,2±7,8)	$(6,8 \pm 0,04) \cdot 10^9$	(75,5±6,5)	$(1,9 \pm 0,09) \cdot 10^8$	(2,1±10,4)
<i>E. coli</i> 18	$(1,9 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$	(73,0±5,4)	$(2,2 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$	(84,6±4,9)	$(1,6 \pm 0,7) \cdot 10^9$	(6,1±10,1)
<i>E. coli</i> 675	$(9,4 \pm 0,01) \cdot 10^9$	(72,3±3,1)	$(1,1 \pm 0,04) \cdot 10^{10}$	(84,6±7,5)	$(8,0 \pm 0,2) \cdot 10^8$	(6,1±10,2)
<i>S. aureus</i> ATCC 6538 (209-P)	$(6,3 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$	(92,6±2,0)	$(6,5 \pm 0,02) \cdot 10^{10}$	(95,5±8,4)	$(3,8 \pm 0,2) \cdot 10^{10}$	(55,8±6,3)
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	$(4,5 \pm 0,01) \cdot 10^9$	(81,8±1,8)	$(4,8 \pm 0,01) \cdot 10^9$	(87,2±8,0)	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^9$	(20,0±10,1)

Прогнозируемые и экспериментальные показатели выживаемости лиофилизированных культур при 4 °С хранения в течение 12 мес.

Штамм	Прогнозируемые данные <sup>1</sup>		Экспериментальные данные <sup>2</sup>	
	м.к./мл	t <sub>50</sub> <sup>3</sup> , сут	м.к./мл	t <sub>50</sub> , сут
<i>S. flexneri</i> 17	5,9·10 <sup>9</sup>	674	(5,4±0,04)·10 <sup>9</sup>	542
<i>S. flexneri</i> 58573	5,5·10 <sup>9</sup>	678	(5,0±0,04)·10 <sup>9</sup>	536
<i>S. flexneri</i> 8516	5,6·10 <sup>9</sup>	654	(5,1±0,04)·10 <sup>9</sup>	531
<i>S. sonnei</i> «S-форма»	6,1·10 <sup>9</sup>	658	(5,6±0,06)·10 <sup>9</sup>	531
<i>E. coli</i> 18	2,0·10 <sup>10</sup>	910	(1,9±0,1)·10 <sup>10</sup>	804
<i>E. coli</i> 675	9,9·10 <sup>9</sup>	910	(9,4±0,01)·10 <sup>9</sup>	777
<i>S. aureus</i> ATCC 6538 (209-P)	6,4·10 <sup>10</sup>	4359	(6,3±0,1)·10 <sup>10</sup>	3300
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	4,7·10 <sup>9</sup>	1576	(4,5±0,01)·10 <sup>9</sup>	1256

Примечания. <sup>1</sup>Результаты ускоренного теста прогнозирования выживаемости лиофилизированных культур в пересчете на хранение при 4 °С в течение 12 мес. <sup>2</sup>Результаты, полученные после хранения лиофилизированных препаратов при 4 °С в течение 12 мес. <sup>3</sup>Время, за которое при хранении лиофилизированных культур при 4 °С в препаратах останется не менее 5 % жизнеспособных клеток.

Полученные данные по времени хранения штаммов, лиофилизированных при помощи камерной сушки во флаконах, указывают на высокую вариабельность этого показателя. Так, например, согласно прогнозу, штаммы шигелл во флаконах будут храниться не более 4 лет, кишечной палочки – 5 лет, а золотистого стафилококка – почти 24 года, тогда как гарантированный срок хранения клеток микроорганизмов, высушенных в ампуле, составляет 50 и более лет, вне зависимости от видовой принадлежности [8].

Таким образом, лиофильная сушка Martin Christ Epsilon 2-6D, обладая вместительной камерой, позволяет получать за один цикл лиофилизации большое количество готовых препаратов и обеспечивать необходимый уровень биологической безопасности при консервации штаммов микроорганизмов III–IV групп патогенности. Кроме того, серия тест-штаммов, как правило, полностью распространяется между учреждениями-потребителями в течение 1–1,5 лет с момента их лиофилизации, что также хорошо соотносится с полученными нами результатами. Все это указывает на возможность использования лиофильных установок камерного типа в коллекциях патогенных бактерий для сублимации тест-штаммов, относящихся к III–IV группам патогенности.

Вместе с тем для применения этих аппаратов при лиофилизации штаммов микроорганизмов I–II групп патогенности в качестве основного инструмента формирования коллекционного фонда необходимо проведение дальнейших работ по их адаптации в направлении обеспечения необходимого уровня биологической безопасности и увеличения сроков хранения получаемых препаратов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беккер М.Е., Рапопорт А.И., Калакуцкий Л.В. Торможение жизнедеятельности клеток. Рига: Зинатне; 1987. 240 с.
2. Матвеева Е.В. Сохранение генофонда фитопатогенных бактерий методом лиофилизации. *АГРО XXI*. 2007; 10–12:28–30.
3. Плохинский Н.А. Биометрия. 2-е издание. 1970. 367 с.

4. Похиленко В.Д., Баранов А.М., Детушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки*. 2009; 4(12):99–121.

5. Филатова С.Н., Муравьева С.А., Фишман В.М. Прогнозирование выживаемости лиофилизированных спор *Acnomyces parvullus*, основанное на методе ускоренного хранения. *Микробиология*. 1977; 46(2):318–23.

6. American type culture collection methods: 1. Laboratory manual on preservation. Freezing and freeze-drying as applied to algae, bacteria, fungi and protozoa. Rockville (Maryland): ATCC; 1980. 51 p.

7. Donev T. Methods for Conservation of Industrial Microorganisms. Sofia; 2001. 93 p.

8. NCTC Freeze-Drying Services [Электронный ресурс]: <http://www.phe-culturecollections.org.uk/services/freezedrying/Freeze-Drying.aspx> (дата обращения 02.08.2013 г.).

9. Portner D.C., Leuschner R.G.K., Murray B.S. Optimising the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni*. *Cryobiology*. 2007; 54:265–70.

#### References

1. Bekker M.E., Rapoport A.I., Kalakutsky L.V. [Suppression of Vital Activity of the Cells]. Riga: Zinatne; 1987. 240 p.
2. Matveeva E.V. [Preservation of phytopathogenic bacteria genefond by means of freeze-drying]. *AGRO XXI*. 2007; 10–12:28–30.
3. Plokhinsky N.A. [Biometry]. 2-nd Edition. 1970. 367 p.
4. Pokhilenko V.D., Baranov A.M., Detushev K.V. [Methods of long storage of microorganisms collection cultures and tendencies of development]. *Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii. Povolzhsky Region. Meditsinskii Nauki*. 2009; 4 (12):99–121.
5. Filatova S.N., Murav'eva S.A., Fishman V.M. [Prognostication of survivability of freeze-dried spores of *Acnomyces parvullus*, based upon accelerated storage method]. *Mikrobiologiya*. 1977; 46 (2):318–323.
6. American type culture collection methods: 1. Laboratory manual on preservation. Freezing and freeze-drying as applied to algae, bacteria, fungi and protozoa. Rockville (Maryland): ATCC; 1980. 51 p.
7. Donev T. Methods for Conservation of Industrial Microorganisms. Sofia; 2001. 93 p.
8. NCTC Freeze-Drying Services [Электронный ресурс]: <http://www.phe-culturecollections.org.uk/services/freezedrying/Freeze-Drying.aspx> (дата обращения 02.08.2013 г.).
9. Portner D.C., Leuschner R.G.K., Murray B.S. Optimising the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni*. *Cryobiology*. 2007; 54:265–70.

#### Authors:

Chervyakova N.S., Valova T.V., Osin A.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Червякова Н.С., Валова Т.В., Осин А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 12.09.13.

УДК 616.9:616-07

О.А.Носкова<sup>1</sup>, Т.Ю.Загоскина<sup>1</sup>, Е.Н.Субычева<sup>1</sup>, Е.Ю.Марков<sup>1</sup>, Ю.О.Попова<sup>1</sup>, Л.Г.Гриднева<sup>1</sup>,  
Е.П.Михайлов<sup>2</sup>

## ПРИМЕНЕНИЕ ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ ЧУМНОГО МИКРОБА В ПОЛЕВОМ МАТЕРИАЛЕ

<sup>1</sup>ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт», Иркутск, Российская Федерация; <sup>2</sup>ФКУЗ «Алтайская противочумная станция», Горно-Алтайск, Российская Федерация

Сконструированы тест-системы с применением высокодисперсных золей серебра в качестве маркера специфических антител для детекции антигенов возбудителя чумы методом дот-иммуноанализа. Показана их высокая чувствительность при исследовании типичных штаммов чумного микроба:  $\geq 5 \cdot 10^4$  КОЕ/мл и растворимых антигенов (FI) –  $\geq 4,8$  нг/мл; а также высокая специфичность: отсутствие ложноположительных реакций с 5 гетерологичными микроорганизмами. Проведена апробация тест-систем на обнаружение антигенов чумного микроба в полевом материале из Алтайского горного природного очага чумы методом дот-иммуноанализа и сравнение результатов исследований с реакцией пассивной гемагглютинации. Разработанные тест-системы обладают рядом преимуществ по сравнению с рутинными серологическими реакциями и могут с успехом применяться в практическом здравоохранении как в стационарных, так и полевых условиях.

*Ключевые слова:* чумной микроб, специфические антитела, коллоидное серебро, дот-иммуноанализ.

O.A.Noskova<sup>1</sup>, T.Yu.Zagoskina<sup>1</sup>, E.N.Subycheva<sup>1</sup>, E.Yu.Markov<sup>1</sup>, Yu.O.Popova<sup>1</sup>, L.G.Gridneva<sup>1</sup>, E.P.Mikhailov<sup>2</sup>

## Application of Dot-Immunoassay for Detection of Plague Agent Antigens in the Field Samples

<sup>1</sup>Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation; <sup>2</sup>Altai Plague Control Station, Gorno-Altai, Russian Federation

Test systems for *Yersinia pestis* antigen detection in dot-immunoassay were constructed using superfine silver sols as a marker of specific antibodies. Demonstrated were their high sensitivity while analyzing typical *Y. pestis* strains ( $\geq 5 \cdot 10^4$  CFU/ml) and soluble antigens (FI) –  $\geq 4.8$  ng/ml and high specificity, confirmed by the absence of false-positive reactions with five heterologous microorganisms. The test-systems were used for *Y. pestis* antigen detection in field material from the territory of the Altai mountain natural plague focus by dot-immunoassay with comparison of the received results in passive hemagglutination reaction. Test-systems possessed a number of advantages as compared to routine serological reactions and could be applied with success by practical public health services both in stationary and field conditions.

*Key words:* plague agent, specific antibodies, colloid silver, dot-immunoassay.

Возникновение в последнее время угрозы биотерроризма с вероятностью использования возбудителя чумы в качестве биологического оружия определяют необходимость разработки и совершенствования методов индикации чумного микроба [3, 7]. Время выявления возбудителей особо опасных инфекций имеет определяющее значение для эффективного и своевременного проведения комплекса противоэпидемических и профилактических мероприятий. Для обнаружения возбудителя чумы и его антигенов в лабораторной практике имеется достаточный набор методов: бактериологический, биологический, гемагглютинационные (реакция пассивной гемагглютинации, реакция нейтрализации антител), иммунофлуоресцентный, иммуноферментный, иммунохроматографический, цитоиммунофлуорометрический, молекулярно-биологический (полимеразная цепная реакция) [6, 8, 10]. Каждый из этих методов обладает своими достоинствами и недостатками, связанными либо с ограниченной чувствительностью или специфичностью, либо с использованием дорогостоящего оснащения и химреактивов, токсичных компонентов для здоровья оператора и вредных для окружающей среды.

Первичные учреждения здравоохранения не всегда имеют необходимую базу для выполнения

сложных анализов и нуждаются в оснащении надежными, простыми и недорогими бесприборными диагностическими тестами. В последнее время в практической работе находит все более широкое применение дот-иммуноанализ (ДИА) с использованием в качестве маркера специфических антител частиц коллоидных металлов. Известно, что многие из коллоидных металлов являются активными катализаторами и потенциально способны в индикаторных реакциях обеспечить усиление сигнала на 1–3 порядка в сравнении с ферментными маркерами, тем самым значительно повышая чувствительность точечного твердофазного иммунного анализа [1, 2, 5].

Разработка высокочувствительных специфичных диагностикумов с использованием коллоидного серебра позволяет обеспечивать потребность в относительно недорогих препаратах для медицинских и научных целей, а простота выполнения анализа и возможность визуального учета результатов делает перспективным их применение в полевых условиях [1, 11].

Целью работы явилось испытание сконструированных с использованием методологии иммунокаталитического анализа тест-систем для дот-иммуноанализа с применением высокодисперсных золей серебра в качестве маркера специфических антител,

позволяющих проводить скрининг полевого материала на наличие антигенов чумного микроба.

### Материалы и методы

Исследован полевой материал, собранный при эпизоотологическом обследовании Алтайского горного природного очага чумы: смывы с органов отловленных мелких млекопитающих (даурской пищухи, длиннохвостого суслика, плоскочерепной полевки, их трупов, погадки хищных птиц). Материал, предположительно содержащий антигены чумного микроба, подвергали обеззараживанию согласно требованиям безопасности работы с микроорганизмами I–II групп патогенности. В соответствии с Методическими указаниями 3.1.3.2355-08 использовали минимальное разведение исследуемого материала 1:10; меньшие разведения образцов не испытывались в связи с тем, что эритроциты и другие окрашенные субстанции, осаждающиеся на пористой мембране, затрудняют процедуру отмывания подложки и влияют на четкость получаемых результатов. Всего исследовано 190 проб.

Источником специфических антител служили гипериммунные кроличьи сыворотки, полученные иммунизацией животных FI-антигеном, а также поливалентные сыворотки, полученные после иммунизации кроликов вакцинным штаммом *Yersinia pestis* EV. Адсорбцию поливалентной чумной сыворотки проводили с использованием клеток *Yersinia pseudotuberculosis* И-686. Фракцию иммуноглобулинов G (IgG) выделяли комбинированным методом с применением каприловой кислоты и сульфата аммония [9].

Для постановки ДИА нами сконструировано два вида тест-систем: IgG из сыворотки, полученной против фракции I чумного микроба, меченные коллоидным серебром (aFI=KC), и IgG из адсорбированной поливалентной противочумной сыворотки, меченные коллоидным серебром (IgG=KC).

Приготовление коллоидного серебра и его комплексообразование со специфическими IgG осуществляли по методу А.Г.Полтавченко и соавт. [4]. Технология конструирования тест-систем включала следующие этапы: получение золя серебра с заданной дисперсностью путем смешивания равных объемов водных растворов боргидрида натрия и азотнокислого серебра, получение комплекса маркера со специфическими антителами, стабилизация конъюгатов и блокирование свободных сайтов связывания на поверхности частиц серебра [4, 5, 11].

Постановку реакции осуществляли с использованием прямого варианта дот-иммуноанализа, как более экспрессного, экономичного и, на наш взгляд, более приемлемого для работы в полевых условиях. Постановка реакции заключалась в нанесении исследуемого материала на твердофазный носитель (нитроцеллюлозную мембрану фирмы «Synpro» с размером пор 0,45 мкм); блокировании свободных участков связывания раствором инертного белка (казеинат натрия либо бычий сывороточный альбумин); детекции адсорбированных антигенов с помощью конъюгатов противочумных IgG, меченных колло-

идным серебром. Учет результатов проводили после погружения мембраны в раствор проявителя, состоящего из метола, лимонной кислоты и азотнокислого серебра, путем визуальной оценки проявившихся темно-серых пятен в местах нанесения положительного контроля и проб, содержащих антигены чумного микроба [1, 11]. Интенсивность окрашивания пятен оценивалась от + до +++++. Для проведения сравнительного анализа использовали реакцию пассивной гемагглютинации (РПГА) с чумным эритроцитарным иммуноглобулиновым диагностикумом (производства НИИ микробиологии МО РФ, Россия), применяющуюся традиционно в полевых условиях.

В качестве положительных контролей использовали инактивированную взвесь чумного микроба *Y. pestis* EV концентрацией  $10^6$  КОЕ/мл и FI – 10 нг/мл, в качестве отрицательного контроля – пробу, не содержащую антиген (разводящая жидкость).

Проверку специфичности дот-иммуноанализа осуществляли со штаммами близкородственных бактерий: *Yersinia enterocolitica* O:3 (референтный штамм *Y. enterocolitica* И-134), *Y. enterocolitica* O:9 (референтный штамм *Y. enterocolitica* И-76), *Y. pseudotuberculosis* (референтные штаммы *Y. pseudotuberculosis* И-53, *Y. pseudotuberculosis* И-72), *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ концентрацией  $10^6$  КОЕ/мл. Ввиду того, что в полевом материале высокие концентрации возбудителя чумы ( $10^8$ – $10^9$  КОЕ/мл) практически не встречаются, а при разработке тест-систем учитывалось данное обстоятельство, то и для проверки специфичности более высокие концентрации гетерологичных микроорганизмов не применялись.

Проверку чувствительности ДИА проводили с использованием 4 типичных штаммов чумного микроба основного и алтайского подвидов (*Y. pestis* subsp. *pestis* и *Y. pestis* subsp. *altaica*) из коллекции музея живых культур института.

### Результаты и обсуждение

Из числа рутинных серологических методов индикации дот-иммуноанализ обладает преимуществом по чувствительности, скорости проведения реакции, экономичности расходования исследуемого материала и реагентов. Принцип работы сконструированных тест-систем основан на выявлении специфических антигенных комплексов, адсорбированных на твердофазном носителе.

Нами показана стабильная высокая чувствительность обеих сконструированных тест-систем (aFI=KC и IgG=KC) при исследовании штаммов чумного микроба –  $\geq 5 \cdot 10^4$  КОЕ/мл и растворимых антигенов (FI) –  $\geq 4,8$  нг/мл, а также высокая специфичность: отсутствие ложноположительных реакций с 5 гетерологичными микроорганизмами в концентрации  $10^6$  КОЕ/мл.

При исследовании полевого материала (190 проб) методом ДИА были получены положительные результаты в 8 пробах (смывы с органов длиннохвостого суслика *Citellus undulatus* – 4, даурской пищухи *Ochotona daurica* – 3, плоскочерепной полевки *Alticola strelzovi* – 1), что составило 4,2 %.

Результаты серологических исследований полевого материала из Горно-Алтайского природного очага чумы

Код образца	Исследуемый материал	ДИА с использованием диагностикумов:		РПГА
		aFI – KC	п/в AT-KC	
37	Смыв с органов длиннохвостого суслика	1:320 (++++)	1:320 (++++)	1:80
101	Смыв с органов длиннохвостого суслика	1:320 (++++)	1:320 (++++)	1:40
162	Смыв с органов даурской пищи	1:80 (++)	1:80 (++)	-
183	Смыв с органов длиннохвостого суслика	1:320 (++++)	1:320 (++++)	1:80
70	Смыв с органов даурской пищи	1:160 (+++)	1:160 (+++)	1:40
14	Смыв с органов даурской пищи	1:160 (++)	1:160 (+++)	1:20
171	Смыв с органов плоскочерепной полевки	1:80 (++)	1:80 (+++)	-
157	Смыв с органов даурской пищи	1:80 (++)	1:80 (+++)	-

Примечание: в таблице приведены максимальные значения разведенный исследуемого материала.

Существенной разницы при использовании тест-систем на основе aFI=KC и поливалентного IgG=KC не отмечено (таблица). Интенсивность окрашивания сформированных в положительных случаях пятен соответствовала ++ – +++++. Время, затраченное на постановку ДИА, в среднем составило 1,5 ч. Все пробы были изучены в трех повторностях. Воспроизводимость результатов составила 100 %.

Обнаружение антигенов чумного микроба в РПГА зарегистрировано в 5 пробах, что составило 2,6 %. Время от начала постановки РПГА до учета результатов в среднем 3 ч. Совпадение положительных результатов в ДИА и РПГА отмечалось в 5 образцах. На наш взгляд, большее количество положительных находок, полученных методом ДИА, в сравнении с РПГА объясняется более высокой чувствительностью твердофазных иммунохимических методов по сравнению с агглютинационными. Вместе с тем ДИА более экспрессивна (время проведения анализа – 1,5 ч), требует небольшого объема исследуемого образца (1–2 мкл) и расходных материалов (таблица).

Таким образом, разработанные и апробированные нами при исследовании полевого материала тест-системы с использованием противочумных IgG, меченных коллоидным серебром, для детекции антигенов возбудителя чумы высокочувствительны, специфичны, экспрессивны, экономичны, не требуют оснащения лабораторий дорогостоящими реактивами и оборудованием. Простота выполнения анализа и возможность визуального учета результатов позволяют их реализовывать в качестве сигнальных тестов в полевых условиях, а также в условиях работы санитарно-противоэпидемических бригад (СПЭБ) в режиме чрезвычайных ситуаций. Кроме того, применение разработанных тест-систем позволит оперативно осуществлять эпидемиологический мониторинг и проводить быструю оценку ситуации при возникновении биологических угроз.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Загоскина Т.Ю., Голубинский Е.П., Меринов С.П.

Современные подходы к конструированию диагностических тест-систем с использованием неорганических корпускулярных меток. *Бюл. ВСНЦ СО РАМН*. 2004; 1(2):176–80.

2. Дыкман Л.А., Богатырев В.А. Наночастицы золота: получение, функционализация, использование в биохимии и иммунохимии. *Усп. химии*. 2007; 76(2):199–213.

3. Онищенко Г.Г., Сандакчиев Л.С., Нетесов С.В. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза. *Вестник РАН*. 2003; 73(3):195–204.

4. Полтавченко А.Г., Тузиков Ф.В., Полтавченко Д.А., Загоскина Т.Ю. Получение серебряных золей – маркеров для иммуноанализа. *Сибирь-Восток*. 2002; 4(52):18–20.

5. Полтавченко А.Г., Полтавченко Д.А., Загоскина Т.Ю. Перспективы использования коллоидного серебра как маркера в иммуноанализе. *Сибирь-Восток*. 2002; 3(51):10–2.

6. Полтавченко А.Г., Яковченко А.М. Многопрофильная серодиагностика инфекционных заболеваний. *Биотехнология*. 2007; 3:88–94.

7. Bellamy R.J., Freedman A.R. Bioterrorism. *QJM*. 2001; 94(4):227–34.

8. Iqbal S.S., Chambers J.P., Goode M.T., Valdes J.J., Brubaker R.R. Detection of *Yersinia pestis* by pesticin fluorogenic probe-coupled PCR. *Mol. Cell Probes*. 2000; 14(2):109–14.

9. McKinney M.M., Parkinson A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. *J. Immunol. Meth.* 1987; 96(2):271–8.

10. Rasoamanana B., Leroy F., Boisier P., Rasolomaharo M., Buchy P., Carniel E., Chanteau S. Field evaluation of an immunoglobulin G anti-F1 enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human plague in Madagascar. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1997; 4(5):587–91.

11. Zagoskina T.Yu., Noskova O.A., Markov E.Yu., Subycheva E.N., Dolgova T.M., Taikova T.S., Balakhonov S.V. Construction and approbation of solid-phase test systems using inorganic corpuscular markers for express-diagnostics of zoonotic diseases. One World-One Health: Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases Preparedness and Response: Proceedings of International Conference (11–12 April 2013). Ulaanbaatar; 2013. P. 187–91.

References

1. Zagoskina T.Yu., Golubinsky E.P., Merinov S.P. [Modern approaches to the construction of diagnostic test-systems using non-organic corpuscular labels]. *Byul. VSNC SO RAMN*. 2004; 1(2):176–80.

2. Dykman L.A., Bogatyrev V.A. [Gold nano-particles: obtaining, functionalisation, application in biochemistry and immunochemistry]. *Uspekhi Khimii*. 2007; 76(2):199–213.

3. Onishchenko G.G., Sandakhchiev L.S., Netesov S.V. [Bioterrorism: national and global menace]. *Vestnik RAN*. 2003; 73(3):195–204.

4. Poltavchenko A.G., Tuzikov F.V., Poltavchenko D.A., Zagoskina T.Yu. [Obtaining of silver sols – markers for immunoassay]. *Sibir-Vostok*. 2002; 4(52): 18–20.

5. Poltavchenko A.G., Poltavchenko D.A., Zagoskina T.Yu. [Prospects for application of colloid silver as immunoassay marker]. *Sibir-Vostok*. 2002; 3(51):10–2.

6. Poltavchenko A.G., Yakovchenko A.M. [Multi-field serodiagnostics of infectious diseases]. *Biotechnologiya*. 2007; 3:88–94.

7. Bellamy R.J., Freedman A.R. Bioterrorism. *QJM*. 2001; 94(4):227–34.

8. Iqbal S.S., Chambers J.P., Goode M.T., Valdes J.J., Brubaker R.R. Detection of *Yersinia pestis* by pesticin fluorogenic probe-coupled PCR. *Mol. Cell Probes*. 2000; 14(2):109–14.

9. McKinney M.M., Parkinson A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. *J. Immunol. Meth.* 1987; 96(2):271–8.

10. Rasoamanana B., Leroy F., Boisier P., Rasolomaharo M., Buchy P., Carniel E., Chanteau S. Field evaluation of an immunoglobulin G anti-F1 enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human plague in Madagascar. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1997; 4(5):587–91.

11. Zagoskina T.Yu., Noskova O.A., Markov E.Yu., Subycheva E.N., Dolgova T.M., Taikova T.S., Balakhonov S.V. Construction and approbation of solid-phase test systems using inorganic corpuscular markers for express-diagnostics of zoonotic diseases. One World-One Health: Emerging and Re-Emerging Infectious Diseases Preparedness and Response: Proceedings of International Conference (11–12 April 2013). Ulaanbaatar; 2013. P. 187–91.

Authors:

Noskova O.A., Zagoskina T.Yu., Subycheva E.N., Markov E.Yu., Popova Yu.O., Gridneva L.G. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Mikhailov E.P. Altai Plague Control Station. 2, Zavodskaya St., Gorno-Altai, 649002, Russian Federation. E-mail: chuma@mail.gornyy.ru

Об авторах:

Носкова О.А., Загоскина Т.Ю., Субычева Е.Н., Марков Е.Ю., Попова Ю.О., Гриднева Л.Г. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Михайлов Е.П. Алтайская противочумная станция. Российская Федерация, 649002, Горно-Алтайск, ул. Заводская, 2. E-mail: chuma@mail.gornyy.ru

Поступила 07.04.14.

С.А.Портенко, С.А.Щербакова, Е.С.Казаква, И.Н.Шарова, И.Г.Карнаухов, А.В.Топорков,  
В.В.Кутырев

## ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ БАЗЫ СПЭБ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов,  
Российская Федерация

Проанализированы этапы развития лабораторной базы СПЭБ. На первом этапе основное направление деятельности лабораторной базы состояло в проведении специфической индикации бактериальных средств поражения и лабораторного контроля объектов окружающей среды на зараженность возбудителями особо опасных инфекционных болезней. Значительное увеличение нагрузки на лабораторную базу СПЭБ произошло в период локализации и ликвидации эпидемических проявлений холеры в 70-х годах прошлого века, когда основными задачами лабораторного отделения было проведение массовых бактериологических исследований материала от людей, объектов окружающей среды и пищевых продуктов. Расширение функций лабораторной базы – проведение санитарно-микробиологических исследований, мониторинг объектов окружающей среды на вибриофлору и природно-очаговые инфекционные болезни, исследование клинического материала – связано с участием СПЭБ в зонах ликвидации медико-санитарных последствий стихийных бедствий, вооруженных конфликтов с гуманитарными последствиями, в проведении массовых мероприятий с международным участием.

Для совершенствования лабораторной базы СПЭБ важным является внедрение современных диагностических технологий, автоматизация различных этапов проведения анализа, а также стандартизация диагностических исследований и обеспечение соответствия лабораторной базы СПЭБ требованиям отечественных и международных стандартов.

*Ключевые слова:* СПЭБ, лабораторная база СПЭБ, бактериологическое отделение СПЭБ.

S.A.Portenko, S.A.Shcherbakova, E.S.Kazakova, I.N.Sharova, I.G.Karnaukhov, A.V.Toporkov, V.V.Kutyrev

## Key Stages in the Development of SAET Laboratory Facilities

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

Considered are the stages of the SAET laboratory facilities development. Initially main area of activities was assumed to be specific indication of bacterial threats and laboratory control over the ambient environment objects for the presence of particularly dangerous infectious disease agents. Significant increment in the workload occurred during the period of localization and elimination of epidemic cholera manifestations in the 1970s, when primary tasks of bacteriological unit consisted in carrying out mass bacteriological investigations of samples from humans, environment objects, and food items. Assignment of new functions to the laboratory facilities, such as performance of sanitary-microbiological investigations, monitoring over ambient environment objects for the presence of vibrio-flora and natural-focal infectious disease agents, clinical material assays – is associated with SAETs participation in liquidation of medical-sanitary consequences of natural disasters and human cost relief as aftermaths of military conflicts, as well as participation in management of mass events with international representation.

Most important issues in the development of SAET laboratory facilities are implementation of advanced diagnostic technologies, automatization of various stages in the process of analysis performing, standardization of diagnostic investigations, and ensuring compliance of the facilities with national and international requirements.

*Key words:* SAET, SAET laboratory facilities, SAET bacteriological unit.

Совершенствование организации лабораторной базы СПЭБ было определено эволюцией концепции СПЭБ. Задачи, которые ставились перед СПЭБ, и уровень развития лабораторной диагностики определяли и состояние лабораторной базы [19].

Образование СПЭБ в 1963 г. было обусловлено угрозой применения биологического оружия, поэтому основное направление работы СПЭБ состояло в проведении специфической индикации бактериальных средств поражения и лабораторного контроля объектов окружающей среды на зараженность возбудителями особо опасных инфекционных болезней (приказ МЗ СССР от 30.09.1963 № 466).

Вскоре после создания СПЭБ возникла необходимость их участия в локализации и ликвидации эпидемических проявлений холеры в 70-х годах

прошлого века, оказании помощи территориальным структурам здравоохранения. По данным архивных материалов РосНИПЧИ «Микроб», основными задачами бактериологического отделения было проведение массовых исследований материала от людей, объектов окружающей среды и пищевых продуктов. В этот период, в связи с недостатком лабораторных помещений в учреждениях Госсанэпиднадзора, для развертывания лабораторной базы СПЭБ использовали приспособленные помещения школ, клубов, институтов и др. Основным методом диагностики являлся бактериологический анализ.

В последующем, эффективность использования СПЭБ при ликвидации эпидемических очагов холеры была подтверждена во время эпидемии холеры в Республике Дагестан в 1994 г. Для ликвида-

ции вспышки холеры (на периоды наиболее интенсивного роста заболеваемости) были привлечены 6 СПЭБ в полном составе: Ростовского НИПЧИ – 2, Ставропольского НИПЧИ – 1, РосНИПЧИ «Микроб» – 2, Волгоградского НИПЧИ – 1. Это позволило усилить лабораторную базу наиболее крупных городов Республики Дагестан, увеличив ежедневное количество проводимых анализов до 1000 и более. Силами СПЭБ было проведено более 100 тыс. исследований на холеру материала от людей и из объектов окружающей среды [9].

Одной из форм использования специализированных бригад в очагах холеры было привлечение отдельных оперативных групп специалистов из их состава (в 55 % случаев) – при незначительной интенсивности эпидемического процесса и наличии лабораторной базы, способной обеспечить расшифровку генеза возникшей эпидемической вспышки. В качестве примера можно привести работу оперативной эпидемиолого-диагностической группы специалистов СПЭБ РосНИПЧИ «Микроб», участвовавших в ликвидации вспышки холеры в Республике Татарстан в 2001 г. [18].

Переломным моментом, повлиявшим на изменение концепции функционирования СПЭБ, а соответственно, и на организацию лабораторно-диагностической работы, стало привлечение СПЭБ к ликвидации медико-санитарных последствий в зоне стихийного бедствия (землетрясение в Армении в 1988–1989 гг.), когда СПЭБ в условиях разрушенной инфраструктуры осуществляли функции учреждений территориальной санитарно-эпидемиологической службы. Основным направлением работы лабораторного отделения СПЭБ на тот период стало осуществление текущего санитарного контроля сохранившихся и восстанавливаемых эпидемиологически значимых объектов, санитарно-бактериологический контроль качества питьевой воды, пищевых продуктов, бактериологическое исследование на патогенную кишечную микрофлору материала от больных, контактных, декретированных групп населения, проведение исследований в рамках мониторинга природно-очаговых инфекционных болезней. Такой широкий спектр задач, решаемых специалистами бактериологического отделения СПЭБ, потребовал не только серьезной подготовки по вопросам санитарной микробиологии, но и существенной модернизации всей материально-технической базы СПЭБ [7].

Дальнейшее совершенствование лабораторно-диагностического направления деятельности СПЭБ было связано с их участием в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения в зонах вооруженных конфликтов с гуманитарными последствиями – локальный осетино-ингушский конфликт (1992–1993 г.), вооруженный конфликт в Чеченской Республике (1995 г.), антитеррористическая операция на территории Чеченской Республики (2000 г.), в Республике Ингушетия, куда хлынул по-

ток беженцев из Чеченской Республики (1995, 1999–2000 гг.), грузино-южноосетинский вооруженный конфликт (2008 г.). В этой ситуации задачи лабораторной базы СПЭБ были во многом аналогичны таковым при работе в зоне землетрясения в Армении, а также в других чрезвычайных ситуациях (ЧС) природного характера [12] и были связаны с временным выполнением функций учреждений санитарно-эпидемиологического профиля. Специалисты СПЭБ проводили санитарно-микробиологические исследования питьевой воды, пищевых продуктов, объектов окружающей среды, а также эпизоотологическое обследование природных очагов особо опасных инфекционных болезней (чума, туляремия). Вместе с тем дополнительно была обеспечена готовность к диагностике заболеваний неясной этиологии и индикации возбудителей инфекционных болезней бактериальной природы в объектах окружающей среды. Для усиления территориальных учреждений госсанэпиднадзора в районах, менее других пострадавших в результате социального конфликта, где размещались беженцы, направляли эпидгруппы, сформированные из специалистов СПЭБ (как минимум один эпидемиолог и один бактериолог). Необходимо отметить, что в Чеченской Республике в ходе работы СПЭБ использовались лаборатории на базе автошасси: автолаборатория для бактериологической диагностики острых кишечных и капельных инфекций и крытый автомобиль ГАЗ-66 для приготовления питательных сред [1, 2, 3, 5, 10, 11, 16, 22].

Знаковым событием дальнейшего совершенствования лабораторной составляющей СПЭБ стало их участие в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия при проведении массовых мероприятий с международным участием (саммит АТЭС-2012 во Владивостоке, Универсиада-2013 в Казани, саммит «Большой двадцатки» в 2013 г. в Санкт-Петербурге, Олимпийские и Паралимпийские зимние игры в 2014 г. в Сочи). Организация лабораторных исследований на базе СПЭБ в период подготовки и проведения указанных выше мероприятий наглядно демонстрирует различные варианты тактики лабораторного обеспечения деятельности СПЭБ в зависимости от поставленных задач. Впервые наиболее полно возможности лабораторной базы СПЭБ (при таких мероприятиях) были раскрыты при организации работы в период проведения Универсиады-2013 в Казани. Основными направлениями деятельности лабораторного отделения СПЭБ были:

- обеспечение готовности к проведению лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней;
- проведение лабораторной диагностики инфекционных болезней у аккредитованных лиц;
- мониторинг воды поверхностных водоемов на вибриофлору;
- мониторинг воды системы горячего водоснабжения жилых домов Деревни Универсиады на наличие легионелл;

- санитарно-микробиологические исследования пищевых продуктов [17].

В то же время организация работы в период саммита «Большой двадцатки» продемонстрировала уникальные возможности СПЭБ по проведению массового лабораторного скрининга проб объектов окружающей среды и пищевых продуктов с использованием современных методов экспресс- и ускоренной диагностики. Анализ опыта организации лабораторного обеспечения во время проведения двух различных по своей специфике массовых мероприятий (Универсиады-2013 и саммита) показал, что продолжительность мероприятия, а также условия его проведения влияют на сроки выдачи ответа лабораторной службой, что является определяющим при выборе приоритетных методов и алгоритма исследований. Принимая во внимание значительный объем работы, приходящийся на лабораторную базу при обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия массовых мероприятий, среди основных принципов организации лабораторных исследований можно выделить следующие:

- выбор приоритетных показателей исследования;
- логистика системы отбора и доставки проб;
- приоритетное использование методов экспресс- и ускоренной диагностики (МФА, ИФА, ПЦР);
- автоматизация всех этапов исследования (пробоподготовка, микробиологические исследования и т.д.) [14, 15].

Наряду с расширением спектра выполняемых задач, еще одним направлением совершенствования лабораторного обеспечения деятельности СПЭБ является внедрение в работу СПЭБ современных диагностических технологий. Переломным моментом в этом плане стало использование ПЦР – метода, позволяющего провести индикацию (а в настоящее время и идентификацию) возбудителей инфекционных болезней в максимально короткие сроки. Успешное использование ПЦР при проведении эпидемиологического расследования вспышки сибирской язвы в Республике Мордовия в 1999 г. определило в дальнейшем место и роль молекулярно-генетического анализа как максимально востребованного при организации лабораторных исследований на базе СПЭБ.

В настоящее время в лабораториях СПЭБ наиболее широко применяется ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени. Значительная часть используемых тест-систем позволяет проводить многофакторный анализ, т.е. выявлять в одной пробе сразу несколько патогенов (например, комплекс возбудителей острых кишечных инфекций), или же определять несколько характеристик у одного возбудителя (систематическое положение, эпидемиологическую значимость и т.д.). Кроме этого, в соответствии с Регламентом функционирования СПЭБ в лабораториях СПЭБ необходимо осуществлять детекцию возбудителей 54 нозологий, большинство из которых – вирусы, и в этом случае ПЦР является мето-

дом выбора, поскольку реализация вирусологических исследований на базе СПЭБ нецелесообразна. Перспективы дальнейшего внедрения молекулярно-генетических методов в работу СПЭБ связаны с использованием секвенирования. Так, во время проведения Универсиады-2013 с целью определения вида возбудителя проведено секвенирование выделенной культуры в оперативном режиме и подтверждена ее гомология со штаммом *Salmonella enterica* [8].

Наряду с ПЦР, весьма востребованы и другие методы экспресс- и ускоренной диагностики – МФА, ИФА, ИХА. Проведение исследований этими методами предусмотрено в лаборатории индикации МК СПЭБ, однако, учитывая незначительные габаритные размеры оборудования, возможно его размещение в любом лабораторном блоке мобильного комплекса (МК).

Традиционно значительная роль при организации лабораторных исследований в СПЭБ отведена бактериологическому анализу. В настоящее время табель оснащения СПЭБ включает микробиологические анализаторы, и спектр их использования достаточно широк – от проведения санитарно-микробиологических исследований, до определения антибиотикограммы возбудителя.

Необходимо отметить и наличие в модернизированном МК СПЭБ оборудования, позволяющего автоматизировать процесс приготовления питательных сред. Внедрение автоматических средоварок, разливающих модулей и др. позволило значительно сократить штат среднего и младшего персонала, задействованного в обеспечении бактериологических исследований (приготовление и розлив питательных сред, подготовка лабораторной посуды).

Приоритетным вопросом при организации лабораторной диагностики особо опасных инфекционных болезней является соблюдение требований биологической безопасности. Развитие этого направления в работе лабораторных подразделений осуществлялось одновременно с эволюцией концепции функционирования СПЭБ и полностью было реализовано при ее модернизации [6]. Однако необходимо подчеркнуть, что соблюдение требований биологической безопасности выполняемых работ осуществлялось всегда, не зависимо от условий размещения лабораторной базы (помещения лабораторий санэпидслужбы, приспособленные помещения школ, клубов, палатки, пневмокаркасные модули и др.). В современных модернизированных лабораториях МК СПЭБ инженерно-технические средства позволяют обеспечить, в соответствии с критериями ВОЗ, в лабораториях индикации и особо опасных инфекций уровень биологической безопасности BSL-3 (изолированная лаборатория), а в бактериологической и санитарно-гигиенической лабораториях – BSL-2 (базовая лаборатория 2-го уровня) [4, 20].

Еще один ключевой вопрос, на котором необходимо остановиться, рассматривая эволюционные изменения и современное состояние организации ла-

бораторной диагностики в СПЭБ, – это соответствие требованиям международного стандарта, действующего и в Российской Федерации (ГОСТ ИСО/МЭК 17025 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий»).

Когда многие страны мира приняли участие в процессе внедрения ММСП (2005), они тем самым выразили свою приверженность созданию национальных мощностей для выявления событий в области общественного здравоохранения, имеющих международное значение, и для ответных действий на такие события. Результаты лабораторной диагностики, которым при чрезвычайных ситуациях международного значения будет доверять международное сообщество, возможно получить только в лабораториях национальных систем здравоохранения, где осуществляется надежное управление качеством [21]. Основные составляющие системы менеджмента качества (СМК) для лабораторий, в том числе осуществляющих исследования в рамках обеспечения санитарно-эпидемиологического надзора, определены в ГОСТ ИСО/МЭК 17025. Специалисты СПЭБ не осуществляют надзорные мероприятия, однако проводят исследования в рамках обеспечения санитарной охраны территории и эпидемиологического надзора. Особую актуальность организация таких исследований в лабораториях СПЭБ приобретает при работе в зоне ЧС при полном или частичном замещении местных учреждений Роспотребнадзора, или же при организации и проведении массовых мероприятий, когда деятельность СПЭБ осуществляется в теснейшем взаимодействии с органами и учреждениями Роспотребнадзора. Кроме этого, соответствие требованиям международных стандартов в области организации диагностических исследований (подтвержденное соответствующей аккредитацией) придает легитимность получаемым результатам и в случае задействования СПЭБ за рубежом. Современные лаборатории СПЭБ входят в состав испытательных лабораторных центров, функционирующих на базе противочумных институтов и аккредитованных в установленном порядке на техническую компетентность при осуществлении исследований.

Внедрение СМК обеспечило стандартизацию диагностических исследований, выполняемых во всех СПЭБ. Это было достигнуто, в том числе, за счет использования высокотехнологичного аналитического оборудования, проведения исследований в соответствии с единой номенклатурой, которая отражена в Регламенте функционирования СПЭБ [27] и внедрением СОП в работу лабораторий СПЭБ всех противочумных институтов. В этой связи необходимо отметить и работу по оптимизации нормативно-методического обеспечения, регламентирующего порядок организации и проведения лабораторной диагностики в МК СПЭБ и определяющего, наряду с другими составляющими, функционирование СМК в лабораториях МК СПЭБ.

Таким образом, анализ изменений, произошед-

ших в организации лабораторной диагностики за период от момента создания СПЭБ до настоящего времени, показал, что они полностью соответствуют эволюции концепции функционирования СПЭБ. Развитие лабораторно-диагностического спектра в деятельности СПЭБ обеспечило создание уникальных лабораторных комплексов, оснащенных современным оборудованием, на базе которых возможно проведение широкого спектра исследований (от индикации возбудителей особо опасных инфекционных болезней бактериальной и вирусной природы, токсинов, до санитарно-микробиологического анализа пищевых продуктов и объектов окружающей среды) в рамках мероприятий по санитарной охране территории и обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Грижебовский Г.М., Евченко Ю.М., Мезенцев В.М., Таран В.И., Тихенко Н.И., Ефременко Е.И., Еременко В.И. Опыт работы специализированной противоэпидемической бригады в условиях кризисной обстановки в городе Грозном. *Медицина катастроф*. 2000; 4(32):62–4.
2. Евченко Ю.М., Попов В.А., Савельев В.Н., Мезенцев В.М., Брюханов А.Ф., Бабеньшев Б.В., Сухов В.В., Еременко Е.И., Афанасьев Е.Н., Овчаров В.И. Бактериологическое обеспечение противоэпидемических мероприятий в чрезвычайных ситуациях. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1996; 3, Приложение: 49–53.
3. Евченко Ю.М., Грижебовский Г.М., Онищенко Г.Г., Платунин А.В., Зайцев А.А., Савченко А.Т., Лобанов А.Н., Таран В.И., Мерзоева Т.А., Ахметханов Р.М., Муцаев В.Х., Чибуряев В.И. О бактериологическом контроле хозяйственно-питьевого водоснабжения в г. Грозном в 1995 г. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1996; 3, Приложение: 57–9.
4. Казакова Е.С., Карнаухова И.Г., Шарова И.Н., Касьян И.А., Осин Н.А., Портенко С.А., Ивашенцева Л.Н., Каплун Г.А., Куклев Е.В., Красовская Т.Ю., Щербакова С.А., Топорков А.В., Кутырев В.В. Организация лабораторного мобильного комплекса специализированной противоэпидемической бригады противочумного института. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2010; 2:24–7.
5. Карбышев Г.Л., Баташев В.В., Кругликов В.Д., Голубев Б.П., Водопьянов С.О., Прометной В.И., Беспалов Е.Н., Миронов А.Н., Власов В.П., Бунин И.К., Бабанин С.Н. Опыт организации работы специализированных противоэпидемических бригад в условиях чрезвычайной ситуации на территории Чеченской республики в 1995 г. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1996; 3, Приложение: 31–5.
6. Кутырев В.В., Федоров Ю.М., Топорков А.В., Топорков В.П., Карнаухова И.Г., Старшинов В.А. Укрепление глобальной сети по предупреждению и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций: модернизация специализированных противоэпидемических бригад (СПЭБ) противочумных учреждений. *Пробл. особо опасных инф.* 2006; 92 (2):10–15.
7. Ломов Ю.М., Мишанькин Б.Н., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Боташев В.В. Специализированные противоэпидемические бригады как составная часть всероссийской службы медицины катастроф. *Эпидемиол. и инф. бол.* 1998; 6:11–6.
8. Найденова Е.В., Портенко С.А., Казакова Е.С., Карнаухова И.Г., Черкасов А.В., Щербакова С.А., Кутырев В.В. Опыт использования геномного анализа в условиях мобильного комплекса СПЭБ. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 2:113–4.
9. Онищенко Г.Г., Беляев Е.Н., Москвитина Э.А., Резайкин В.И., Ломов Ю.М., Мединский Г.М. Холера в Дагестане: прошлое и настоящее. Ростов н/Д; 1995. 120 с.
10. Онищенко Г.Г., Грижебовский Г.М., Ефременко В.И., Беляев Е.Н., Евченко Ю.М., Попов В.А., Савельев В.Н., Таран И.Ф., Афанасьев В.Н. Роль специализированных противоэпидемических бригад и эпидгрупп в противоэпидемическом обеспечении населения Чеченской республики. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1996; 3, Приложение: 27–31.
11. Онищенко Г.Г., Грижебовский Г.М., Ефременко В.И. Проблемы эпидемиологической безопасности в регионе Южного федерального округа России. М.; 2003. 448 с.
12. Онищенко Г.Г., Ефременко В.И., Брюханова Г.Д. Обеспечение санитарно-эпидемиологической безопасности населения при наводнении в Южном федеральном округе России.

М.; 2005. 250 с.

13. Онищенко Г.Г., Ефременко В.И., Грижебовский Г.М. Противозидемическое обеспечение населения в условиях вооруженного конфликта в Чеченской республике. Ставрополь, 1996. 256 с.

14. Онищенко Г.Г., Кузькин Б.П., Ракитин И.А., Башкетова Н.С., Коржаев Ю.Н., Гречанинова Т.А., Дятлов И.А., Кутырев В.В., Топорков А.В., Карнаухов И.Г., Топорков В.П., Щербакова С.А., Казакова Е.С., Шарова И.Н. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в период подготовки и проведения саммита «Группы двадцати» в Санкт-Петербурге в 2013 г. Сообщение 1. Эпидемиологические риски и основные направления мероприятий по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия в период подготовки к проведению саммита. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 4:5–10.

15. Онищенко Г.Г., Кузькин Б.П., Ракитин И.А., Башкетова Н.С., Коржаев Ю.Н., Гречанинова Т.А., Дятлов И.А., Кутырев В.В., Топорков А.В., Карнаухов И.Г., Топорков В.П., Щербакова С.А., Казакова Е.С., Шарова И.Н. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в период подготовки и проведения саммита «Группы двадцати» в Санкт-Петербурге в 2013 г. Сообщение 2. Организация и приоритетные направления работы в период проведения саммита. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 4:11–5.

16. Онищенко Г.Г., Куличенко А.Н., Грижебовский Г.М. Противозидемическое обеспечение населения Республики Южная Осетия в период ликвидации последствий вооруженного конфликта. Ставрополь; 2009. 196 с.

17. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. XXVII Всемирная летняя универсиада 2013 года в Казани. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия. Тверь; 2013. 528 с.

18. Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Кологоров А.И., Морозов В.В., Пигалова Н.В., Зиятдинов В.Б., Бугрова Е.П., Карнаухов И.Г., Казакова Е.С., Ломов Ю.М., Мишанькин Б.Н., Мазрухов Б.Л., Кудрякова Т.А., Водопьянов С.О., Рыжко И.В., Королев Ю.С. Высышка холеры в Казани в 2001 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2001; 2:15–25.

19. Онищенко Г.Г., Смоленский В.Ю., Ежлова Е.Б., Пакскина Н.Д., Кутырев В.В., Топорков А.В., Карнаухов И.Г., Топорков В.П., Казакова Е.С., Щербакова С.А. Специализированные противозидемические бригады Роспотребнадзора: прошлое, настоящее и будущее. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 2:5–12.

20. Пчелинцева М.В., Ляпин М.Н., Ежов И.Н., Топорков А.В. Использование методологии оценки и риска для обоснования комплекса мер по обеспечению биобезопасного функционирования мобильных лабораторий специализированных противозидемических бригад. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 2(108):22–6.

21. Система управления качеством в лабораториях. Пособие. ВОЗ; 2013. 272 с.

22. Шенеттс К.В., Онищенко Г.Г., Грижебовский Г.М., Ефременко В.И., Евченко Ю.М., Федоров Ю.М. Опыт работы эпидемиологических групп Ставропольского научно-исследовательского института в Республике Ингушетия. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2001; 6, Приложение: 119–22.

## References

1. Grizhebovsky G.M., Evchenko Yu.M., Mezentssev V.M., Taran V.I., Tikhenko N.I., Efremenko E.I., Eremenko V.I. [SAET experience in working under crisis conditions in Grozny city]. *Meditsina Katastrof.* 2000; 4(32):62–4.
2. Evchenko Yu.M., Popov V.A., Savel'ev V.N., Mezentssev V.M., Bryukhanov A.F., Babenyshv B.V., Sukhov V.V., Eremenko E.I., Afanas'ev E.N., Ovcharov V.I. [Bacteriological provision of anti-epidemic activities under emergencies]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1996; 3 (Appendix):49–53.
3. Evchenko Yu.M., Grizhebovsky G.M., Onishchenko G.G., Platunin A.V., Zaitsev A.A., Savchenko A.T., Lobanov A.N., Taran V.I., Merzoeva T.A., Akhmetkhanov R.M., Mutsaev V.Kh., Chiburaev V.I. [Concerning bacteriological control over utility and drinking water supplies in Grozny city in 1995]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1996; 3 (Appendix):57–9.
4. Kazakova E.S., Karnaukhov I.G., Sharova I.N., Kas'yan I.A., Osin N.A., Portenko S.A., Ivshentseva L.N., Kaplun G.A., Kouklev E.V., Krassovskaya T.Yu., Shcherbakova S.A., Toporkov A.V., Kutyrev V.V. [Organization and operation of the mobile laboratory facility of a specialized anti-epidemic team at the premises of anti-plague institute]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2010; 2:24–7.
5. Karbyshev G.L., Batashev V.V., Kruglikov V.D., Golubev B.P., Vodop'yanov S.O., Prometnoy V.I., Bessalov E.N., Mironov A.N., Vlasov V.P., Bunin I.K., Babanin S.N. [Experience in management of SAET activities under emergency situation in the territory of the Chechen Republic in 1995]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1996; 3 (Appendix):31–5.

6. Kutyrev V.V., Feodorov Yu.M., Toporkov A.V., Toporkov V.P., Karnaukhov I.G., Starshinov V.A. [Fortifying the Global Network for the prevention and liquidation of emergency situations aftermaths: upgrading of the specialized anti-epidemic teams (SAET) attached to plague-control institutions]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2006; 92(2):10–5.

7. Lomov Yu.M., Mishan'kin B.N., Moskvitina E.A., Kruglikov V.D., Botashev V.V. [Specialized anti-epidemic teams as an integral element of All-Russian Service for Disaster Medicine]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 1998; 6:11–6.

8. Naidenova E.V., Portenko S.A., Kazakova E.S., Karnaukhov I.G., Cherkasov A.V., Shcherbakova S.A., Kutyrev V.V. [Experience in genome analysis use in SAET mobile complex facilities]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 2:113–4.

9. Onishchenko G.G., Belyaev E.N., Moskvitina E.A., Rezaikin V.I., Lomov Yu.M., Medinsky G.M. [Cholera in the Republic of Dagestan: Past and Present]. Rostov-on-Don; 1995. 120 p.

10. Onishchenko G.G., Grizhebovsky G.M., Efremenko V.I., Belyaev E.N., Evchenko Yu.M., Popov V.A., Savel'ev V.N., Taran I.F., Afseev V.N. [Role of SAETs and epidemiological units in anti-epidemic provision of the population of the Chechen Republic]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1996; 3 (Appendix):27–31.

11. Onishchenko G.G., Grizhebovsky G.M., Efremenko V.I. [Issues of Epidemiological Security in the Southern Federal District of Russia]. M.; 2003. 448 p.

12. Onishchenko G.G., Efremenko V.I., Bryukhanova G.D. [Provision of Sanitary-Epidemiological Welfare of the Population Under Emergency Flooding in the Territory of the Southern Federal District of Russia]. M.; 2005. 250 p.

13. Onishchenko G.G., Efremenko V.I., Grizhebovsky G.M. [Anti-Epidemic Provision of the Population in the Course of Armed Conflict in the Chechen Republic]. Stavropol; 1996. 256 p.

14. Onishchenko G.G., Kuz'kin B.P., Rakitin I.A., Bashketova N.S., Korzhaev Yu.N., Grechaninova T.A., Dyatlov I.A., Kutyrev V.V., Toporkov A.V., Karnaukhov I.G., Toporkov V.P., Shcherbakova S.A., Kazakova E.S., Sharova I.N. [Sanitary-epidemiological welfare provision in the preparations to and management of the "G-20" Summit in Saint-Petersburg, 2013. Communication 1. Epidemiological risks and core operations for sanitary-epidemiological welfare provision in the preparations to the Summit]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 4:5–10.

15. Onishchenko G.G., Kuz'kin B.P., Rakitin I.A., Bashketova N.S., Korzhaev Yu.N., Grechaninova T.A., Dyatlov I.A., Kutyrev V.V., Toporkov A.V., Karnaukhov I.G., Toporkov V.P., Shcherbakova S.A., Kazakova E.S., Sharova I.N. [Sanitary-epidemiological welfare provision in the preparations to and management of the "G-20" Summit in Saint-Petersburg, 2013. Communication 2. Management and priority areas of anti-epidemic activities as regards "G-20" Summit campaign]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 4:11–5.

16. Onishchenko G.G., Kulichenko A.N., Grizhebovsky G.M. [Anti-Epidemic Provision of the Population of the Republic of South Ossetia in the Course of Liquidation of Aftermaths after the Armed Conflict]. Stavropol; 2009. 196 p.

17. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [XXVII World-Wide Summer Universiade in Kazan, 2013. Sanitary-Epidemiological Welfare Provision]. Tver; 2013. 528 p.

18. Onishchenko G.G., Moskvitina E.A., Kologorov A.I., Morozov V.V., Pignalova N.V., Ziatdinov V.B., Bugrova E.P., Karnaukhov I.G., Kazakova E.S., Lomov Yu.M., Mishan'kin B.N., Mazrukho B.L., Kudryakova T.A., Vodop'yanov S.O., Ryzhko I.V., Korolev Yu.S. [Cholera outbreak in Kazan in 2001]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2001; 2:15–25.

19. Onishchenko G.G., Smolensky V.Yu., Ezhlova E.B., Pakschina N.D., Kutyrev V.V., Toporkov A.V., Karnaukhov I.G., Toporkov V.P., Kazakova E.S., Shcherbakova S.A. [Specialized anti-epidemic teams: Past, Present, and Future]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 2:5–12.

20. Pchelintseva M.V., Lyapin M.N., Ezhov I.N., Toporkov A.V. [Application of risk assessment methodology for substantiation of measures complex on provision of safe functioning of mobile laboratories of specialized anti-epidemic teams]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 2(108):22–6.

21. [Laboratory Quality Management System. Guidelines]. WHO, 2013. 272 p.

22. Shenetts K.V., Onishchenko G.G., Grizhebovsky G.M., Efremenko V.I., Evchenko Yu.M., Fedorov Yu.M. [Operating experience of epidemiological units at the premises of Stavropol Research Institute in the territory of Republic of Ingushetia]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2001; 6 (Appendix):119–22.

## Authors:

Portenko S.A., Shcherbakova S.A., Kazakova E.S., Sharova I.N., Karnaukhov I.G., Toporkov A.V., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

## Об авторах:

Портенко С.А., Щербакова С.А., Казакова Е.С., Шарова И.Н., Карнаухов И.Г., Топорков А.В., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 07.07.14.

А.Н.Спицын, Д.В.Уткин, В.Е.Куклев, С.А.Портенко, В.Г.Германчук, Н.А.Осина

## ПРИМЕНЕНИЕ MALDI МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ В ДИАГНОСТИКЕ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

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

Масс-спектрометрия является современным физико-химическим методом анализа, позволяющим проводить качественный и количественный анализ состава вещества, основанный на предварительной ионизации входящих в его состав атомов или молекул. Одним из новых методов ионизации, благодаря которому масс-спектрометрическое исследование макромолекул получило широкое распространение, является разработанная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI), представляющая собой импульсное лазерное облучение исследуемого вещества, смешанного с матрицей. В обзоре представлены современные данные о применении метода MALDI масс-спектрометрии для проведения родо- и видоспецифической идентификации микроорганизмов в практике диагностических лабораторий. Рассмотрены преимущества MALDI-TOF идентификации по сравнению с бактериологическими, иммунологическими и молекулярно-генетическими методами исследования. Обозначено место масс-спектрометрии в системе лабораторной диагностики инфекционных болезней, в том числе особо опасных на территории Российской Федерации.

*Ключевые слова:* MALDI масс-спектрометрия, MALDI-TOF, идентификация, патогенные биологические агенты.

A.N.Spitsyn, D.V.Utkin, V.E.Kuklev, S.A.Portenko, V.G.Germanchuk, N.A.Osina

## Application of MALDI Mass-Spectrometry for Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases: Current State of Affairs and Prospects

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

Mass spectrometry is a modern physical-chemical analytical method that provides for qualitative and quantitative assessment of the substance composition. It is based on pre-ionization of the atoms and molecules included into it. One of the advanced methods of ionization, due to which mass-spectrometry investigation of macromolecules has become a frequent practice, is matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI). The essence of it is the pulsed laser irradiation of the matter under study, mixed with the matrix. The review discusses current data on MALDI mass-spectrometry application for the performance of species-specific and genus-specific identification of microorganisms at the premises of diagnostic laboratories. Considered are the basic advantages of MALDI-TOF identification as compared to bacteriologic, immunologic, and molecular-genetic methods of assessment. Allocated is the mass-spectrometry position in the system of laboratory diagnostics of infectious diseases, including particularly dangerous ones, in the territory of the Russian Federation.

*Key words:* MALDI mass-spectrometry, MALDI-TOF, identification, pathogenic biological agents.

В настоящее время основными методами лабораторной диагностики бактериальных инфекционных болезней являются бактериологический, иммунологический и молекулярно-генетический [6].

В основе бактериологического метода лежит выделение чистой культуры возбудителя и его дальнейшая идентификация по комплексу морфологических, культуральных, тинкториальных, биохимических и антигенных признаков. Для выделения чистой культуры возбудителя путем посева исследуемого материала на питательные среды требуется время от 18–24 ч до нескольких суток [7]. Чувствительность метода составляет  $10^2$  м.к./мл [9].

Иммунологические методы лабораторной диагностики основаны на регистрации специфического взаимодействия антигенов и антител. Среди методов иммунологического анализа в практических лабораториях применяют реакцию агглютинации (РА), реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА), а также методы с использованием меченых антител и антигенов – метод флуоресцирующих антител

(МФА), иммуноферментный анализ (ИФА), иммуноферментный анализ с магнитоиммосорбентами (ИФА+МИС), иммунохроматографический анализ (ИХА) [9]. Чувствительность данных методов составляет: РА –  $10^8$ – $10^9$  м.к./мл, РНГА –  $10^8$  м.к./мл, МФА, ИФА –  $10^5$ – $10^6$  м.к./мл, ИФА+МИС –  $10^3$ – $10^4$  м.к./мл, ИХА –  $2 \cdot 10^5$ – $2 \cdot 10^6$  м.к./мл, а специфичность напрямую зависит от качества используемых антител и может достигать 100 % [24, 33, 38]. Время анализа составляет от 20 мин (ИХА) до 2–4 ч (ИФА) [7].

Среди молекулярно-генетических методов широкое распространение получил метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), основанный на многократном избирательном копировании (амплификации) определенного участка ДНК. В настоящее время, наряду с ПЦР с учетом результатов методом электрофореза применяют технологию ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов, принципиальной особенностью которой является количественный анализ накопления продуктов ПЦР в каждом цикле реакции, а также автоматическая регистрация и интер-

претация полученных результатов. Для определения нуклеотидной последовательности фрагментов ДНК используется метод секвенирования путем получения серии комплементарных молекул ДНК, различающихся по длине на одно основание. Для молекулярно-генетических методов характерна 100 % специфичность и высокая чувствительность:  $1 \cdot 10^2 - 1 \cdot 10^3$  м.к./мл. Время анализа составляет 2–3 ч [7].

Несмотря на многообразие существующих методов, ни один из них не лишен недостатков. Бактериологический метод является длительным, интерпретация его результатов зависит от квалификации исследователя. Иммунологические методы имеют недостаточно высокую чувствительность. Для ПЦР характерна высокая стоимость анализа, многоэтапность проведения анализа, строгие требования к оснащению лаборатории и качеству тест-наборов, отсутствие возможности анализа белков, углеводов.

В настоящее время в лабораторной диагностике инфекционных болезней, наряду с традиционными методами индикации и идентификации, получили распространение физические и физико-химические методы анализа, базирующиеся на количественном измерении физических свойств веществ и характеризующиеся высокой автоматизацией, скоростью и простотой исследований. Для выявления и определения микроорганизмов в объектах окружающей среды используется ультрафиолетовая (УФ), видимая и инфракрасная (ИК) спектроскопия. Данные методы основаны на анализе спектра поглощения исследуемого материала. Спектр поглощения клеток микроорганизмов складывается из спектров поглощения входящих в их состав биологических молекул и кривой светорассеяния [1, 5, 11]. Так, большинство белков микроорганизмов и нуклеиновых кислот имеют максимум поглощения в УФ-диапазоне при длинах волн 289 нм и 260 нм, соответственно, что обусловлено в первом случае присутствием ароматических аминокислот (триптофана, фенилаланина, тирозина), алифатических боковых цепей аминокислот и пептидных связей — CO — NH —, а в случае нуклеиновых кислот пуриновыми и пиримидиновыми основаниями [4]. При ИК-излучении в диапазоне длин волн 2–50 мкм некоторые функциональные группы макромолекул (C–H, O–H, N–H, C=C, C=N, C=O и др.) имеют характерный набор полос поглощения, являющихся индивидуальной характеристикой соединения [8]. Чувствительность спектроскопических методов достигает  $10^3$  м.к./мл [10]. Кроме того, для идентификации микроорганизмов применяют метод Раман-спектроскопии, основанный на комбинационном рассеянии света или эффекте Рамана [14], отличающийся от остальных видов спектроскопии широким диапазоном длин волн – от УФ до ИК. При этом число и расположение линий в спектре рассеянного излучения определяется молекулярным строением вещества. Чувствительность метода составляет  $5 \cdot 10^4 - 5 \cdot 10^5$  м.к./мл [49].

Преимуществами методов ультрафиолетовой,

инфракрасной и Раман-спектроскопии являются: отсутствие процедуры пробоподготовки, что позволяет достичь высокой скорости проведения анализа (до 5 мин), отсутствие прямого физического контакта исследователя с исследуемым материалом (бесконтактный метод) [31], что особенно важно при исследовании образцов, содержащих или подозрительных на содержание патогенных биологических агентов. Недостатком индикации биологических частиц методом УФ-спектроскопии является возможность появления ложноположительных результатов из-за присутствия в воздухе аэрозолей, содержащих посторонние вещества и невозможность проведения идентификации микроорганизмов. Для ИК-спектроскопии невозможна дифференциация биологических и небологических частиц, при этом Раман-спектроскопия позволяет исследовать только чистую культуру и требует дорогостоящего оборудования. Раман-спектры микроорганизмов зависят от способа подготовки материала [50].

Одним из современных физико-химических методов анализа, позволяющий решить проблемы спектроскопических методов является метод масс-спектрометрии, дающий возможность проводить качественный и количественный анализ состава вещества. Принцип масс-спектрометрического анализа основан на предварительной ионизации атомов и молекул, входящих в состав пробы, дальнейшего разделения ионов исследуемого вещества в вакууме под действием электрических и магнитных полей и регистрации результатов в виде масс-спектра. Масс-спектр представляет собой зависимость интенсивности ионного тока молекулы от отношения ее массы к заряду и является характеристикой анализируемого вещества, отражающей особенности его строения.

Одним из новых методов ионизации, благодаря которому масс-спектрометрическое исследование макромолекул получило широкое распространение, является разработанная в конце 80-х годов XX в. матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI). В основе метода MALDI лежит импульсное лазерное облучение исследуемого вещества, смешанного с матрицей, представляющей собой химическое соединение, чаще всего органическую кислоту.

Времяпролетная MALDI масс-спектрометрия (MALDI-TOF MS) является новой технологией в клинической диагностике, позволяющей проводить идентификацию микроорганизмов, определять таксономическое положение неизвестных возбудителей. Данный метод включает прямой масс-спектрометрический анализ белковой фракции лизата микробной клетки («прямое белковое профилирование»), предметом которого служат преимущественно рибосомальные белки, являющиеся консервативными в пределах вида микроорганизма. Чувствительность метода MALDI-TOF MS составляет  $10^3 - 10^6$  м.к./мл [18]. При этом точность микробиологической идентификации зависит от количества

исследуемого материала. Специфичность видовой идентификации составляет до 97,6 % [13], время анализа занимает от 6 до 8,5 мин, стоимость анализа методом MALDI TOF составляет 17–32 % от стоимости идентификации традиционными бактериологическими методами [43]. Для повышения чувствительности метода MALDI был предложен иммуноаффинный вариант MALDI MS/MS (iMALDI) анализа [27] с применением специфических антител иммобилизованных на аффинных частицах. Чувствительность iMALDI анализа составила 10 м.к./мл и 10–100 аттомоль белковых молекул.

A.Cherkaoui *et al.* [17] использовали метод MALDI–TOF масс-спектрометрии для идентификации 416 клинических изолятов семейства *Enterobacteriaceae* (216 – *Escherichia coli*, 38 – *Klebsiella pneumoniae*, 35 – *Enterobacter cloacae*, 32 – *Proteus mirabilis*, 24 – *Serratia marcescens*, 19 – *Klebsiella oxytoca*, 12 – *Citobacter koseri*, 12 – *Morganella morganii* и др.). При этом специфичность родовой идентификации была близка к 100 %, а сами результаты MALDI-TOF идентификации были подтверждены традиционными биохимическими тестами, при этом проблема несопадающих результатов разрешалась секвенированием гена 16S рНК. Точность идентификации видов для родов *Enterobacteriaceae* составила 97,7 % при анализе 311 изолятов [45]. Результаты MALDI-TOF идентификации были подтверждены традиционными биохимическими тестами.

A.Mellmann *et al.* [35] провели MALDI-TOF MS идентификацию 78 штаммов неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов. Все штаммы параллельно были проанализированы секвенированием гена 16S рНК, использованного в качестве референсного метода. MALDI-TOF масс-спектрометрия идентифицировала 85,9 % изолятов, согласующихся с результатами секвенирования, при этом 82,5 % изолятов были правильно определены на видовом уровне и 95,2 % на уровне рода. S.Q. van Veen *et al.* [48] идентифицировали 88 изолятов неферментирующих бактерий до рода 94,3 % и 92 % до вида. Бактериологические методы с использованием автоматических анализаторов Vitek-2, API-тест-систем в указанных исследованиях позволили определить 93,2 % микроорганизмов до рода и 87,5 % до вида. A.Cherkaoui *et al.* [17] провели исследование 80 изолятов неферментирующих бактерий методом MALDI. В результате точность измерений составила 100 % при родовой и 97,5 % при видовой идентификации.

S.Q. van Veen *et al.* [48] провели MALDI-TOF MS исследование грамположительных кокков, предварительно идентифицированных традиционными методами (Vitek-2, API-тест-системы, биохимические тесты). Для подтверждения идентификации, в случае несоответствия результатов, проводилось дополнительно секвенирование гена 16S рНК. Анализ 261 клинического изолята стафилококков показал 100 % результат соответствия на родовом уровне и 94,3 % на видовом, а для 165 штаммов стрептококков точ-

ность родовой и видовой идентификации составила 98,8 и 84,8 % соответственно. Традиционные методы при этом показали 99,2 % родовой и 63,2 % видовой идентификации стафилококков, для стрептококков эти значения составили 100 и 87,9 % соответственно. Для 111 изолятов стафилококков специфичность MALDI-TOF родовой идентификации составила 100 и 98,2 % видовой, а для 87 изолятов стрептококков – 100 и 73,6 % соответственно [17]. L.G.Harris *et al.* [25] идентифицировали 158 изолятов стафилококков со 100 % точностью на уровне рода и вида.

A.Cherkaoui *et al.* [17] применили метод масс-спектрометрического анализа при идентификации анаэробных бактерий. При 100 % определении рода, процент видовой идентификации для анаэробов составил от 17 до 57 %.

Трудности лабораторной внутриродовой и внутривидовой дифференциации бактерий связаны с наличием общих биохимических свойств, морфологических, тинкториальных характеристик, присутствием родоспецифических и перекрестно реагирующих антигенов. Указанные проблемы присутствуют при лабораторной диагностике возбудителей особо опасных инфекций.

Правильная идентификация является необходимой для дифференциации непатогенных видов рода *Yersinia* от патогенных видов: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*. S.Ayyadurai *et al.* [12] составили базу данных референтных масс-спектров 39 различных штаммов *Yersinia*, представляющих 12 различных видов *Yersinia*, включая 13 штаммов *Y. pestis* биоваров Antiqua, Medievalis и Orientalis. Полученные масс-спектры природных и клинических изолятов *Y. pestis* (n=2) и *Y. enterocolitica* (n=11) были сопоставлены с референтными масс-спектрами базы данных масс-спектрометра и определены корректно. Таким образом, *Y. pestis* была однозначно идентифицирована на видовом уровне, а MALDI-TOF была успешно применена для дифференциации трех биотипов.

E.Seibold *et al.* [40] идентифицировали 45 штаммов *F. tularensis* четырех подвидов (*F. tularensis tularensis*, *F. tularensis holarctica*, *F. tularensis mediasiatica*, *F. tularensis novicida*) со 100 % специфичностью на уровне вида и подвидов. Результаты MALDI-TOF MS идентификации подтверждены с помощью секвенирования гена 23S рНК.

P.Lasch *et al.* [32] составили базу данных масс-спектров 374 штаммов рода *Bacillus*, среди которых 102 штамма *B. anthracis* и 121 штамм *B. cereus*. V.Ryzhov *et al.* [39] провели MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ 14 микроорганизмов группы *Bacillus cereus*. Полученные масс-спектры показали большое сходство между видами *B. anthracis*, *B. cereus* и *B. thuringiensis*, так как содержали общие для данных видов биомаркеры, которые отсутствовали у *B. mycoides*.

L.Ferreira *et al.* [20] провели MALDI-TOF MS исследование 131 клинического изолята рода *Brucella*, включая виды *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*, пред-

варительно идентифицированных традиционными методами и ПЦР. Точность родовой идентификации составила 100 %, а видовой – 20,6 %. F.Lista *et al.* [34] определили с точностью 99,3 % видовую принадлежность 152 изолятов рода *Brucella*, при этом *B. suis* биоваров 1 и 2 были идентифицированы до уровня биовара.

Л.Г.Гриднева и соавт. [2] использовали MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ для определения таксономической принадлежности холерных вибрионов на основании определения спектра константных белков дополнительно к биохимическим тестам. T.Hazen *et al.* [26] показали возможность применения метода MALDI-TOF MS для дифференциации вида *V. parahaemolyticus* от других видов рода *Vibrio* (*V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. harveyi*, *V. fischeri*, *V. campbellii*, *V. fluvialis*, *V. mediterranei*) и определения биомаркерных пиков, специфичных для *V. parahaemolyticus*.

Помимо исследования цельных клеточных лизатов, MALDI масс-спектрометрия используется для анализа отдельных биологических молекул (нуклеиновых кислот, белков, липидов, полисахаридов, жирных кислот), имеющих диагностическое и/или патогенетическое значение, и представляет альтернативу традиционным хроматографическим методам их определения. Так, F.Kirpekar *et al.* [29] провели MALDI секвенирование тех фрагментов ДНК, которые не могли быть секвенированы традиционными методами из-за наличия многочисленных неспецифичных конечных продуктов, природа которых может быть определена с помощью MALDI-TOF-MS. E.Nordhoff *et al.* [37] разработали протокол для быстрого секвенирования с использованием MALDI-TOF-MS коротких последовательностей ДНК, состоящих из 15–20 п.н., основанный на концепции Сэнгера. Продукты секвенирования разделялись и выявлялись методом MALDI-TOF-MS, а последовательность определялась путем сравнения измеренных молекулярных масс с ожидаемыми значениями. B.Schilling *et al.* [41] применили метод вакуумной MALDI масс-спектрометрии (vMALDI) для получения масс-спектров и определения структуры липида А трех видов рода *Francisella* (*F. tularensis*, *F. novicida* и *F. philomiragia*). A.Silipo *et al.* [45] провели MALDI анализ вторичной структуры жирных кислот, входящих в состав липида А для видов *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. reactans* и *B. caryophylli*. J.Giddey *et al.* [23] осуществили MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ липидов *E. coli* и *B. subtilis*. S.M.A.B.Batouy *et al.* [15] с помощью MALDI масс-спектрометрии с преобразованием Фурье получили липидные и фосфолипидные профили генетически модифицированных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Показана эффективность использования MALDI-MS для идентификации бактериальных токсинов, таких как ботулинический нейротоксин, столбнячный токсин, стафилококковый энтеротоксин [3]. Разработан масс-спектрометрический метод

на основе MALDI, который позволяет определять эндопептидазную активность ботулинических токсинов различных серотипов в клинических образцах [22, 28]. S.J.Shields *et al.* [44] методом MALDI-TOF-MS провели характеризацию С-фрагмента столбнячного токсина и его комплексов с дексорибуцином. Описаны подходы к идентификации энтеротоксина В методом MALDI-TOF в различных средах [16, 36, 42, 47]. Разработан высокочувствительный метод (500 фмоль) для определения энтеротоксина в сложных биологических образцах [30]. Метод MALDI-TOF MS использовался для обнаружения цитотоксина K1 (CytK1) и негемолитического энтеротоксина (NHE), продуцируемых патогенными штаммами группы *B. cereus* [46], а также дельта-токсина *S. aureus* [21] и шига-токсина *E. coli* O157 [19].

Основными преимуществами MALDI-масс-спектрометрии являются: анализ биологических молекул массой до 500 кДа без их разрушения, высокая чувствительность ( $10^{-12}$ – $10^{-21}$  моль вещества), толерантность к соледержащим материалам, возможность работы с многокомпонентными веществами, возможность получения информации о структуре молекул [3].

Внедрение масс-спектрометрического анализа в практику лабораторий федерального уровня позволит проводить быструю идентификацию более 2000 видов микроорганизмов, в том числе неустановленной этиологии и атипичных форм. При этом для идентификации микроорганизмов методом масс-спектрометрического анализа не требуется проведение биохимических тестов. Метод позволяет провести анализ образца в количестве нескольких наногرامмов в течение 1–2 мин.

Таким образом, метод масс-спектрометрического анализа является современным высокоточным инструментом идентификации и дифференциации микроорганизмов, позволяющим повысить эффективность лабораторной диагностики инфекционных болезней.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Владимиров Ю.А., Литвин Ф.Ф. Фотобиология и спектральные методы исследования. Практикум по общей биофизике. Вып. 8. М.: Высш. шк.; 1964. 211 с.
2. Гриднева Л.Г., Мусатов Ю.С., Громова Т.В., Пуховская Н.М., Белозерова Н.Б., Уткина О.М., Иванов Л.И., Ковальский А.Г., Миронова Л.В., Куликалова Е.С., Хунхеева Ж.Ю., Балахонов С.В. Результаты мониторинга и биологические свойства холерных вибрионов, изолированных из объектов окружающей среды на территории хабаровского края. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 1:121–4.
3. Дубровский Я.А., Подольская Е.П. Определение токсинов пептидной природы методом MALDI-MS (обзор). *Научное приборостроение*. 2010; 20(4):21–35.
4. Карнаухова Л.И., Тупицын Е.Н. УФ-спектроскопия биологических макромолекул. Уч.-метод. пособие. Саратов; 2002. 15 с.
5. Мерзляк М.Н., Чивкунова О.Б., Маслова И.П., Накви Р.К., Соловченко А.Е., Клячко-Гурвич Г.Л. Спектры поглощения и рассеяния света клеточными суспензиями некоторых цианобактерий и микроводорослей. *Физиология растений*. 2008; 55(3):464–70.
6. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.; 2009. 472 с.
7. Онищенко Г.Г., редактор. Руководство по специфической индикации патогенных биологических агентов. М.: ЗАО «МП Гигиена»; 2006. 288 с.

8. Справочник химика. Т. 4. Аналитическая химия. Спектральный анализ. Показатели преломления. Л: Химия; 1967.
9. Современные методы микробиологических исследований. Воронеж; 2007. 69 с.
10. Уткин Д.В., Куклев В.Е., Ерохин П.С., Осина Н.А. Применение методов спектроскопии для индикации и идентификации патогенных биологических агентов. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 2(108):68–71.
11. Шмидт В. Оптическая спектроскопия для химиков и биологов. М.: Техносфера; 2007. 368 с.
12. Аюадурай С., Flaudrops C., Raoult D., Drancourt M. Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *BMC Microbiol.* 2010; 10:285.
13. Bader O., Weig M., Taverne-Ghadwal L., Lugert R., Cross U., Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17:1359–65.
14. Baena J.R., Lendl B. Raman spectroscopy in chemical bioanalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004; 8:534–9.
15. Batoy S.M.A.B., Borgmann S., Flick K., Griffith J., Jones J.J., Saraswathi V., Hasty A.H., Kaiser P., Wilkins C.L. Lipid and Phospholipid Profiling of Biological Samples Using MALDI Fourier Transform Mass Spectrometry. *Lipids.* 2009; 44(4):367–71.
16. Bernardo K., Pakulat N., Fleer S., Schnaith A., Utermöhlen O., Krut O., Müller S., Krönke M. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(2):546–55.
17. Cherkaoui A., Hibbs J., Emonet S., Tangomo M., Girard M., Francois P., Schrenzel P. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1169–75.
18. Croxatto A., Prod'hom G., Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 2011; 36:380–407.
19. Fagerquist C.K., Sultan O. Top-Down Proteomic Identification of Furin-Cleaved  $\alpha$ -Subunit of Shiga Toxin 2 from *Escherichia coli* O157:H7 Using MALDI-TOF-TOF-MS/MS. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010; 2010:123460.
20. Ferreira L., Vega Castaño S.V., Sánchez-Juanes F., González-Cabrero S., Menegotto F., Orduña-Domingo A., González-Buitrago J.M., Muños-Bellido J.L. Identification of *Brucella* by MALDI-TOF Mass Spectrometry. Fast and Reliable Identification from Agar Plates and Blood Cultures. *PLoS One.* 2010; 5(12):14235.
21. Gagnaire J., Dauwalder O., Boisset S., Khau D., Freydière A.-M., Ader F., Bes M., Lina G., Tristan A., Reverdy M.-E., Marchand A., Geissmann T., Benito Y., Durand G., Charrier J.-P., Etienne J., Welker M., van Belkum A., Vandenesch F. Detection of *Staphylococcus aureus* Delta-Toxin Production by Whole-Cell MALDI-TOF Mass Spectrometry. *PLoS One.* 2012; 7(7):40660.
22. Gaunt P.S., Kalb S.R., Barr J.R. Detection of botulinum type E toxin in channel catfish with visceral toxicosis syndrome using catfish bioassay and endopep mass spectrometry. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2007; 19:349–54.
23. Gidden J., Denson J., Liyanage R., Ivey D.M., Lay J.O. Lipid Compositions in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* During Growth as Determined by MALDI-TOF and TOF/TOF Mass Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* 2009; 283(1–3):178–84.
24. Gomes-Solecki M.J.C., Savitt A.G., Rowehl R., Glass J.D., Bliska J.B., Dattwyler R.J. LcrV Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of *Yersinia pestis* from Human Samples. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005; 12:339–46.
25. Harris L.G., El-Bouri K., Johnston S., Rees E., Frommelt L., Siemssen N., Christner M., Davies A.P., Rohde H., Macj D. Rapid identification of staphylococci from prosthetic joint infections using MALDI-TOF mass-spectrometry. *Int. J. Artif. Organs.* 2010; 33(9):568–74.
26. Hazen H.T., Martinez J.R., Chen Y., Lafon P.C., Garrett N.M., Parsons M.B., Bopp C.A., Sullards M.C., Sobecky P.A. Rapid Identification of *Vibrio parahaemolyticus* by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *App. And Env. Microbiol.* 2009; 75(21):6745–56.
27. Jiang J., Parker C., Fuller J., Kawula T., Borchers C. An immunoaffinity tandem mass spectrometry (iMALDI) assay for detection of *Francisella tularensis*. *Anal. Chim. Acta.* 2007; 605(1):70–9.
28. Kalb S.R., Moyra H., Boyer A.E., McWilliams L.G., Pirkle J.L., Barr J.R. The use of Endopep-MS for the detection of botulinum neurotoxins A, B, E, and F in serum and stool samples. *Anal. Biochem.* 2006; 351(1):84–92.
29. Kirpekar F., Nordhoff E., Larsen L.K., Kristiansen K., Roepstorff P., Hillenkamp F. DNA sequence analysis by MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acids Research.* 1998; 26(11):2554–9.
30. Kull S., Pauly D., Sturmman B., Kirchner S., Stämmler M., Dorner M.B., Lasch P., Naumann D., Dorner B.G. Multiplex detection of microbial and plant toxins by immunoaffinity enrichment and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2010; 82(7):2916–24.
31. Lambert P.J., Whitman A.G., Dyson O.F., Akula S.M. Raman spectroscopy: the gateway into tomorrow's virology. *Virology.* 2006; 3:51.
32. Lasch P., Beyer W., Nattermann H., Stämmler M., Siegbrecht E., Grunow R., Naumann D. Identification of *Bacillus anthracis* by Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and Artificial Neural Networks. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(22):7229.
33. Lim D., Simpson J., Kearns E., Kramer M. Current and Developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(4):583–607.
34. Lista F., Reubsat F., De Santis R., Parchen R., de Jong A., Kieboom J., van der Laaken A., Voskamp-Visser I., Fillo S., Jansen H.-J., van der Plas J., Paauw A. Reliable identification at the species level of *Brucella* isolates with MALDI-TOF-MS. *BMC Microbiology.* 2011; 11:267.
35. Mellmann A., Cloud J., Maier T., Keckevoet U., Ramminger I., Iwen P., Dunn J., Hall G., Wilson D., LaSala P., Kostrzewa M., Harmsen D. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry in Comparison to 16S rRNA Gene Sequencing for Species Identification of Nonfermenting Bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(4):1946–54.
36. Nedelkov D., Nelson R.W. Detection of Staphylococcal Enterotoxin B via biomolecular interaction analysis mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69(9):5212–5.
37. Nordhoff E., Luebbert C., Thiele G., Haier V., Lehrach H. Rapid determination of short DNA sequences by the use of MALDI-MS. *Nucleic Acids Research.* 2000; 28(20):86.
38. Peruski A.H., Peruski L.F.Jr. Immunological Methods for Detection and Identification of Infectious Disease and Biological Warfare Agents. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10(4):506–13.
39. Ryzhov V., Hathout Y., Fenselau C. Rapid Characterization of Spores of *Bacillus cereus* Group Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Appl. And Env. Microbiol.* 2000; 66(9):3828–34.
40. Seibold E., Maier T., Kostrzewa M., Zeman E., Splettssoer W. Identification of *Francisella tularensis* by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: Fast, Reliable, Robust, and Cost-Effective Differentiation on Species and Subspecies Levels. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1061.
41. Schilling B., McLendon M., Phillips N., Apicella M., Gibson B. Characterization of Lipid A Acylation Patterns in *Francisella tularensis*, *F. novicida* and *F. philomiragia* using Multiple-Stage Mass Spectrometry ( $MS^n$ ) on a vMALDI Linear Ion Trap. *Anal. Chem.* 2007; 79(3):1034–42.
42. Schlosser G., Kačer P., Kuzma M., Szilágyi Z., Sorrentino A., Manzo C., Pizzano R., Malorni L., Pocsfalvi G. Coupling immunomagnetic separation on magnetic beads with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for detection of staphylococcal Enterotoxin B. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73(21):6945–52.
43. Seng P., Drancourt M., Gouriet F., La Scola B., Fournier P.E., Rolain J.M., Raoult G. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49:543–51.
44. Shields S.J., Oyeyemi O., Lighstone F.C., Balhorn R. Mass spectrometry and non-covalent protein-ligand complexes: confirmation of binding sites and changes in tertiary structure. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2003; 14(5):460–70.
45. Silipo A., Lanzetta R., Amoresano A., Parrilli M., Molinaro A. Ammonium hydroxide hydrolysis: a valuable support in the MALDI-TOF mass spectrometry analysis of Lipid A fatty acid distribution. *J. Lipid Res.* 2002; 43(12):2188–95.
46. Tsilia V., Devreese B., de Baenst I., Mesuere B., Rajkovich A., Uyttendaele M., van de Vlede T., Heyndrickx M. Application of MALDI-TOF mass spectrometry for the detection of enterotoxins produced by pathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012; 404(6–7):1691–702.
47. Usuki S., Pajaniappan M., Thompson S.A., Yu R.K. Chemical validation of molecular mimicry: interaction of cholera toxin with *Campylobacter* lipooligosaccharides. *Glycoconj. J.* 2007; 24(2–3):167–80.
48. van Veen S.Q., Claas E.C.J., Kuijper Ed J. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(3):900–7.
49. Zhang X., Yonzon C.R., van Duyne R.P. An electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy approach to anthrax detection. *Proc. SPIE.* 2003; 5221:82–91.
50. Zourob M., Elwary S., Turner A. Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems. Springer; 2008. 970 p.

## References

- Vladimirov Yu.A., Litvin F.F. [Photobiology and Spectral Methods of Investigation. Workshop on General Physics]. Issue 8. M.: 1964. 211 p.
- Gridneva L.G., Musatov Yu.S., Gromova T.V., Pukhovskaya N.M., Belozerova N.B., Utkina O.M., Ivanov L.I., Koval'sky A.G., Mironova L.V., Kulikalova E.S., Khunkheeva Zh.Yu., Balakhonov S.V. [Results of monitoring over and biological properties of *Vibrio cholerae* isolated from ambient environment objects in the Khabarovsk Territory]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 1:121–4.
- Dubrovsky Ya.A., Podol'skaya E.P. [Detection of peptide toxins using MALDI-MS (Review Article)]. *Nauchnoe Priborostroyeniye.* 2010; 20(4):21–35.
- Karnaikhova L.I., Tupitsyn E.N. [UV-spectroscopy of biological macromolecules. Study Guide]. Saratov; 2002. 15 p.
- Merzlyak M.N., Chivkunova O.B., Maslova I.P., Nakvi R.K., Solovchenko A.E., Klyachko-Gurvich G.L. [Light adsorption and light scattering spectra in cell suspensions of some cyanobacteria and microalgae]. *Fiziologiya Rastenii.* 2008; 55(3):464–70.
- Onishchenko G.G., Kutuyev V.V., editors [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. M.; 2009. 472 p.
- Onishchenko G.G., editor [Guidelines on Specific Indication of Pathogenic Biological Agents]. M.: ZAO "MP Gigiena"; 2006. 288 p.
- [Chemist's Desk Reference. Vol. 4. Analytical Chemistry. Spectral Analysis. Refraction Index]. L.: Khimiya; 1967.
- [Modern Methods of Microbiological investigations. Study Guide for Higher Education Institutions]. Voronezh; 2007. 69 p.
- Utkin D.V., Kouklev V.E., Erokhin P.S., Ossina N.A. [Application of spectroscopy methods for indication and identification of pathogenic biological agents]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 2(108):68–71.
- Shmidt V. [Optic Spectroscopy for Chemists and Biologists]. M.: Tekhnosfera; 2007. 368 p.
- Ayyadurai S., Flaudrops C., Raoult D., Drancourt M. Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *BMC Microbiol.* 2010; 10:285.
- Bader O., Weig M., Taverne-Ghadwal L., Lugert R., Cross U., Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011; 17:1359–65.
- Baena J.R., Lendl B. Raman spectroscopy in chemical bioanalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004; 8:534–9.
- Batoy S.M.A.B., Borgmann S., Flick K., Griffith J., Jones J.J., Saraswathi V., Hasty A.H., Kaiser P., Wilkins C.L. Lipid and Phospholipid Profiling of Biological Samples Using MALDI Fourier Transform Mass Spectrometry. *Lipids.* 2009; 44(4):367–71.
- Bernardo K., Pakulat N., Fleer S., Schnaith A., Utermohlen O., Krut O., Müller S., Krönke M. Subinhibitory concentrations of linezolid reduce *Staphylococcus aureus* virulence factor expression. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(2):546–55.
- Cherkaoui A., Hibbs J., Emonet S., Tangomo M., Girard M., Francois P., Schrenzel J. Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Methods with Conventional Phenotypic Identification for Routine Identification of Bacteria to the Species Level. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1169–75.
- Croxatto A., Prod'hom G., Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* 2011; 36:380–407.
- Fagerquist C.K., Sultan O. Top-Down Proteomic Identification of Furin-Cleaved  $\alpha$ -Subunit of Shiga Toxin 2 from *Escherichia coli* O157:H7 Using MALDI-TOF-TOF-MS/MS. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010; 2010:123460.
- Ferreira L., Vega Castaño S.V., Sánchez-Juanes F., González-Cabrero S., Menegotto F., Orduña-Domingo A., González-Buitrago J.M., Muñoz-Bellido J.L. Identification of *Brucella* by MALDI-TOF Mass Spectrometry. Fast and Reliable Identification from Agar Plates and Blood Cultures. *PLoS One.* 2010; 5(12):14235.
- Gagnaire J., Dauwalder O., Boisset S., Khau D., Freydière A.-M., Ader F., Bes M., Lina G., Tristan A., Reverdy M.-E., Marchand A., Geissmann T., Benito Y., Durand G., Charrier J.-P., Etienne J., Welker M., van Belkum A., Vandenesch F. Detection of *Staphylococcus aureus* Delta-Toxin Production by Whole-Cell MALDI-TOF Mass Spectrometry. *PLoS One.* 2012; 7(7):40660.
- Gaunt P.S., Kalb S.R., Barr J.R. Detection of botulinum type E toxin in channel catfish with visceral toxicosis syndrome using catfish bioassay and endopep mass spectrometry. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2007; 19:349–54.
- Gidden J., Denson J., Liyanage R., Ivey D.M., Lay J.O. Lipid Compositions in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* During Growth as Determined by MALDI-TOF and TOF/TOF Mass Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* 2009; 283(1–3):178–84.
- Gomes-Solecki M.J.C., Savitt A.G., Rowehl R., Glass J.D., Bliska J.B., Dattwyler R.J. LcrV Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of *Yersinia pestis* from Human Samples. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2005; 12:339–46.
- Harris L.G., El-Bouri K., Johnston S., Rees E., Frommelt L., Siemssen N., Christner M., Davies A.P., Rohde H., Macj D. Rapid identification of staphylococci from prosthetic joint infections using MALDI-TOF mass-spectrometry. *Int. J. Artif. Organs.* 2010; 33(9):568–74.
- Hazen H.T., Martinez J.R., Chen Y., Lafon P.C., Garrett N.M., Parsons M.B., Bopp C.A., Sullards M.C., Sobecky P.A. Rapid Identification of *Vibrio parahaemolyticus* by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *App. And Env. Microbiol.* 2009; 75(21):6745–56.
- Jiang J., Parker C., Fuller J., Kawula T., Borchers C. An immunoaffinity tandem mass spectrometry (iMALDI) assay for detection of *Francisella tularensis*. *Anal. Chim. Acta.* 2007; 605(1):70–9.
- Kalb S.R., Moyra H., Boyer A.E., McWilliams L.G., Pirkle J.L., Barr J.R. The use of Endopep-MS for the detection of botulinum neurotoxins A, B, E, and F in serum and stool samples. *Anal. Biochem.* 2006; 351(1):84–92.
- Kirpekar F., Nordhoff E., Larsen L.K., Kristiansen K., Roepstorff P., Hillenkamp F. DNA sequence analysis by MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acids Research.* 1998; 26(11):2554–9.
- Kull S., Pauly D., Sturmman B., Kirchner S., Stämmler M., Dorner M.B., Lasch P., Naumann D., Dorner B.G. Multiplex detection of microbial and plant toxins by immunoaffinity enrichment and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2010; 82(7):2916–24.
- Lambert P.J., Whitman A.G., Dyson O.F., Akula S.M. Raman spectroscopy: the gateway into tomorrow's virology. *Virology.* 2006; 3:51.
- Lasch P., Beyer W., Nattermann H., Stämmler M., Siegbrecht E., Grunow R., Naumann D. Identification of *Bacillus anthracis* by Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Light Mass Spectrometry and Artificial Neural Networks. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(22):7229.
- Lim D., Simpson J., Kearns E., Kramer M. Current and Developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(4):583–607.
- Lista F., Reubsat F., De Santis R., Parchen R., de Jong A., Kieboom J., van der Laaken A., Voskamp-Visser I., Fillo S., Jansen H.-J., van der Plas J., Paauw A. Reliable identification at the species level of *Brucella* isolates with MALDI-TOF-MS. *BMC Microbiology.* 2011; 11:267.
- Mellmann A., Cloud J., Maier T., Keckevoet U., Ramminger I., Iwen P., Dunn J., Hall G., Wilson D., LaSala P., Kostrzewa M., Harmsen D. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry in Comparison to 16S rRNA Gene Sequencing for Species Identification of Nonfermenting Bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(6):1946–54.
- Nedelkov D., Nelson R.W. Detection of Staphylococcal Enterotoxin B via biomolecular interaction analysis mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69(9):5212–5.
- Nordhoff E., Luebbert C., Thiele G., Haiser V., Lehrach H. Rapid determination of short DNA sequences by the use of MALDI-MS. *Nucleic Acids Research.* 2000; 28(20):86.
- Peruski A.H., Peruski L.F.Jr. Immunological Methods for Detection and Identification of Infectious Disease and Biological Warfare Agents. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10(4):506–13.
- Ryzhov V., Hathout Y., Fenselau C. Rapid Characterization of Spores of *Bacillus cereus* Group Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Appl. And Env. Microbiol.* 2000; 66(9):3828–34.
- Seibold E., Maier T., Kostrzewa M., Zeman E., Splettstoesser W. Identification of *Francisella tularensis* by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Light Mass Spectrometry: Fast, Reliable, Robust, and Cost-Effective Differentiation on Species and Subspecies Levels. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1061.
- Schilling B., McLendon M., Phillips N., Apicella M., Gibson B. Characterization of Lipid A Acylation Patterns in *Francisella tularensis*, *Fnoviciida* and *F.philomiragia* using Multiple-Stage Mass Spectrometry (MS) on a vMALDI Linear Ion Trap. *Anal. Chem.* 2007; 79(3):1034–42.
- Schlosser G., Kačer P., Kuzma M., Szilágyi Z., Sorrentino A., Manzo C., Pizzano R., Malorni L., Pocsfalvi G. Coupling immunomagnetic separation on magnetic beads with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for detection of staphylococcal Enterotoxin B. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007; 73(21):6945–52.
- Seng P., Drancourt M., Gouriet F., La Scola B., Fournier P.E., Rolain J.M., Raoult G. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 49:543–51.
- Shields S.J., Oyeyemi O., Lighthouse F.C., Balhorn R. Mass spectrometry and non-covalent protein-ligand complexes: confirmation of binding sites and changes in tertiary structure. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2003; 14(5):460–70.
- Silipo A., Lanzetta R., Amoresano A., Parrilli M., Molinaro A. Ammonium hydroxide hydrolysis: a valuable support in the MALDI-TOF mass spectrometry analysis of Lipid A fatty acid distribution. *J. Lipid Res.* 2002; 43(12):2188–95.
- Tsilia V., Devreese B., de Baenst I., Mesuere B., Rajkovich A., Uyttendaele M., van de Vlede T., Heyndrickx M. Application of MALDI-TOF mass spectrometry for the detection of enterotoxins produced by pathogenic strains of the *Bacillus cereus* group. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012; 404(6–7):1691–702.
- Usuki S., Pajaniappan M., Thompson S.A., Yu R.K. Chemical validation of molecular mimicry: interaction of cholera toxin with Campylobacter lipooligosaccharides. *Glycoconj. J.* 2007; 24(2–3):167–80.
- van Veen S.Q., Claas E.C.J., Kuijper Ed J. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(3):900–7.
- Zhang X., Yonzon C.R., van Duyn R.P. An electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy approach to anthrax detection. *Proc. SPIE.* 2003; 5221:82–91.
- Zourob M., Elwary S., Turner A. Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems. Springer; 2008. 970 p.

## Authors:

Spitsyn A.N., Utkin D.V., Kouklev V.E., Portenko S.A., Germanchuk V.G., Osina N.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

## Об авторах:

Шпцын А.Н., Уткин Д.В., Куклев В.Е., Портенко С.А., Германчук В.Г., Осина Н.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 15.04.14.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦИТОКИНОВ И СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ИММУНОГЕННОСТИ МЕЛИОИДОЗНЫХ АНТИГЕНОВ**

*ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград, Российская Федерация*

Изучали возможность повышения иммунного ответа на липосомальные мелиоидозные антигены за счет включения в схему иммунизации рекомбинантных цитокинов и синтетических иммуномодуляторов (ИМ) – аналогов гормонов тимуса – бестима и имунофана. Белых мышей иммунизировали двукратно с интервалом 10 дней, вводя, помимо специфических антигенов, препараты цитокинов (ИФН- $\gamma$  – при первичной, ИЛ-2 – при вторичной иммунизации) и ИМ – бестим или имунофан. Показано, что включение в схему иммунизации имунофана, при условии его трехкратного введения при первичной и вторичной иммунизации, способствовало достоверно более высоким показателям ГЗТ по сравнению с однократным введением ИМ, а также приводило к выживанию 50 % животных от 10 ЛД<sub>50</sub> высоковирулентного штамма возбудителя мелиоидоза. Замена имунофана бестимом, кроме повышения уровня ГЗТ, существенно увеличивала фагоцитарную активность макрофагов мышей и степень устойчивости животных к контрольному заражению 10 ЛД<sub>50</sub> *B. pseudomallei* 100 (61,5 % выживших). Сделан вывод о целесообразности включения бестима в комплексную схему иммунизации против мелиоидоза.

*Ключевые слова:* липосомальные мелиоидозные антигены, иммунитет, цитокины, бестим, имунофан.

**O.B.Dem'yanova, S.I.Zhukova, A.A.Zankovich, N.P.Khrapova, K.A.Rotov, N.N.Sintyurina, E.A.Snatenkov**

**Application of Cytokines and Synthetic Peptides for Increase in Immunogenicity of Melioidosis Antigens**

*Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation*

Investigated was the possibility of enhancement of immune response to liposomal melioidosis antigens by means of introduction to immunization schedule injections of recombinant cytokines and synthetic immuno-modulators (IM) – thymus hormone analogues – bestim and imonufan. White mice underwent two-fold immunization in an interval of 10 days, with administration of cytokine preparations (IFN- $\gamma$  – pre-immunization, IL-2 – booster immunization) and IM – bestim and immunofan, except from specific antigens. It was demonstrated that deployment of immunofan in the immunization schedule, in case of its three-fold administration during pre-immunization phase and secondary immunization, benefited to reasonably higher indexes of delayed-type hypersensitivity (DTH) as compared to single dosing of IM. It also lead to survival of 50 % of animals challenged with LD<sub>50</sub> of high-virulent melioidosis agent strain. Apart from high delayed-type hypersensitivity, substitution of immunofan for bestim significantly increased phagocytic activity in mice macrophages and control 10 LD<sub>50</sub> *B. pseudomallei* 100 resistance (61.5 % of survived animals). It was concluded that it is a good practice to include bestim in the schedule of complex immunization against melioidosis.

*Key words:* liposomal melioidosis antigens, immunity, cytokines, bestim, immunofan.

Мелиоидоз является единственной особо опасной инфекцией, против которой еще не создано вакцины, хотя экспериментальные работы в этом направлении продолжают уже более полувека как в нашей стране, так и за рубежом. Отсутствие эффективного профилактического препарата против заболевания, вызываемого *Burkholderia pseudomallei*, связано со слабой иммуногенностью выделенных разными методами мелиоидозных антигенов, хотя определяющая роль поверхностных антигенных структур возбудителя в резистентности к мелиоидозу в настоящее время не вызывает сомнений. Поскольку изученные антигены *B. pseudomallei* вызывают невысокий иммунный ответ, весьма актуальной современной задачей является поиск иммуномодуляторов (ИМ) различной природы, способных повысить иммуногенные свойства мелиоидозных антигенов. Ранее нами было показано, что инкапсулирование по-

верхностных мелиоидозных антигенов в липосомы, а также применение для иммунизации вместе с рекомбинантными цитокинами ИФН- $\gamma$  и ИЛ-2 способствует повышению их иммуногенных и протективных свойств [6]. В рамках продолжения исследований по поиску новых иммуностимулирующих препаратов целью данной работы было изучение возможности использования синтетических пептидов в схеме иммунопрофилактики экспериментального мелиоидоза. В качестве ИМ были использованы бестим и имунофан. Оба препарата являются синтетическими аналогами активных участков гормона тимуса, достаточно хорошо изучены и показали свою клиническую эффективность при целом ряде инфекционных и соматических заболеваний [4, 5, 6, 9, 10]. Общей отличительной особенностью препаратов является их способность стимулировать преимущественно клеточный иммунитет и фагоцитарные реакции, что

особенно важно при защите от мелиоидозной инфекции. Для профилактики мелиоидоза оба препарата ранее не применялись.

### Материалы и методы

Эксперименты проводились на беспородных белых мышах. Для иммунизации животных использовали поверхностный антигенный комплекс из антигена б и антигена d (АГб+d) в дозе 40 мкг по белку, который вводили подкожно двукратно с интервалом 10 сут в липосомальной форме (далее – АГл) [1]. Антигены инкапсулировали в липосомы, которые формировались при смешивании хроматографически чистых фосфатидилхолина и холестерина в соотношении 7:3 [3]. Одновременно с иммунизацией и в последующие 2 сут после нее мышам вводили подкожно цитокиновые препараты: при первичной иммунизации – ИФН-γ (20 МЕ), при вторичной – ИЛ-2 (1 мкг). Бестим или имунофан вводили подкожно при первичной и вторичной иммунизации. Кратность введения ИМ варьировала от одного до трех раз при каждой иммунизации, при этом доза бестима при однократном введении составляла 0,2 мкг, при двукратном и трехкратном введении разовая доза уменьшалась в 2 и 3 раза (0,1 мкг и 0,07 мкг соответственно). Имунофан вводили в разовой дозе 0,02 мкг/мышь, суммарная доза за 2 дня применения имунофана составляла 0,04 мкг, за 3 – 0,06 мкг. Иммунологические показатели клеточного иммунитета – ГЗТ в тесте отека лапок [9] и фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов (ПМ) хемилюминесцентным методом [8] определяли на 18-е сутки после первичной иммунизации, за 3 сут до контрольного заражения. Протективные свойства мелиоидозных антигенов оценивали по показателям летальности (процент выживших и средняя продолжительность жизни (СПЖ)) спустя 30 сут после контрольного заражения животных высоковирулентным штаммом *B. pseudomallei* 100. Полученные данные обрабатывали статистически по Фишеру-Стьюденту [7] и по непараметрическому критерию Вилкоксона [2].

### Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования было

Таблица 1

**Влияние кратности применения иммуномодулирующих пептидов на клеточный иммунитет мышей, иммунизированных липосомальными мелиоидозными антигенами**

Препараты для иммунизации	Уровень ГЗТ на 18-е сутки (ИР, %)		
	Кратность введения ИМ		
	1	2	3
АГл+ ИФН-γ+ ИЛ-2+бестим	22,76±1,85	19,58±1,65	33,37±2,01*
АГл+ ИФН-γ+ ИЛ-2+имунофан	18,6±1,56	21,52±1,93	26,14±2,03**
Контроль (интактные)	4,18±0,85	-	-

\* Различия достоверны по отношению 1–2-кратному введению.  
 \*\* Различия достоверны по отношению к 1-кратному введению.

показано, что более высокие иммунологические показатели, характеризующие клеточный иммунитет, зарегистрированы при использовании бестима, причем трехкратная стимуляция мышей бестимом обеспечивала явные преимущества по сравнению с одно- или двукратной (p<0,05). Схема с имунофаном также способствовала формированию у мышей достоверно более высокого уровня ГЗТ, чем у интактных животных, и трехкратное введение препарата было существенно более эффективным, чем однократное (p<0,05), хотя и значимо не отличалось от двукратного введения ИМ (p>0,05) (табл. 1).

Определение уровня хемилюминесцентного ответа ПМ мышей на зимозан на 18-е сутки наблюдения подтвердило большую эффективность трехкратного применения бестима в обеспечении более эффективной стимуляции иммуногенных свойств мелиоидозных антигенов, при этом фагоцитарная активность ПМ достоверно превосходила таковую при одно- и двукратном введении ИМ (рисунок).

Использование схемы с имунофаном также обеспечивало на 18-е сутки существенно более высокие показатели хемилюминесценции ПМ, чем у контрольных интактных мышей (p<0,05), однако кратность введения имунофана значимо не изменяла фагоцитарные показатели ПМ иммунизированных мышей.

Таким образом, бестим и имунофан оказались способными повышать иммуногенные свойства мелиоидозных липосомальных препаратов. Кратность применения бестима существенно отражалась как на уровне ГЗТ, так и на степени фагоцитарной активности ПМ, трехкратное введение было наиболее эффективным. Имунофан по сравнению с бестимом проявил менее выраженное иммуностимулирующее действие, хотя его трехкратное введение и обеспечивало существенно более высокий уровень ГЗТ, чем однократное, но не имело решающего значения для стимуляции фагоцитарной функции Мф мышей.

Изучение протективности мелиоидозных антигенов показало, что при дополнении схемы стимуляции иммуногенеза цитокинами 1–3-кратным введением бестима и при 1–2-кратной стимуляции имунофаном выживаемость животных от 10 ЛД<sub>50</sub> *B. pseudomallei* 100 достоверно превышает таковую у интактных животных и составляет 43–61,5 % при использовании бестима и 41,7–50 % при введении имунофана (табл. 2).

Самый низкий показатель летальности от



Влияние кратности применения бестима в процессе иммунизации липосомальными антигенами на фагоцитарную активность ПМ мышей

Влияние кратности применения ИМ на протективность липосомальных мелиоидозных антигенов

Препараты для иммунизации	Летальность при заражении 10 ЛД <sub>50</sub> <i>B. pseudomallei</i> 100								
	Кратность введения ИМ								
	1			2			3		
	пало/взято	% павших	СПЖ	пало/взято	% павших	СПЖ	пало/взято	% павших	СПЖ
АГл+ ИФН-γ+ИЛ-2+ бестим	8/15	53,3*	10,8*	8/14	57,0*	10,4*	5/13	38,5*	11,2*
АГл+ ИФН-γ+ИЛ-2+ имунофан	7/14	50,0*	10,0*	7/14	50,0*	10,2*	7/12	58,3	10,8*
Контроль (интактные)	10/10	100	6,2	-	-	-	-	-	-

\* Различия достоверны с группой интактных животных ( $p < 0,05$ ).

10 ЛД<sub>50</sub> *B. pseudomallei* 100 (38,5 %) отмечен в группе животных с трехкратной стимуляцией бестимом. Оба синтетических полипептида (бестим и имунофан) обладали способностью повышать защитные свойства мелиоидозных липосомальных антигенов при их совместном применении с цитокинами, стимулирующими механизмы клеточного иммунитета (ИФН-γ и ИЛ-2). При сравнении более эффективным препаратом оказался бестим.

Таким образом, нами показана целесообразность включения в схему стимуляции иммунного ответа при мелиоидозе синтетических пептидов – аналогов активных центров тимических гормонов. Многими авторами отмечено, что защита против мелиоидоза базируется, в основном, на клеточных иммунных реакциях [12, 13], поэтому вполне объяснима показанная нами способность цитокиновых препаратов ИФН-γ и ИЛ-2, ориентирующих иммунный ответ преимущественно по Th1-типу, а также бестима и имунофана, дополнительно действующих в том же направлении, существенно стимулировать иммунные реакции макроорганизма на мелиоидозные антигены и повышать протективность антигенов. Полученные нами данные могут быть использованы для разработки эффективных схем профилактики мелиоидозной инфекции.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авророва И.В., Жукова С.И., Корсакова И.И., Храпова Н.П., Напалкова Г.Н. Поверхностные биополимеры *Burkholderia pseudomallei* и их протективная активность при экспериментальном мелиоидозе. *Инф. патол.* 2010; 17(3):85–7.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1998. 459 с.
3. Жукова С.И., Авророва И.В., Прошина О.Б., Ротов К.А., Храпова Н.П., Снатенков Е.А., Ломова Л.В. Способ иммунопрофилактики экспериментального мелиоидоза инкапсулированными антигенами *Burkholderia pseudomallei*. Патент РФ 2373955, опублик. 27.11.2009 г. Бюл. № 33.
4. Караулов А.В. Клинико-иммунологическая эффективность применения имунофана при оппортунистических инфекциях. *Лечащий врач.* 2000; 4:52–5.
5. Караулов А.В., Сокурченко С.И. Имунофан: непосредственные и отдаленные результаты лечения больных хроническим бронхитом. *Медикал Маркет.* 2000; 34:21–4.
6. Кукаркин Н.Ю., Долгушин И.И., Бордуновский В.Н. Бестим в лечении больных хроническим пиелонефритом. В кн.: Иммунитет и болезни: от теории к практике. М.; 2005. С. 90–1.
7. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. Киев: Морион; 2001. 408 с.
8. Любимов Г.Ю., Зенков Н.Г., Вольский Н.Н. Хемилюминесценция перитонеальных макрофагов при действии макрофаг-активирующего фактора. *Иммунология.* 1992; 1:40–3.
9. Попова А.Е. Методические рекомендации по опреде-

лению отекогенного эффекта на белых мышцах. Волгоград: Нижневолжское книжное изд-во; 1980. 18 с.

10. Сенцова Т.Б. Современные иммуномодуляторы. *Оториноларингология.* 2004; 3(5):16–8.

11. Симбирцев А.С., Сахарова И.Я., Васильева Г.Ю., Баласанянц Г.С., Бокованов В.Е. Опыт применения бестима в комплексном лечении инфильтративных и деструктивных форм туберкулеза легких. *Российский семейный врач.* 2003; 3:17–9.

12. Barnes J.L., Warner J., Melrose W. Adaptive immunity in melioidosis: a possible role for T cells in determining outcome of infection with *Burkholderia pseudomallei*. *Clin. Immunol.* 2004; 113(1):22–8.

13. Ketheesan N., Barnes J.L., Ulett G.C. Demonstration of a cell-mediated immune response in melioidosis. *J. Infect. Dis.* 2002; 186(2):286–9.

#### References

1. Avrorova I.V., Zhukova S.I., Korsakova I.I., Khrapova N.P., Napalkova G.N. [*Burkholderia pseudomallei* surface biopolymers and their protective activity in experimental melioidosis]. *Infek. Patol.* 2010; 17(3):85–7.
2. Glants S. [Medical-Biological Statistics]. M.: Praktika; 1998. 459 p.
3. Zhukova S.I., Avrorova I.V., Proshina O.B., Rotov K.A., Khrapova N.P., Snatenkov E.A., Lomova L.V. [Method of immunoprophylaxis of experimental melioidosis using *Burkholderia pseudomallei* entrapped antigens]. RF Patent 2373955. 27.11.2009. Bull. 33.
4. Karaulov A.V. [Clinical-immunological efficacy of immunofan application in case of opportunistic infections]. *Lechashchii Vrach.* 2000; 4:52–5.
5. Karaulov A.V., Sokurenko S.I. [Immunofan: short term and remote results of curative treatment among the patients with chronic bronchitis]. *Medical Market.* 2000; 34:21–4.
6. Kukarkin N.Yu., Dolgushin I.I., Bordunovskiy V.N. [Bestim in the treatment of patients with chronic pyelonephritis]. In: [Immunity and Diseases: Translation of Theory into Practice]. M.; 2005. P. 90–1.
7. Lapach S.N., Chubenko A.V., Babich P.N. [Statistical Methods in Medical Biological Investigations using Excel Software]. Kiev: Morion; 2001. 408 p.
8. Lyubimov G.Yu., Zhenkov N.G., Vol'skiy N.N. [Chemoluminescence of peritoneal macrophages if exposed to macrophage-activation factor]. *Immunologiya.* 1992; 1:40–3.
9. Popova A.E. [Methodological recommendations for identification of edemagenic effect on white mice]. Volgograd; 1980. 18 p.
10. Sentsova T.B. [Modern immune-modulators]. *Otorinolaringologiya.* 2004; 3(5):16–8.
11. Simbirteev A.S., Sakharova I.Ya., Vasil'eva G.Yu., Balasanyants G.S., Bokovanov V.E. [Experience in usage of bestim in the complex treatment of infiltrative and destructive forms of pulmonary tuberculosis]. *Ros. Semeimyi Vrach.* 2003; 3:17–9.
12. Barnes J.L., Warner J., Melrose W. Adaptive immunity in melioidosis: a possible role for T cells in determining outcome of infection with *Burkholderia pseudomallei*. *Clin. Immunol.* 2004; 113(1):22–8.
13. Ketheesan N., Barnes J.L., Ulett G.C. Demonstration of a cell-mediated immune response in melioidosis. *J. Infect. Dis.* 2002; 186(2):286–9.

#### Authors:

Dem'yanova O.B., Zhukova S.I., Zankovich A.A., Khrapova N.P., Rotov K.A., Sintyurina N.N., Snatenkov E.A. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

#### Об авторах:

Демьянова О.Б., Жукова С.И., Занкович А.А., Храпова Н.П., Ротов К.А., Синтюрина Н.Н., Снатенков Е.А. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 08.04.14.

А.А.Петров, В.Н.Лебедев, Т.М.Плеханова, Л.Ф.Стовба, О.Н.Сидорова, Е.В.Мельникова,  
С.В.Борисевич

## ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ И ПРИМЕНЕНИЯ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ РНК-РЕПЛИКОНА ВИРУСА ВЕНЕСУЭЛЬСКОГО ЭНЦЕФАЛОМИЕЛИТА ЛОШАДЕЙ ПРОТИВ ОСОБО ОПАСНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны, Сергиев Посад,  
Российская Федерация

Представители семейства *Filoviridae* (вирусы Марбург, Эбола) и *Arenaviridae* (вирусы Ласса, Луйо, Мачупо, Хунин, Гуанарито, Сэбиа) являются этиологическими агентами особо опасных вирусных геморрагических лихорадок. Данные возбудители представляют потенциальную угрозу для здравоохранения вследствие возможности их случайного завоза в неэндемичные регионы, поэтому актуальным является вопрос о создании специфических медицинских средств защиты в отношении вызываемых ими заболеваний. По мнению ведущих специалистов, вакцинация групп риска является наиболее эффективным и экономичным способом защиты от развития эпидемии. В обзоре рассмотрено новое перспективное направление разработки защитных препаратов в отношении особо опасных вирусных инфекций – создание вакцин на основе репликонов альфавирусов. Разработка рекомбинантных репликонов не требует культивирования патогенных микроорганизмов. Особенностью РНК-репликонов является их неспособность продуцировать инфекционное потомство, что имеет особое значение при создании вакцин в отношении особо опасных вирусных геморрагических лихорадок. Преимущества альфавирусных репликонов перед другими РНК-репликонами при разработке вакцин заключаются в высоком уровне экспрессии гетерологичных генов и резистентности к анти-векторному иммунитету. РНК-репликоны альфавирусов сочетают безопасность инактивированных и иммуногенность живых аттенуированных вакцин. Репликоны на основе альфавирусов пригодны для экспрессивной разработки вакцин с целью специфической профилактики вирусных инфекционных заболеваний.

*Ключевые слова:* вирус венесуэльского энцефаломиелита лошадей, РНК-репликон, альфавирусы, филовирусы, аренавирусы, вакцина, вектор.

A.A.Petrov, V.N.Lebedev, T.M.Plekhanova, L.F.Stobva, O.N.Sidorova, E.V.Mel'nikova, S.V.Borisevich

## Future Developments and Applications of the Vaccines against Dangerous Viral Infections, RNA-Replicon-Based, Obtained from the Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus

“The 48<sup>th</sup> Central Research Institute” of the Ministry of Defense, Sergiev Possad, Russian Federation

The members of the *Filoviridae* (Marburg and Ebola viruses) and *Arenaviridae* (Lassa, Lujo, Machupo, Junin, Guanarito, Sabia viruses) families are the etiological agents of particularly dangerous viral hemorrhagic fevers. These agents pose a potential threat to public health care in view of the possibility of their unintended import into the non-endemic regions, and thus construction of specific medical protectors as regards induced by them diseases is a pressing issue. According to leading experts, vaccination of the cohorts that fall in the risk groups is the most effective and least expensive method to prevent the development of epidemics.

The review contains information on a new prospective line of protective preparations development as regards particularly dangerous viral infections – construction of alphavirus-replicon-based vaccine. Elaboration of recombinant replicons does not require cultivation of pathogenic microorganisms. RNA-replicons are distinguished by their incapacity to produce infective progeny, which is of a great importance for the development of vaccines against particularly dangerous viral hemorrhagic fevers. Advantages of alphaviral replicons over other RNA-replicons are as follows: high levels of heterologous gene expression and resistance to anti-vector immunity. RNA-replicons of alphaviruses combine the safety of inactivated, and immunogenicity of live attenuated vaccines. Alphaviruses-based replicons are suitable for express vaccine development with the purpose of specific prophylaxis of viral infectious diseases.

*Key words:* Venezuelan equine encephalomyelitis virus, RNA-replicon, alphaviruses, filoviruses, arenaviruses, vaccine, vector.

Представители семейств *Filoviridae* (вирусы Марбург, Эбола) и *Arenaviridae* (вирусы Ласса, Луйо, Мачупо, Хунин, Гуанарито, Сэбиа) являются этиологическими агентами особо опасных вирусных геморрагических лихорадок (ООВГЛ). Они вызывают острые заболевания человека, характеризующиеся шоком, геморрагиями, мультиорганной недостаточностью, и заканчиваются летальным исходом в 22–90 % случаев [9, 20, 21].

Данные возбудители рассматриваются как угроза здравоохранению вследствие их неконтролируемого завоза в неэндемичные регионы, поэтому вопрос о создании специфических медицинских средств защиты в отношении вызываемых ими заболеваний является актуальным. Вакцинация групп риска является наиболее эффективным и экономичным спосо-

бом защиты от эпидемии, которая может возникнуть в результате завоза возбудителя [3, 7, 8, 15].

В качестве основных направлений создания эффективных вакцин для этих нозологических форм ранее рассматривали цельновирсионные убитые вакцины, вирусоподобные частицы, ДНК-вакцины, векторные рекомбинантные вакцины на основе аденовирусов и вируса везикулярного стоматита [4, 5, 11, 15, 19, 25, 28, 29, 33, 34].

Следует подчеркнуть, что идеальная вакцина должна вызывать долговременный иммунитет при однократном введении, обладать перекрестной реактивностью к различным природным штаммам возбудителя и не вызывать поствакцинальных осложнений. Кроме того, стоимость вакцины не должна препятствовать ее массовому применению.

В настоящее время для ООВГЛ нет вакцинных препаратов, которые отвечали бы всем перечисленным условиям. Только для Аргентинской геморрагической лихорадки (АГЛ) разработан живой аттенуированный вакцинный штамм Candid 1 вируса Хунин. Он применяется в эндемичных регионах Аргентины и, несмотря на аттенуацию, является реактогенным для человека [21, 23].

Создание эффективных вакцин против ООВГЛ возможно с помощью системы обратной генетики, которая позволяет получить ценную информацию для понимания функций структурных белков вирионов, вирусной репликации и патогенеза, что необходимо для разработки вакцин.

Методы обратной генетики пригодны для получения вакцин и могут быть использованы при разработке живых аттенуированных вирусных вакцин в отношении рассматриваемых нозологических форм. Однако не поддающиеся точной оценке риски опасности, связанные с их использованием, могут сделать это направление бесперспективным. С нашей точки зрения, одним из наиболее перспективных направлений в сфере разработки и применения вакцин против ООВГЛ является получение вакцин на основе РНК репликонов, в частности, репликонов альфавирусов.

Репликоном называют наименьший генетический элемент, способный к самовоспроизведению. Эта искусственная РНК начинает производить новый белок. РНК репликоны могут быть получены на основе вирусов с РНК<sup>+</sup> или РНК<sup>-</sup> геномами. Они представляют собой вирусные векторы, которые не только являются авирулентными, но и даже потенциально (в отличие от многих используемых в качестве живых вакцин аттенуированных штаммов) не способны к реверсии к дикому типу вируса. Автономность РНК репликации дает возможность РНК репликонам накапливаться до высоких уровней, при этом происходит стимуляция гуморальной и клеточной ветвей иммунного ответа.

РНК репликоны на основе вирусов с РНК<sup>+</sup> геномом (РНК<sup>+</sup> репликоны) могут быть применены одним из трех способов:

**Трансфекция нативной РНК.** В этом случае РНК, полученная в результате транскрипции *in vitro*, применяется при внутримышечном введении [2, 10]. Недостатком указанного подхода является высокая чувствительность нативной РНК к действию РНКаз, что в значительной степени снижает эффективность процесса доставки *in vivo*.

**Доставка репликонов в виде кДНК фрагмента** геномной РНК возбудителя (ДНК репликоны). Этот подход напоминает таковой при использовании ДНК-вакцин. Однако в отличие от ДНК-вакцин в данном случае ДНК транскрибируется в ядрах клеток в репликоновую РНК [11, 12, 14, 16]. Эта РНК переносится из ядер в цитоплазму клеток, где и происходят процессы амплификации репликоновой РНК и трансляции вирусоспецифического белка. При этом (в отличие от ДНК-вакцин) достигаются высокие уровни экспрессии вирусного антигена. Недостатком этого способа является возможность рекомбинации векторной ДНК с хромосомной, что делает ее потен-

циально опасной [15].

**Использование вирусных репликонов на основе альфавирусов.** Репликоны продуцируются в клеточных линиях млекопитающих, которые трансфицируются *in vitro* транскрибированными РНК, включая репликоновую РНК, которая кодирует вирусные неструктурные белки вместе с гетерологичным антигеном и хелперную РНК, кодирующую вирусные структурные белки. В некоторых системах используются две хелперные РНК, чтобы избежать рекомбинации РНК с образованием способного к репликации вируса [1, 2, 6, 22, 30, 31]. Хелперные РНК содержат 5' и 3' концы вирусного генома и вирусный субгеномный 26S промотор. Следовательно, в присутствии субгеномного репликона реплицируются хелперные РНК и экспрессируются структурные белки. В результате этого происходит образование вирусных репликонов, которые высвобождаются в клеточный супернатант. Поскольку хелперные РНК не содержат сигналы, необходимые для упаковки, данному процессу подвергается только субгеномная репликоновая РНК.

Одним из вариантов метода, позволяющего избежать трансфекции многочисленных транскриптов, является использование упаковывающих клеточных линий, экспрессирующих гены хелперных РНК [2, 6, 10, 16, 26]. Репликоны, продуцируемые подобным методом, являются инфекционными и эффективно доставляют рекомбинантную репликоновую РНК в чувствительную клетку. Однако клетки не продуцируют инфекционное потомство, поскольку они, в отличие от клеток, инфицированных вирусом дикого типа, не могут обеспечить полноценную сборку вириона. Поэтому эти РНК-репликоны называются «одноцикловыми» или «неспособными к репродукции» векторами.

Изучение альфавирусных репликон-основанных вакцин было начато в конце прошлого века, когда они впервые использовались для экспрессии гетерологичных генов [12]. Повышение безопасности и улучшение конструкции репликоновых векторов значительно расширили возможности применения вакцин данного класса. Использование этих вакцин обеспечивает сильный и сбалансированный иммунный ответ с соответствующей защитой против различных заболеваний, которые имеют большое значение для ветеринарии и здравоохранения. Поэтому технология альфавирусных репликонов обладает большим потенциалом для создания следующих поколений вакцин против инфекционных заболеваний человека и животных.

Как правило, репликон альфавирусов содержит последовательность нуклеиновой кислоты (НК), кодирующую 5'-концевую последовательность альфавирусов, по крайней мере, одну последовательность НК, кодирующую неструктурный белок альфавирусов, один альфавирусный субгеномный промотор, одну внутреннюю последовательность рибосомальной НК (IRES-элемент), одну гетерологичную НК и последовательность НК, кодирующую 3'-концевую последовательность альфавирусов [13, 14, 17, 18, 22, 24, 26, 27]. 3'-концевые и 5'-концевые последовательности, необходимые для обеспечения естественного

цикла репликации альфавирусов, в рекомбинантном репликоне могут быть исключены. Так как структурные гены альфавирусов в репликоне отсутствуют и не могут экспрессироваться после вакцинации, то неспецифический антивекторный иммунный ответ является минимальным [24, 26].

В клетках эукариот задействованы два различных механизма для инициации трансляции. В одном из них, так называемый «кэп», расположенный на 5'-конце мРНК, распознается фактором инициации (eIF4F). При этом происходит связывание транспортной РНК метионина и взаимодействие с рибосомальной субъединицей 40S («кэп»-зависимая трансляция) [24].

Альтернативный механизм предусматривает инициацию трансляции посредством IRES-элементов, которая инициирует трансляцию с внутреннего кодона инициации мРНК с помощью трансактивирующего фактора – «кэп»-независимая трансляция. IRES-элементы обнаружены в многочисленных транскриптах вирусов позвоночных, беспозвоночных и растений, а также в транскриптах генов позвоночных и беспозвоночных [24, 26].

В настоящее время описаны альфавирусные векторы, экспрессирующие требуемые гены. Во всех примерах описана модификация генов неструктурных белков или 26S субгеномного промотора для регулирования репликации вектора или транскрипции. Альфавирусный 26S субгеномный промотор управляет транскрипцией в процессе репликации альфавирусов. Он может модифицироваться таким образом, что его функциональная активность может быть уменьшена, увеличена или сохранена [26].

Гетерологичная НК является нуклеотидной последовательностью, отсутствующей и/или не представленной в геноме дикого типа в том же порядке, что и в рекомбинантном альфавирусном геноме. Когда рекомбинантная НК содержит гены одного и более структурных белков, она может продуцировать дефектные частицы альфавирусов [24, 26]. Гетерологичная НК может кодировать белки или пептиды, которые являются антигенами, индуцирующими факторы иммунного ответа в отношении различных инфекционных заболеваний.

Альфавирусные репликон-основанные вакцины пригодны для разработки вакцин «нового поколения». Первые экспериментальные вакцины против гриппа, основанные на альфавирусных репликонах, были сконструированы с использованием вируса леса Семлики. Репликон, экспрессировавший ген нуклеопротеина (NP), вызывал сильный гуморальный и клеточный иммунный ответы [35].

В настоящее время описано использование рекомбинантных альфавирусных репликонов, кодирующих структурные белки вирусов гриппа, парагриппа, вируса метапневмонии, респираторного синцитиального вируса, вируса инфекционной анемии лошадей, вируса иммунодефицита человека 1 типа, ортопоксвирусов, вирусов желтой лихорадки, Западного Нила, японского энцефалита, лихорадки долины Рифт, Конго-Крымской геморрагической лихорадки, герпеса, гепатита В и возбудителей других

инфекционных заболеваний [10, 11, 14, 17, 24, 27].

Репликон на основе альфавирусов был использован для быстрой разработки вакцины в ходе пандемии, вызванной вирусом гриппа А/Н1N1/pdm09. Защита, обеспечиваемая данной вакциной, сходна с таковой после гомологичной иммунизации [32].

Наличие пригодного для иммунизации человека штамма ТС 83 вируса венесуэльского энцефаломиелита лошадей (ВЭЛ) определяет перспективы создания РНК-репликона на основе генома этого возбудителя. Данный штамм может быть использован для получения репликоновой системы, экспрессирующей протективные гены возбудителей опасных и особо опасных инфекционных заболеваний. Так как получение рекомбинантных репликонов не требует культивирования патогенных микроорганизмов, разработка и производство селективных агентов в репликон-основанных вакцинах может проводиться в условиях, не требующих соблюдения мер специальной биобезопасности [24].

Вектор на основе РНК-репликона аттенуированного вируса ВЭЛ состоит из РНК репликонового экспрессирующего вектора, РНК пакующего хелпера и РНК, продуцируемых *in vitro* с транскрипционных плазмид. РНК-репликона кодирует встроенный ген и транскриптазу вируса ВЭЛ, которая контролирует репликацию и транскрипцию гетерологичного гена. При совместной трансфекции эукариотических клеток полученным репликоном и двумя хелперными РНК, кодирующими структурные белки вируса ВЭЛ (гликопротеины и нуклеокапсид), происходит упаковка РНК-репликона в вирусоподобные частицы, которые служат в качестве векторов для доставки, амплификации и экспрессии *in vivo* встроенных генов [26].

Поскольку в хелперных РНК отсутствуют «пакующие сигналы», необходимые для дальнейшей репродукции полученной конструкции, инфекционный процесс ограничен одним циклом репликации [24, 26].

Преимущества альфавирусных репликонов по сравнению с живыми вирусными векторами состоят в том, что генная экспрессия ограничивается первоначально инфицированными клетками; диссеминации инфекции не происходит, что повышает безопасность вакцины. Гены экспрессируются в цитоплазме клеток с РНК-репликонов, что дает возможность им сплайсироваться. Экспрессия на высоком уровне обусловлена двумя раундами генной амплификации: первая – за счет репликации РНК-вектора, вторая – за счет генной транскрипции с 26S промотора. Клетками-мишенями репликонов *in vivo* является лимфоидная ткань, включая антиген-презентативные дендритные клетки.

Репликоны могут индуцировать иммунитет к двум патогенам при иммунизации комбинацией репликонов или двуэкспрессирующим репликоном. Это определяет перспективы использования рекомбинантных репликонов вируса ВЭЛ для конструирования на их основе вакцин против ООВГЛ.

В работе Р.С. Pushko *et al.* [22] проведена оценка моновалентной вакцины против вируса Ласса и бивалентной вакцины против вирусов Ласса и Эбола, осно-

ванных на векторной конструкции – РНК-репликоне аттенуированного штамма ВЭЛ. Необходимость создания бивалентной вакцины против вирусов Ласса и Эбола вызвана тем, что заболевания, обусловленные ими, имеют перекрывающиеся ареалы в африканских странах, расположенных к югу от пустыни Сахара. Завозные случаи лихорадки Ласса были зарегистрированы в США и Европе [21].

Основные элементы стратегии получения защитных препаратов против лихорадки Ласса разработаны ранее, когда были получены рекомбинантные штаммы вируса вакцины, экспрессирующие гены нуклеопротеина (NP) или гликопротеина (GP) вируса Ласса, которые защищали лабораторных животных (морские свинки, обезьяны) против летального заражения этим вирусом. При введении рекомбинантных вирусов вакцины со встроенными генами GP или NP макакам-резусам в первом случае наблюдали более выраженную защиту [22]. Подобные результаты были получены при исследовании рекомбинантных вирусов вакцины со встроенными генами NP и GP вируса Эбола [8, 11]. Однако эти исследования лишь успешно идентифицировали иммунодоминантные антигены, которые осуществляли защиту против летального заражения упомянутыми вирусами. Использование в качестве векторов живых неаттенуированных вирусов всегда оставляло открытым вопрос о безопасности этих конструкций, особенно для лиц с иммунодефицитными состояниями, что предполагало поиск новых, более безопасных векторов.

На первом этапе работы авторы исследовали репликоны ВЭЛ со встроенными генами NP и GP вируса Ласса в виде монопрепаратов и смеси обоих репликонов. Морских свинок через 4 недели после последней иммунизации инфицировали вирусом Ласса в дозе 160 LD<sub>50</sub>. У иммунизированных животных не выявлено никаких симптомов заболевания, все контрольные неиммунизированные животные погибли [22].

Авторами была проведена оценка протективных свойств смеси из двух репликонов, экспрессирующих гликопротеины вирусов Ласса и Эбола, а также векторного репликона с двойной экспрессией генов GP данных возбудителей, причем каждый из них экспрессировался под контролем собственного 26S промотора. Результаты этих исследований показали наличие экспрессии генов и трансляцию гликопротеинов обоих вирусов, к которым вырабатывались специфические антитела, связывающиеся с полноценными гликопротеинами обоих вирусов [22].

Следует отметить, что иммунизированные морские свинки были устойчивы к последующему заражению вирулентным штаммом вируса ВЭЛ, несмотря на то, что было выявлено, что с этих репликонов, даже после слепых пассажей в культуре клеток, живой вирус ВЭЛ никогда не регенерируется [24].

Несмотря на сравнительно невысокий титр антител против GP вируса Ласса, после иммунизации смесью двух репликонов и двуэкспрессирующим репликоном животные выжили после заражения летальной дозой вирусов Ласса и Эбола. Авторы объясняют это тем, что основную протективную роль про-

тив вируса Ласса играют факторы клеточного иммунитета (в частности, CD4<sup>+</sup> киллерные клетки) [22].

M.C. Nevey *et al.* [12] при создании эффективной вакцины для защиты людей от геморрагической лихорадки Марбург разработали генетическую конструкцию на основе репликона вируса ВЭЛ. В соответствии с выбранной стратегией конструирования вакцины ген, кодирующий структурный гликопротеин вируса Марбург, встроен в гены структурных белков вируса ВЭЛ. В результате получена самореплицирующаяся молекула РНК, обладающая собственными репликационными и транскрипционными функциями, содержащая мРНК, кодирующую структурный гликопротеин вируса Марбург. Результаты исследований свидетельствовали о том, что иммунизированные морские свинки защищены от последующего инфицирования инфекционным вирусом Марбург в большей степени, чем животные, иммунизированные разработанной ранее конструкцией на основе бакуловируса, экспрессирующей ген гликопротеина возбудителя лихорадки Марбург. Разработанная конструкция предложена авторами в качестве кандидата в вакцины для иммунизации людей против геморрагической лихорадки Марбург [13].

Основными иммунодоминантными эпитопами аренавирусов являются два оболочечных гликопротеина G1 и G2, которые образуются при протеолитическом расщеплении клеточно-ассоциированного предшественника GPC [21].

A.V. Seregin *et al.* [27] провели оценку защитной эффективности иммунизации морских свинок репликоном на основе вируса ВЭЛ, штамм TC 83, содержащим вставку гена GPC РНК вируса Хунин, при последующем заражении заведомо летальной дозой возбудителя АГЛ.

Авторами был создан и изучен *in vitro* и *in vivo* TC 83-репликон на основе вируса ВЭЛ, экспрессирующий предшественник гликопротеинов вируса Хунин, штамм Candid 1. Эта конструкция содержала РНК-элементы и гены неструктурных белков генома вируса ВЭЛ, которые требуются для репликации и транскрипции субгеномной РНК, т.е. 5'- и 3'-концы нетранслируемой области, субгеномный промотор, локализованный выше субгеномного РНК-транскрипционного сайта, и концевой кодон открытой рамки считывания гена неструктурного белка. Упаковку репликонов проводили при использовании дефектных хелперов, кодирующих либо капсид, либо гликопротеины вируса ВЭЛ штамма TC 83 [27]. Этот принцип ранее был использован для экспрессии гликопротеинов других вирусов [15, 16, 24]. Наличие экспрессии GPC в клетках *vero*, инфицированных упакованным репликоном, подтверждено при использовании моноклональных антител к гликопротеину G1 [27].

Иммуногенность рекомбинантного репликона определяли по наличию вируснейтрализующих антител к вирусу Хунин. Через 7 недель после однократной подкожной иммунизации у 4 из 5 морских свинок титр специфических антител находился в диапазоне от 1:5 до 1:160. После бустерной иммунизации титр нейтрализующих антител у всех животных повысился

и составлял 1:640–1:2560. При последующем инфицировании иммунизированных морских свинок вирусом Хунин в дозе 100 LD<sub>50</sub> все животные выжили. Полученные результаты указывают на то, что GPC является иммунодоминантным эпитопом, индуцирующим протективный иммунный ответ против вируса Хунин, и открывают перспективы разработки эффективной нереактогенной вакцины в отношении АГЛ.

Как уже упоминалось, преимуществом РНК-репликонов является их неспособность продуцировать инфекционное потомство. Однако это ограничивает диссеминацию антигена и, таким образом, число дендритных клеток, представляющих антиген. Этот недостаток преодолим за счет экспрессии рекомбинантных растворимых антигенов [24, 26], которые могут секретироваться клетками. Экспрессию костимуляторных цитокинов и хемокинов, которые высвобождаются клетками, можно увеличить, направляя дендритные клетки к сайту доставки вакцины [6, 10, 14, 26].

Идеальный РНК-репликоновый вектор в плане эффективности вакцинации – это репликон, который специфически нацеливает дендритные клетки [26]. Подобные репликоны нецитотоксичны, что позволяет дендритным клеткам выполнять их иммунологическую функцию в процессинге вакцинных антигенов, созревании и миграции к лимфоузлам для активации адаптивного иммунного ответа.

Использование специализированных клеточных линий для генерирования РНК-репликонов значительно облегчит создание эффективных вакцин, поскольку подобные основаны на свойственной вирусам системе доставки их собственного генетического материала. Критическим аспектом в данном случае является генерирование трансенного хелпера или пакующих клеточных линий для репродукции РНК-репликонов. Эти клеточные линии могут дать высокий выход РНК-репликонов в соответствии с наивысшими стандартами биологической безопасности. Полностью исключается регенерация способного к размножению вируса, что имеет особое значение при создании вакцин против ООВГЛ.

Разумеется, предполагаемая стоимость альфавирусных РНК-репликонов при использовании их в качестве вакцин пока что несопоставима с этим показателем для живых вакцин. Однако с учетом того, что для защиты от эпидемии, которая может возникнуть в результате завоза возбудителей ООВГЛ, необходима иммунизация достаточно ограниченной группы риска, предполагаемые затраты на разработку и производство вакцин на основе альфавирусных РНК-репликонов в отношении указанных возбудителей будут полностью оправданы.

Таким образом, РНК-репликоны альфавирусов сочетают безопасность инактивированных с иммуногенностью живых аттенуированных вакцин. Преимуществом РНК-репликонов является их неспособность продуцировать инфекционное потомство, что имеет особое значение при создании вакцин в отношении ООВГЛ. Репликоны на основе альфавирусов пригодны для быстрой разработки вакцины в ходе возможных эпидемий и эпидемических вспы-

шек. Преимущества альфавирусных репликонов перед другими РНК-репликонами при разработке вакцин заключаются в высоком уровне экспрессии гетерологичных генов, тропизме к дендритным клеткам, резистентности к антивекторному иммунитету. Конструирование рекомбинантных репликонов не требует культивирования патогенных микроорганизмов. Разработка и производство селективных агентов в репликон-основанных вакцинах может проводиться в условиях, не требующих соблюдения мер специальной техники биобезопасности.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Albarino C.G., Bird B.H., Chakrabarti A.K., Dodd K.A., Erickson B.R., Nichol S.T. Efficient rescue of recombinant Lassa virus reveals the Influence of S segment noncoding regions on virus replication and virulence. *J. Virol.* 2011; 85(8):4020–4.
2. Balasuriya U.B.R., Heidner H.W., Davis N.L., Johnston R.E., Wagner H.M., Hullinger P.J., Hedges J.F., Williams J.C., Johnston R.E., David Wilson W., Liu I.K., James MacLachlan N. Alphavirus replicon particles expressing the two major envelope proteins of equine arteritis virus induce high level protection against challenge with virulent virus in vaccinated horses. *Vaccine.* 2002; 20:1609–17.
3. Bausch D.G., Geisbert T.W. Development of vaccines for Marburg hemorrhagic fever. *Expert Rev. Vaccines.* 2007; 6:57–74.
4. Branco L.M., Grove J.N., Geske F.J., Boisen M.L., Muncy I.J., Magliato S.A., Magliato S.A., Henderson L.A., Schoepp R.J., Cashman K.A., Hensley L.E., Garry R.F. Lassa virus-like particles displaying all major immunological determinants as a vaccine candidate for Lassa hemorrhagic fever. *Virol. J.* 2010; 7:279.
5. Bredenbeek P.J., Molenkamp R., Spaan W.J.M., Deubel V., Marianneau P., Salvato M.S., Moshkoff D., Zapata J., Tikhonov I., Patterson J., Carrion R., Ticer A., Brasky K., Lukashovich I.S. A recombinant yellow fever 17D vaccine expressing Lassa virus glycoproteins. *Virology.* 2006; 345(2):299–4.
6. Davis N.L., West A., Reap E., MacDonald G., Collier M., Dryga S., Maughan M., Connell M., Walker C., McGrath K., Cecil C., Ping L.-H., Frelinger J., Olmsted R., Keith P., Swanstrom R., Williamson C., Johnson P., Montefiori D., Johnston R.E. Alphavirus replicon particles as candidate HIV vaccines. *IUBMB Life.* 2002; 53:209–11.
7. Dupuy L.C., Schmaljohn C.S. DNA vaccines for biodefense. *Expert Rev. Vaccines.* 2009; 8:1739–54.
8. Falzarano D., Geisbert T.W., Feldmann H. Progress in filovirus vaccine development: evaluating the potential for clinical use. *Expert Rev. Vaccines.* 2011; 10:63–77.
9. Feldman H., Klenk H.D., Sanchez A. Molecular biology and evolution of filoviruses. *Arch. Virol.* 1993; 7:81–100.
10. Fluet M.E., Whitmore A.C., Moshkoff D.A., Fu K., Tang Y., Collier M.L., West A., Moore D.T., Swanstrom R., Johnston R.E., Davis N.L. Effects of rapid antigen degradation and VEE glycoprotein specificity on immune responses induced by a VEE replicon vaccine. *Virology.* 2008; 370(1):22–32.
11. Grant-Klein R.J., Altamura L.A., Schmaljohn C.S. Progress in recombinant DNA-derived vaccines for Lassa virus and filoviruses. *Virus Research.* 2011; 162(1–2):148–61.
12. Hevey M., Negley D., Pushko P., Smith J., Schmaljohn A. Marburg virus vaccines based upon alphavirus replicons protect guinea pigs and nonhuman primates. *Virology.* 1998; 251(1):28–37.
13. Hevey M.C., Negley D.L., Pushko P., Smith J.F., Schmaljohn A.L. Marburg Virus Vaccine. US Patent 6,517,842 B1, 2003.
14. Lee J.S., Groebner J.L., Hadjipanayis A.G., Negley D.L., Schmaljohn A.L., Welkos S.L., Smith L.A., Smith J.F. Multiagent vaccines vectored by Venezuelan equine encephalitis virus replicon elicits immune responses to Marburg virus and protection against anthrax and botulinum neurotoxin in mice. *Vaccine.* 2006; 24:6886–92.
15. Lesley C.D., Schmaljohn C.S. DNA vaccines for biodefense. *Expert Rev. Vaccines.* 2009; 8(12):1739–54.
16. Ljungberg K., Whitmore A.C., Fluet M.E., Moran T.P., Shabman R.S., Collier M.L., Kraus A.A., Thompson J.M., Montefiori D.C., Beard C., Johnston R.E. Increased immunogenicity of a DNA-launched Venezuelan equine encephalitis virus-based replicon DNA vaccine. *J. Virol.* 2007; 81:13412–23.
17. Lundstrom K. Alphavirus vectors for vaccine production and gene therapy. *Expert Rev. Vaccines.* 2003; 2:447–59.
18. Nabel C., Yang Z., Sullivan N., Sanchez A. Development of a preventive vaccine for filovirus infection in primates. US Patent 8,124,592 B2, 2012.
19. Papaneri A.B., Schnell M.J., Wirblich C., Cooper K., Jahrling P.B., Blaney J.E. Further characterization of the immune response in mice to inactivated and live rabies vaccines expressing Ebola virus glycoprotein. *Vaccine.* 2012; 30(43):6136–41.
20. Peters C.J., Sanchez A., Rollin P.E., Ksiazek T.G., Murphy

- F.A. Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., Chanock P.M., Memick J.L., Monath T.P., Roizman R., Straus S.E., editors. *Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. P. 1161–76.
21. Peters C.J., Buchmeier M., Rollin P.E., Ksiazek T.O. Arenaviridae. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., Chanock P.M., Memick J.L., Monath T.P., Roizman R., Straus S.E. editors. *Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. P. 1521–51.
22. Pushko P., Geisbert J., Parker M., Jahrling P., Smith J. Individual and bivalent vaccines based on alphavirus replicons protect guinea pigs against infection with Lassa and Ebola viruses. *J. Virol.* 2001; 75:11677–85.
23. Radoshitzky S.R., Kuhn J.H., de Kok-Mercado F., Jahrling P.B., Bavari S. Drug discovery technologies and strategies for Machupo virus and other New World arenaviruses. *Exp. Opin. Drug Discov.* 2012; 7(7):613–32.
24. Rayner J.O., Dryga S.A., Kamrud K.I. Alphavirus vectors and vaccination. *Rev. Med. Virol.* 2002; 12(5):279–96.
25. Richardson J.S., Yao M.K., Tran K.N., Croyle M.A., Strong J.E., Feldmann H., Kobinger G.P. Enhanced protection against Ebola virus mediated by an improved adenovirus-based vaccine. *PLoS One*. 2009; 4(4):e5308. doi: 10.1371/journal.pone.0005308.
26. Smith J.F., Kamrud K.I., Rayner J.O. Alphavirus replicons and helper constructs. US Patent 7,442,381 B2, 2008.
27. Seregin A.V., Yun N.E., Poussard A.L., Peng B.H., Smith J.K., Smith J.N., Salazar M., Paessler S. TC83 replicon vectored vaccine provides protection against Junin virus in guinea pigs. *Vaccine*. 2010; 28:4713–8.
28. Swenson D.L., Wang D., Luo M., Warfield K.L., Woraratanadharm J., Holman D.H., Dong J.Y., Pratt W.D. Vaccine to confer to nonhuman primates complete protection against multistrain Ebola and Marburg virus infections. *Clin. Vaccine Immunol.* 2008; 15(3):460–7.
29. Swenson D.L., Warfield K.L., Larsen T., Alves D.A., Coberley S.S., Bavari S. Monovalent virus-like particle vaccine protect guinea pigs and nonhuman primates against infection with multiple Marburg virus. *Exp. Rev. Vaccines*. 2008; 7:417–29.
30. Thompson J.M., Whitmore A.C., Konopka J.L., Collier M.L., Richmond E.M., Davis N.L., Staats H.F., Johnston R.E. Mucosal and systemic adjuvant activity of alphavirus replicon particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103(10):3722–7.
31. Vander Veen R.L., Harris D.L., Kamrud K.I. Alphavirus replicon vaccines. *Anim. Health Res. Rev.* 2012; 13:1–9.
32. Vander Veen R.L., Loynachan A.T., Mogler M.A., Russell B.J., Harris D.L., Kamrud K.I. Safety, immunogenicity, and efficacy of an alphavirus replicon-based swine influenza virus hemagglutinin vaccine. *Vaccine*. 2012; 30:1944–50.
33. Wang D., Raja N.U., Trubey C.M., Juompan L.Y., Luo M., Woraratanadharm J., Deitz S.B., Yu H., Swain B.M., Moore K.M., Pratt W.D., Hart M.K., Dong J.Y. Development of a cAdVax-based bivalent Ebola virus vaccine that induces immune responses against both the Sudan and Zaire species of Ebola virus. *J. Virol.* 2006; 80:2738–46.
34. Warfield K.L., Aman M.J. Advances in virus-like particle vaccines for filoviruses. *J. Infect. Dis.* 2011; 204(Suppl. 3):S1053–9.
35. Zimmer G. RNA replicons – a new approach for influenza virus immunoprophylaxis. *Viruses*. 2010; 2:413–34.
9. Feldman H., Klenk H.D., Sanchez A. Molecular biology and evolution of filoviruses. *Arch. Virol.* 1993; 7:81–100.
10. Fluet M.E., Whitmore A.C., Moshkoff D.A., Fu K., Tang Y., Collier M.L., West A., Moore D.T., Swanstrom R., Johnston R.E., Davis N.L. Effects of rapid antigen degradation and VEE glycoprotein specificity on immune responses induced by a VEE replicon vaccine. *Virology*. 2008; 370(1):22–32.
11. Grant-Klein R.J., Altamura L.A., Schmaljohn C.S. Progress in recombinant DNA-derived vaccines for Lassa virus and filoviruses. *Virus Research*. 2011; 162(1–2):148–61.
12. Hevey M., Negley D., Pushko P., Smith J., Schmaljohn A. Marburg virus vaccines based upon alphavirus replicons protects guinea pigs and non-human primates. *Virology*. 1998; 251(1):28–37.
13. Hevey M.C., Negley D.L., Pushko P., Smith J.F., Schmaljohn A.L. Marburg Virus Vaccine. US Patent 6,517,842 B1, 2003.
14. Lee J.S., Groebner J.L., Hadjipanayis A.G., Negley D.L., Schmaljohn A.L., Welkos S.L., Smith L.A., Smith J.F. Multiagent vaccines vectored by Venezuelan equine encephalitis virus replicon elicits immune responses to Marburg virus and protection against anthrax and botulinum neurotoxin in mice. *Vaccine*. 2006; 24:6886–92.
15. Lesley C.D., Schmaljohn C.S. DNA vaccines for biodefense. *Expert Rev. Vaccines*. 2009; 8(12):1739–54.
16. Ljungberg K., Whitmore A.C., Fluet M.E., Moran T.P., Shabman R.S., Collier M.L., Kraus A.A., Thompson J.M., Montefiori D.C., Beard C., Johnston R.E. Increased immunogenicity of a DNA-launched Venezuelan equine encephalitis virus-based replicon DNA vaccine. *J. Virol.* 2007; 81:13412–23.
17. Lundstrom K. Alphavirus vectors for vaccine production and gene therapy. *Expert Rev. Vaccines*. 2003; 2:447–59.
18. Nabel C., Yang Z., Sulliva N., Sanches A. Development of a preventive vaccine for filovirus infection in primates. US Patent 8,124,592 B2, 2012.
19. Papaneri A.B., Schnell M.J., Wirblich C., Cooper K., Jahrling P.B., Blaney J.E. Further characterization of the immune response in mice to inactivated and live rabies vaccines expressing Ebola virus glycoprotein. *Vaccine*. 2012; 30(43):6136–41.
20. Peters C.J., Sanchez A., Rollin P.E., Ksiazek T.G., Murphy F.A. Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., Chanock P.M., Memick J.L., Monath T.P., Roizman R., Straus S.E., editors. *Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. P. 1161–76.
21. Peters C.J., Buchmeier M., Rollin P.E., Ksiazek T.O. Arenaviridae. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., Chanock P.M., Memick J.L., Monath T.P., Roizman R., Straus S.E. editors. *Virology*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. P. 1521–51.
22. Pushko P., Geisbert J., Parker M., Jahrling P., Smith J. Individual and bivalent vaccines based on alphavirus replicons protect guinea pigs against infection with Lassa and Ebola viruses. *J. Virol.* 2001; 75:11677–85.
23. Radoshitzky S.R., Kuhn J.H., de Kok-Mercado F., Jahrling P.B., Bavari S. Drug discovery technologies and strategies for Machupo virus and other New World arenaviruses. *Exp. Opin. Drug Discov.* 2012; 7(7):613–32.
24. Rayner J.O., Dryga S.A., Kamrud K.I. Alphavirus vectors and vaccination. *Rev. Med. Virol.* 2002; 12(5):279–96.
25. Richardson J.S., Yao M.K., Tran K.N., Croyle M.A., Strong J.E., Feldmann H., Kobinger G.P. Enhanced protection against Ebola virus mediated by an improved adenovirus-based vaccine. *PLoS One*. 2009; 4(4):e5308. doi: 10.1371/journal.pone.0005308.
26. Smith J.F., Kamrud K.I., Rayner J.O. Alphavirus replicons and helper constructs. US Patent 7,442,381 B2, 2008.
27. Seregin A.V., Yun N.E., Poussard A.L., Peng B.H., Smith J.K., Smith J.N., Salazar M., Paessler S. TC83 replicon vectored vaccine provides protection against Junin virus in guinea pigs. *Vaccine*. 2010; 28:4713–8.
28. Swenson D.L., Wang D., Luo M., Warfield K.L., Woraratanadharm J., Holman D.H., Dong J.Y., Pratt W.D. Vaccine to confer to nonhuman primates complete protection against multistrain Ebola and Marburg virus infections. *Clin. Vaccine Immunol.* 2008; 15(3):460–7.
29. Swenson D.L., Warfield K.L., Larsen T., Alves D.A., Coberley S.S., Bavari S. Monovalent virus-like particle vaccine protect guinea pigs and nonhuman primates against infection with multiple Marburg virus. *Exp. Rev. Vaccines*. 2008; 7:417–29.
30. Thompson J.M., Whitmore A.C., Konopka J.L., Collier M.L., Richmond E.M., Davis N.L., Staats H.F., Johnston R.E. Mucosal and systemic adjuvant activity of alphavirus replicon particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006; 103(10):3722–7.
31. Vander Veen R.L., Harris D.L., Kamrud K.I. Alphavirus replicon vaccines. *Anim. Health Res. Rev.* 2012; 13:1–9.
32. Vander Veen R.L., Loynachan A.T., Mogler M.A., Russell B.J., Harris D.L., Kamrud K.I. Safety, immunogenicity, and efficacy of an alphavirus replicon-based swine influenza virus hemagglutinin vaccine. *Vaccine*. 2012; 30:1944–50.
33. Wang D., Raja N.U., Trubey C.M., Juompan L.Y., Luo M., Woraratanadharm J., Deitz S.B., Yu H., Swain B.M., Moore K.M., Pratt W.D., Hart M.K., Dong J.Y. Development of a cAdVax-based bivalent Ebola virus vaccine that induces immune responses against both the Sudan and Zaire species of Ebola virus. *J. Virol.* 2006; 80:2738–46.
34. Warfield K.L., Aman M.J. Advances in virus-like particle vaccines for filoviruses. *J. Infect. Dis.* 2011; 204(Suppl. 3):S1053–9.
35. Zimmer G. RNA replicons – a new approach for influenza virus immunoprophylaxis. *Viruses*. 2010; 2:413–34.

## References

1. Albarino C.G., Bird B.H., Chakrabarti A.K., Dodd K.A., Erickson B.R., Nichol S.T. Efficient rescue of recombinant Lassa virus reveals the influence of S segment noncoding regions on virus replication and virulence. *J. Virol.* 2011; 85(8):4020–4.
2. Balasuriya U.B.R., Heidner H.W., Davis N.L., Johnston R.E., Wagner H.M., Hullinger P.J., Hedges J.F., Williams J.C., Johnston R.E., David Wilson W., Liu I.K., James MacLachlan N. Alphavirus replicon particles expressing the two major envelope proteins of equine arteritis virus induce high level protection against challenge with virulent virus in vaccinated horses. *Vaccine*. 2002; 20:1609–17.
3. Bausch D.G., Geisbert T.W. Development of vaccines for Marburg hemorrhagic fever. *Expert Rev. Vaccines*. 2007; 6:57–74.
4. Branco L.M., Grove J.N., Geske F.J., Boisen M.L., Muncy I.J., Magliato S.A., Magliato S.A., Henderson L.A., Schoepp R.J., Cashman K.A., Hensley L.E., Garry R.F. Lassa virus-like particles displaying all major immunological determinants as a vaccine candidate for Lassa hemorrhagic fever. *J. Virol.* 2010; 7:279.
5. Bredenbeek P.J., Molenkamp R., Spaan W.J.M., Deubel V., Marianneau P., Salvato M.S., Moshkoff D., Zapata J., Tikhonov I., Patterson J., Carrion R., Ticer A., Brasky K., Lukashovich I.S. A recombinant yellow fever 17D vaccine expressing Lassa virus glycoproteins. *Virology*. 2006; 345(2):299–4.
6. Davis N.L., West A., Reap E., MacDonald G., Collier M., Dryga S., Maughan M., Connell M., Walker C., McGrath K., Cecil C., Ping L.-H., Frelinger J., Olmsted R., Keith P., Swanstrom R., Williamson C., Johnson P., Montefiori D., Johnston R.E. Alphavirus replicon particles as candidate HIV vaccines. *IUBMB Life*. 2002; 53:209–11.
7. Dupuy L.C., Schmaljohn C.S. DNA vaccines for biodefense. *Expert Rev. Vaccines*. 2009; 8:1739–54.
8. Falzarano D., Geisbert T.W., Feldmann H. Progress in filovirus vaccine development: evaluating the potential for clinical use. *Expert Rev. Vaccines*. 2011; 10:63–77.

## Authors:

Petrov A.A., Lebedev V.N., Plekhanova T.M., Stobva L.F., Sidorova O.N., Mel'nikova E.V., Borisevich S.V. "The 48<sup>th</sup> Central Research Institute" of the Ministry of Defense, Sergiev Possad, Russian Federation

## Об авторах:

Петров А.А., Лебедев В.Н., Плекханова Т.М., Стобва Л.Ф., Сидорова О.Н., Мельникова Е.В., Борисевич С.В. 48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны. Российская Федерация, Сергиев Посад.

Поступила 08.04.14.

Ю.С.Ковтун, А.А.Курилова, Т.В.Таран, Л.С.Катунина, Н.В.Чурикова

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ БЕЛКОВЫХ ОСНОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕД

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь,  
Российская Федерация

Целью работы является сравнительная оценка использования панкреатических гидролизатов белковых продуктов растительного и животного происхождения в качестве питательной основы микробиологических сред. В качестве исходного сырья использовали: желатин, сою, соевый концентрат, глютен кукурузный, рыбную кормовую муку, кильку каспийскую, кровь КРС. Гидролиз белкового сырья, очистку гидролизатов и их контроль по физико-химическим показателям проводили общепринятыми методами. Определение биологических показателей пептонов осуществляли на модели питательного агара с помощью тест-штаммов *Shigella flexneri* 1a 8516, *Shigella sonnei* «S form», *Pseudomonas aeruginosa* 27/99, *Serratia plymuthica* 1. Определены физико-химические показатели исследуемых гидролизатов. Выявлены различия в количестве, диаметре и частоте диссоциации колоний *Shigella flexneri* 1a 8516, *Shigella sonnei* «S form», пигментообразовании *Pseudomonas aeruginosa* 27/99 и *Serratia plymuthica* 1 на агаровых средах с изучаемыми гидролизатами. Получены сравнительные данные физико-химических и биологических показателей исследуемых гидролизатов, что позволит дифференцировать их применение в составе бактериологических питательных сред.

**Ключевые слова:** гидролизат, питательная среда, физико-химические показатели, биологические показатели, пигментообразование.

Yu.S.Kovtun, A.A.Kurilova, T.V.Taran, L.S.Katunina, N.V.Churikova

## Comparative Assessment of Prospective Protein Bases for Microbiological Media

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Objective of the work is to carry out comparative assessment of the pancreatic hydrolysates of protein-containing products, both phylogenous and zoogenous, as nutrient base for microbiological media. Gelatine, soy, soy concentrate, maize gluten, fish meal, common kilka, and bovine blood have been used as a feedstock. Protein stuff hydrolysis, hydrolysate purification, and validation of physical-chemical properties were performed in accordance with conventional techniques. Testing of peptone biological parameters has been carried out on the model of nutrient agar using *Shigella flexneri* 1a 8516, *Shigella sonnei* "S form", *Pseudomonas aeruginosa* 27/99, *Serratia plymuthica* 1 test strains. Identified have been physical-chemical parameters of the hydrolysates under study. Detected are the variations in quantity, diameter and frequency of dissociation among the colonies of *Shigella flexneri* 1a 8516, *Shigella sonnei* "S form", chromogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* 27/99, *Serratia plymuthica* 1, cultivated on agar media with hydrolysates under study. Obtained are the comparative data on physical-chemical and biological parameters of all experimental hydrolysates, which offers an opportunity to differentiate their choice when adding them into bacteriological nutrient media.

**Key words:** hydrolysate, nutrient media, physical-chemical parameters, biological parameters, chromogenesis.

Производство питательных сред в России до недавнего времени основывалось на использовании панкреатического гидролизата каспийской кильки, ферментативных и кислотных гидролизатов казеина, пептона ферментативного и панкреатического гидролизата кормовых дрожжей. В 90-х годах XX века начался выпуск ферментативного гидролизата рыбной муки и сред на его основе. Примерно в это же время было прекращено промышленное производство кормовых дрожжей и, как следствие, соответствующего гидролизата.

Несмотря на универсальность применения мясных, рыбных и казеиновых гидролизатов, отработанность и относительную простоту методов их получения, в ряде случаев целесообразным является использование альтернативных источников сырья. На это, в частности, указывает обязательное наличие растительных и дрожжевых гидролизатов (автоли-

затов) в перечне продуктов всех крупных компаний, специализирующихся в области выпуска питательных сред. Что касается ассортимента гидролизатов, выпускаемых зарубежными компаниями, следует отметить и их разнообразие: обычно 4–5 наименований мясных пептонов, столько же – казеина и других производных молока, 1–2 и более – растительных, 2–3 продукта, представляющих собой смеси различных пептонов или продукты, состав которых не раскрывается [2, 3, 4]. Наличие достаточного количества различных гидролизатов позволяет оптимизировать состав питательных сред как по экономичности, так и по качественным параметрам, что является определяющим.

Таким образом, значимым направлением в области разработки микробиологических питательных сред продолжает оставаться поиск сырья для получения белковых гидролизатов, не уступающих мясным

по биологическим свойствам.

Одним из гидролизатов, сфера применения которого в последнее время существенно расширилась, является гидролизат желатина. Данный продукт входит в состав нескольких сред для культивирования анаэробов, выпускаемых с недавнего времени фирмой «Oxoid» [4]. Вместе с тем фирмы «Merck», «Laboratorios Conda, S.A.», также выпускающие аналогичные пептоны и питательные среды их содержащие, рекомендуют использовать данные гидролизаты, главным образом, для культивирования неприхотливых микроорганизмов [3]. Поэтому представляет интерес сравнение качественных показателей гидролизата желатина с показателями переваров, полученных из других продуктов.

При получении гидролизатов растительного белка нередко возникают определенные технологические затруднения в связи с необходимостью измельчения исходного сырья, сложностью освобождения от значительных количеств балластных веществ, в ряде случаев – из-за наличия ингибиторов протеаз [1]. Поэтому перспективным и более экономичным является использование не самого сырья, а продуктов его переработки, в которых повышено относительное содержание протеина за счет существенного уменьшения концентрации крахмала, липидов и антипитательных веществ. В частности, к таким продуктам относятся соевый концентрат и глютен кукурузный.

Соевый концентрат представляет собой очищенный белковый продукт, содержащий 60–62 % сырого протеина. Он получен из обезжиренного соевого шрота, освобожденного от растворимых сахаров в процессе спиртовой экстракции.

Глютен кукурузный – это сыпучий порошок, состоящий из белка кукурузного зерна, отделенного от крахмала, применяется в качестве высокобелковой добавки в кормопроизводстве. Содержит не менее 55–60 % протеина, богатый комплекс микроэлементов, жирно- и водорастворимых витаминов: E, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>. Белок кукурузного глютена отличается высоким содержанием серосодержащих аминокислот – метионина и цистина.

В связи с вышеизложенным, целью нашей работы явилась сравнительная оценка использования в качестве белковой основы питательных сред гидролизатов желатина, сои, соевого концентрата и глютена. В качестве препаратов сравнения использовались гидролизаты кильки, крови крупного рогатого скота (КРС) и рыбной муки.

### Материалы и методы

Для определения биологических показателей моделей питательных сред использовали тест-штаммы бактерий *Shigella flexneri* 1a 8516, *S. sonnei* «S form», *Pseudomonas aeruginosa* 27/99, *Serratia plymuthica* 1, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России.

Для получения гидролизатов использовали: в качестве исходного сырья – желатин (ГОСТ 11293-89, марка П-11), сою (ГОСТ 17109-88), соевый концентрат, глютен кукурузный (ТУ 9189-001-52562523-02), рыбную кормовую муку (ГОСТ 2116-2000), кильку каспийскую свежемороженую, кровь КРС; в качестве фермента – поджелудочную железу (ГОСТ 11285-93). При приготовлении питательных сред использовали агар микробиологический (ГОСТ 17206-96), натрия хлорид (ГОСТ 4233-77), воду дистиллированную (ГОСТ 6709-72). Кильку, кровь КРС и семена сои предварительно измельчали.

Гидролиз сырья вели в течение 24 ч при температуре 37–40 °С, гидромодуле 1:9 (в пересчете на сухое вещество), концентрации поджелудочной железы 50 % от массы сырья и рН, установленном на уровне (8,0±0,2) с помощью 20 % раствора гидроокиси натрия. Через 2 ч от начала ферментации в гидролизную смесь добавляли 1 % хлороформа. С целью очистки и осветления гидролизных смесей проводили их обработку путем кипячения с последующей фильтрацией при рН 4,5–4,7 и 7,8–8,2.

Определение цветности 1 % по содержанию сухих веществ растворов гидролизатов осуществляли в соответствии с ФС 42-3874-99. Определение прозрачности, рН, белка, содержания пептидов, общего азота, аминного азота, хлоридов и прочности студня сред проводили в соответствии с МУК 4.2.2316-08. Сухой остаток в гидролизатах определяли рефрактометрическим методом. Оценку специфической активности моделей питательных сред проводили в соответствии с МУК 4.2.2316-08. Статистическую обработку результатов исследования проводили путем вычисления средней арифметической (M) и стандартной ошибки средней арифметической (m), используя t-критерий Стьюдента. При оценке достоверности различий сравниваемых данных за уровень значимости принимали  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

В процессе работы оценивалась технологичность и ориентировочная стоимость получения гидролизатов, их физико-химические и биологические показатели.

Хранение большинства видов взятого в работу сырья возможно в сухом прохладном помещении при комнатной температуре, за исключением кильки и крови КРС, которые должны храниться в морозильной камере при температуре (–18±2) °С. Специальной подготовки сырья для проведения гидролиза не потребовалось, за исключением кильки и крови КРС, которые были перемолоты на мясорубке, а также семян сои, измельченных на дисмембраторе ДМБ-250.

Гидролизаты, полученные после завершения процесса ферментализации, очистки и осветления, были прозрачны, за исключением гидролизатов сои и глютена, в которых отмечалась едва заметная опалесценция. Физико-химические показатели гидролизатов после обработки представлены в табл. 1.

Сравнительная оценка физико-химических показателей панкреатических гидролизатов

Наименование показателей	Панкреатические гидролизаты						
	кильки	желатина	рыбной муки	крови	сои	соевого концентрата	глутена
Цветность	0,041±0,008	0,029±0,009	0,161±0,005	0,05±0,01	0,073±0,01	0,044±0,008	0,093±0,006
pH	7,51±0,06	7,80±0,04	7,62±0,09	7,50 ±0,05	7,47 ±0,07	7,44±0,05	7,49±0,06
Белок	+	-	+	+	+	+	-
Содержание пептидов, %	49,8±5,3	103,7±6,9	67,6±6,3	71,0±6,07	38,0±3,5	47,7±4,8	38,8±4,1
Содержание общего азота, %	0,742±0,021	1,816 ±0,042	0,908 ±0,038	0,823 ±0,038	0,478 ±0,018	0,580 ±0,012	0,682 ±0,036
Содержание аминного азота, %	0,342±0,018	0,481±0,045	0,316±0,026	0,393±0,024	0,152±0,015	0,228±0,017	0,285±0,021
Амин. N/общ. N	0,46±0,02	0,26±0,02	0,35±0,04	0,48±0,03	0,32±0,03	0,39±0,02	0,42±0,02
Содержание хлоридов (в пересчете на натрия хлорид), %	0,468 ±0,029	1,264 ±0,064	1,060 ±0,060	0,698 ±0,064	0,382 ±0,024	0,490 ±0,032	0,473 ±0,049
Сухой остаток, %	5,53±0,17	11,31±0,87	8,26±0,58	6,63±0,57	4,98±0,39	5,85±0,46	5,74±0,61

Цветность при визуальной оценке уменьшалась от насыщенного светло-коричневого цвета гидролизата рыбной муки до бледно-желтого – гидролизата желатина. Значение pH всех гидролизатов было слабощелочным, и при последующем изготовлении питательных агаров требовалась лишь незначительная коррекция данного показателя. Отсутствие следов белка фиксировалось только в гидролизатах желатина и глутена, в остальных продуктах качественная реакция на белок была положительной, особенно выраженной она была в гидролизатах рыбной муки.

Содержание пептидов было наибольшим в гидролизате желатина (103,7 %) и превышало аналогичный показатель пептона ферментативного по ГОСТ 13805-76, принятый за 100 %. Концентрация пептидов в остальных гидролизатах, полученных из сырья животного происхождения, колебалась в пределах от 49,8 до 71 % и превышала аналогичные показатели растительных пептонов (38,0–47,7 %). Содержание общего и аминного азота в гидролизатах сырья животного происхождения (кильки, желатина, рыбной муки, крови) было выше, чем в гидролизатах растительного сырья. Содержание сухих веществ варьировало от 4,98 (гидролизат сои) до 11,31 % (гидролизат желатина).

Биологические показатели изготовленных ги-

дроллизатов были изучены на модели питательного агара следующего состава: гидролизат из расчета содержания в 1 л среды 12 г сухих веществ; натрия хлорид с учетом вещества, содержавшегося в гидролизате, вводили до содержания его в среде 5 г/л; агар микробиологический добавляли в количестве, обеспечивающим прочность готовой среды (340±40) г., pH агара устанавливали в пределах (7,2±0,1).

После кипячения среды, содержащие гидролизаты сои и глутена, стали опалесцировать, прочие оставались прозрачными. Автоклавирование при температуре 121 °С в течение 20 мин привело к выпадению осадка в средах, содержащих гидролизат глутена. Внешний вид других сред оставался без изменений. Опалесценция агара, содержавшего гидролизат сои и агара, включавшего гидролизат глутена, после перемешивания осадка не превышала 5 единиц по стандартному образцу мутности бактериальных взвесей (ОСО 42-28-86).

Данные о количестве, диаметре и морфологии колоний *S. flexneri* 1a 8516 и *S. sonnei* «S form», пигментообразовании штаммов *P. aeruginosa* 27/99 и *S. plymuthica* 1 через 20 ч инкубации при температуре (37±1) °С, представленные в табл. 2, показывают, что по количеству выросших колоний *Shigella flexneri* 1a 8516 изучаемые среды значимо не отличались

Таблица 2

Сравнительная оценка биологических показателей панкреатических гидролизатов

Тест-штаммы	Наименование показателей	Питательные агары на основе панкреатических гидролизатов						
		кильки	желатина	рыбной муки	крови	сои	соевого концентрата	глутена
<i>S. flexneri</i> 1a 8516	Кол-во колоний из разведения 10 <sup>-6</sup>	53,73±2,07	46,02±3,11	55,1±2,86	52,31±2,46	54,87±1,91	57,04±3,70	56,97±2,97
	Диаметр колоний, мм	1,3–2,5	0,5–1,0	1,2–2,4	1,0–2,0	1,1–2,3	1,2–2,4	1,1–2,0
	Форма колоний	S-колонии	S-колонии	S-колонии	S-колонии	S-колонии	S-колонии	S-колонии
<i>S. sonnei</i> «S form»	Кол-во колоний из разведения 10 <sup>-6</sup>	48,45±1,29	48,48±2,88	49,30±1,73	38,64± 2,82	46,78±1,93	60,78±2,31	57,66±2,48
	Диаметр колоний, мм	2,0–3,0	1,2–2,0	1,5–3,0	1,5–2,5	1,5–3,5	1,5–3,5	1,5–3,0
	Форма колоний	S- и R-колонии	S-колонии	S-колонии	S- и R-колонии	S- и R-колонии	S- и R-колонии	S- и R-колонии
<i>P. aeruginosa</i> 27/99	Окраска газона	Зеленая	Серо-голубая с зеленым оттенком	Серо-коричневая	Сине-зеленая	Серо-коричневая	Серо-коричневая	Серо-коричневая
<i>S. plymuthica</i> 1	Окраска газона	Оранжевая	Красно-оранжевая	Оранжево-красная	Оранжево-красная	Оранжево-желтая	Оранжево-желтая	Оранжево-красная

между собой, за исключением агара, включающего гидролизат желатина, который существенно уступал ( $p < 0,05$ ) средам на основе других гидролизатов, за исключением гидролизата крови. Данный агар уступал остальным и по диаметру выросших колоний обоих видов шигелл. На агаре с гидролизатом крови количество выросших колоний *S. sonnei* «S form» значительно уступало ( $p < 0,05$ ) количеству колоний данного штамма на средах с другими основами, а на агарах с гидролизатами соевого концентрата и глютенна превосходило их ( $p < 0,05$ ).

У отдельных колоний *S. sonnei* «S form», выросших на средах, включавших гидролизаты сои, глютенна, соевого концентрата, крови, кильки, наблюдалась SR-диссоциация (степень диссоциации – 4,1, 2,4, 2,2, 1,2, 0,6 % соответственно). Наиболее выраженной она была на агаре с гидролизатом сои, где отмечалась большая волнистость края и шероховатость поверхности колоний. Штамм *S. plymuthica* 1 на всех изучаемых средах рос с образованием газона насыщенного цвета от красно-оранжевого до оранжево-желтого оттенков различной интенсивности.

Интенсивная сине-зеленая окраска *P. aeruginosa* 27/99 отмечалась на агаре, включавшем гидролизат крови, менее выраженная, с преобладанием зеленых тонов, – на агаре с гидролизатом кильки. На среде с гидролизатом желатина газон *P. aeruginosa* 27/99 был окрашен в слабо насыщенный серо-голубой цвет с зеленым оттенком. На остальных средах в окраске газона *P. aeruginosa* 27/99 преобладали серые тона с зеленовато-желтым оттенком.

Стоимость белкового сырья и поджелудочной железы, необходимых для получения 1 кг сухого вещества ферментализата, исходя из оптовых цен января 2013 г., составила для гидролизата кильки 256,5 руб., желатина – 268, рыбной муки – 191, крови – 173,6, сои – 121,5, соевого концентрата – 189, глютенна – 236.

Полученные данные свидетельствуют об удовлетворительных физико-химических показателях изученных гидролизатов и приготовленных на их основе питательных агаров, кроме питательного агара с гидролизатом глютенна. В последнем случае необходима доработка способа очистки гидролизной массы.

Касаясь оценки специфической активности изучаемых питательных сред, следует отметить, что количество и размер колоний *S. flexneri* 1a 8516 и *S. sonnei* «S form», выросших на агарах с гидролизатами кильки, рыбной муки, соевого концентрата, глютенна и сои были приемлемыми. Использование гидролизатов желатина и крови как единственных источников питательных веществ не может рассматриваться оптимальным из-за малого диаметра формирующихся колоний в первом случае и малого количества вырастающих колоний – во втором. Формирование отдельных атипичных колоний *S. sonnei* «S form» на агарах, включающих гидролизаты сои, глютенна, соевого концентрата, крови и кильки, как свидетельствует практика применения двух последних гидролиза-

тов, не может являться препятствием к их использованию, но должно учитываться при включении этих пептонов в состав питательных сред в зависимости от назначения последних.

Образование пигмента *S. plymuthica* 1 – продигозина наблюдалось на всех исследуемых агарах, однако регламентированное требованиями к питательным агарам, изложенными в МУК 4.2.2316-08, оранжево-красное окрашивание отмечалось на средах с гидролизатами рыбной муки, крови, глютенна и желатина. Применение гидролизатов кильки, сои и соевого концентрата вызывало выработку пигментов оранжевого или оранжево-желтого цвета. Образование сине-зеленого или зеленого пигмента штаммом *P. aeruginosa* 27/99, что соответствует требованиям МУК 4.2.2316-08, выявлялось только на средах с гидролизатами крови, кильки и желатина.

Наиболее технологичными оказались панкреатические гидролизаты желатина, рыбной муки, соевого концентрата. Использование сои, кильки, крови требует размольного оборудования, а двух последних видов сырья – еще и морозильных камер. С экономической точки зрения, в качестве сырья предпочтительнее использовать сою, кровь, соевый концентрат и рыбную муку.

В данной работе мы ограничились рассмотрением некоторых вопросов получения панкреатических гидролизатов, их физико-химических и биологических показателей в отношении штаммов микроорганизмов, применяемых для оценки качества питательного агара. В дальнейших исследованиях нами предполагается изучение биологических показателей вышеупомянутых пептонов в отношении микроорганизмов других таксономических групп.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Султанов З.З., Меджидов Ш.М., Меджидов М.М., Какулина Е.А., Алиев А.З., Перепелица Л.Г., Султанова Э.И. Способ получения гидролизата сои. Патент РФ 2295249, опубл. 20.03.2007 г. Бюл. 8.
2. Компоненты из растительного сырья. HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия). [Электронный ресурс]. URL: <http://www.himedialabs.ru/rm-veg/> (дата обращения 28.06.2013).
3. Merck Microbiology Manual 12th Edition (2005). 688 p.
4. The OXOID MANUAL. 9th Edition. 2006. 624 p.

#### References

1. Sultanov Z.Z., Medzhidov Sh.M., Medzhidov M.M., Kakulina E.A., Aliev A.Z., Perepelitsa L.G., Sultanova E.I. [Method of soy hydrolysate obtainment]. RF Patent 2295249. 20.03.2007. Bull. 8.
2. [Components obtained from phylogenous feedstock]. HiMedia Laboratories Pvt. Limited (India) [Internet]. [Cited 28.06.2013]. Available from: <http://www.himedialabs.ru/rm-veg/>.
3. Merck Microbiology Manual 12th Edition (2005). 688 p.
4. The OXOID MANUAL. 9th Edition. 2006. 624 p.

#### Authors:

Kovtun Yu.S., Kurilova A.A., Taran T.V., Katunina L.S., Churikova N.V. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

#### Об авторах:

Ковтун Ю.С., Курилова А.А., Таран Т.В., Катунина Л.С., Чурикова Н.В. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 09.07.13.

А.В.Комиссаров, А.К.Никифоров, С.Н.Задохин, С.А.Еремин, О.А.Волох, Ю.А.Алешина

## МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ КИНЕТИКИ НАКОПЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ В ХОДЕ ПЕРИОДИЧЕСКОГО ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *VIBRIO CHOLERAЕ* 569В ИНАБА С ЛИМИТАЦИЕЙ ПО УГЛЕРОДНОМУ СУБСТРАТУ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

На основе анализа экспериментальных данных по накоплению биомассы *Vibrio cholerae* 569В Инаба и антигенов, скоростям их роста и выделения, утилизации глюкозы предложена математическая модель кинетики процесса микробиологического синтеза О-антигена и холерного токсина в ходе периодического глубинного культивирования *V. cholerae* 569В Инаба с лимитацией по углеродному субстрату. С помощью программы Mathcad 15.0 вычислены значения коэффициентов дифференциальных уравнений, входящих в математическую модель. В результате сопоставления расчетных и экспериментальных данных установлено, что относительная ошибка определения концентраций синтезируемых веществ, глюкозы и холерного вибриона составляет от 5 до 20 %. Предложенная модель позволяет определять максимальный выход целевых продуктов и уточнять параметры ведения процесса культивирования при различных начальных условиях.

*Ключевые слова:* О-антиген и токсин холерного вибриона, периодическое глубинное культивирование *Vibrio cholerae* 569 Инаба, математическая модель, кинетика.

A.V.Komissarov, A.K.Nikiforov, S.N.Zadokhin, S.A.Eremin, O.A.Volokh, Yu.A.Aleshina

## Mathematical Model of Kinetics of Antigens Accumulation in the Process of Periodical Submerged Cultivation of *Vibrio cholerae* 569B Inaba with Limitation as Regards Carbonic Substrate

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

Presented is mathematical model of kinetics of the process of O-antigen and cholera toxin synthesis during periodical submerged cultivation of *V. cholerae* 569B Inaba with limitation as regards carbonic substrate. The proposed model is based upon analysis of experimental data on *V. cholerae* 569B Inaba biomass and antigens accumulation, rate of growth and antigens release, and glucose utilization. Using Mathcad 15.0 software calculated are coefficients of differential equations entering into the mathematical model. Comparison of predicted and experimental data demonstrates that relative error of determination of concentrations of the synthesized substances, glucose and cholera vibrio is between 5 and 20 %. The proposed model permits to determine maximum output of final products and specify the parameters of cultivation process performance at different initial conditions.

*Key words:* O-antigen and cholera toxin, periodical submerged cultivation of *Vibrio cholerae* 569 Inaba, mathematical model, kinetics.

Нами, в ходе проведения предыдущих исследований [2], была разработана и проверена на адекватность математическая модель кинетики накопления О-антигена, роста холерного вибриона и потребления глюкозы в ходе периодического глубинного культивирования *V. cholerae* М-41 Огава и создана программа для ЭВМ, позволяющая рассчитывать кинетические параметры системы дифференциальных уравнений, описывающих данные процессы, и определять максимальный выход О-антигена при различных начальных условиях [3].

Одними из основных компонентов вакцины холерной химической бивалентной таблетированной, наряду с О-антигеном *V. cholerae* М-41 Огава, являются холероген-анатоксин и О-антиген *V. cholerae* 569В Инаба. Поэтому исследования, направленные на разработку математической модели накопления токсина и О-антигена в ходе периодического глубинного культивирования *V. cholerae* 569 Инаба, имеют под собой определенную практическую базу и являются актуальными.

## Материалы и методы

При выполнении работы использовали производственный штамм *V. cholerae* 569В Инаба – продуцент токсина и О-антигена (Государственная коллекция патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб»), который выращивали при 37 °С в биореакторе на среде из ферментативного гидролизата казеина в условиях глубинного культивирования. Через 10 ч выращивание прекращали добавлением формалина до конечной концентрации 0,6 %. Расчеты коэффициентов дифференциальных уравнений осуществляли с использованием программы Mathcad 15.0.

## Результаты и обсуждение

Математическая модель кинетики периодического процесса глубинного культивирования микроорганизмов формулируется, как правило, исходя из условий идеального смешения в биореакторе. Это означает отсутствие различий по рабочему объему

Таблица 1

Данные по накоплению биомассы, антигенов и утилизации глюкозы

Концентрация в среде, г/л	Время от начала ферментации, ч										
	$t_1=0$	$t_2=1$	$t_3=2$	$t_4=3$	$t_5=4$	$t_6=5$	$t_7=6$	$t_8=7$	$t_9=8$	$t_{10}=9$	$t_{11}=10$
Биомасса ( $X$ )	0,13	0,13	0,8	0,98	1,78	4,14	8,9	11,86	16,32	17,8	17,8
Глюкоза ( $S$ )	0	22	21	20	18	16	14	12	8	4	0
О-антиген ( $P_1$ )	0	0	0	0,032	0,042	0,084	0,168	0,336	0,504	0,672	0,672
Токсин ( $P_2$ )	0	0	0	0,014	0,02	0,04	0,081	0,162	0,283	0,324	0,324

аппарата в концентрациях субстратов, продуктов метаболизма, биомассы микроорганизмов, рН и температуры [1].

Основными лимитирующими факторами процесса аэробного культивирования микроорганизмов, к которым относится и выращивание *V. cholerae* 569В Инаба, являются количество растворенного кислорода и концентрация углеродного субстрата. Нами рассмотрен вариант, когда растворенный кислород находится в избытке, и удельная скорость роста холерного вибриона определяется содержанием в питательной среде глюкозы.

С целью выбора уравнения, описывающего скорость роста *V. cholerae* 569В Инаба при его периодическом глубинном культивировании, были рассмотрены данные по накоплению биомассы, токсина и О-антигена, скоростям их роста и выделения, утилизации глюкозы. Анализ данных, представленных в табл. 1, 2, показывает, что накопление биомассы и выделение продукта метаболизма осуществляется пропорционально потребленному субстрату. Скорость роста биомассы и выделения токсина достигает максимума к 9 ч культивирования, а О-антигена к 8 ч, в дальнейшем происходит их уменьшение. Таким образом, можно сделать вывод, что рост холерного вибриона зависит не только от концентрации субстрата, но и от концентрации продуктов метаболизма, причем их накопление снижает скорость роста микроорганизмов.

Наиболее распространенным уравнением, учитывающим влияние субстрата и продуктов на скорость роста биомассы, является уравнение Моно-Иерусалимского [1]:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S_L}{K_S + S_L} \times \frac{1}{\left(1 + \frac{P}{K_{is}}\right)}. \quad (1)$$

Однако классическое уравнение Моно-Иерусалимского учитывает влияние только одного продукта

биосинтеза. Основываясь на том, что в рассматриваемом случае имеются два продукта, нами предложена следующая модификация уравнения:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S_L}{K_S + S_L} \times \frac{1}{\left(1 + \frac{P_1 + P_2}{K_{is}}\right)}, \quad (2)$$

где  $\mu_{\max}$  – удельная максимальная скорость роста микроорганизмов,  $ч^{-1}$ ;  $S_L$  – текущая концентрация растворенной глюкозы, г/л;  $K_S$  и  $K_{is}$  – кинетические константы, г/л;  $P_1$  – концентрация О-антигена, г/л;  $P_2$  – концентрация токсина, г/л.

Согласно экспериментальным данным, синтез О-антигена и токсина начинается примерно через 3 ч, скорости их накопления ингибируются избытком биомассы и зависит от концентрации глюкозы в процессе производства. Таким образом, удельные скорости производства токсина и О-антигена можно выразить в виде двух систем дифференциальных уравнений:

$$\frac{dP_1}{dt} = \begin{cases} 0, \text{ если } 0 \leq t \leq 3 \\ q_{P1\max} \frac{X^2}{(K_{P1}S + X)} - K_{ip1} \cdot X^2, \text{ если } t \geq 3 \end{cases} \quad (3)$$

$$\frac{dP_2}{dt} = \begin{cases} 0, \text{ если } 0 \leq t \leq 3 \\ q_{P2\max} \frac{X^2}{(K_{P2}S + X)} - K_{ip2} \cdot X^2, \text{ если } t \geq 3. \end{cases}$$

При этом в уравнениях изменения концентраций продуктов во времени выражения

$$q_{P1\max} \frac{X^2}{(K_{P1}S + X)} \text{ и } q_{P2\max} \frac{X^2}{(K_{P2}S + X)}$$

отвечают за зависимость кинетики накопления антигенов от концентрации холерного вибриона и глюкозы, а  $K_{ip1} \cdot X^2$  и  $K_{ip2} \cdot X^2$  – за ингибирование производства

Таблица 2

Данные по скорости роста биомассы и выделения антигенов

Удельная скорость, $ч^{-1}$	Интервалы времени, ч									
	$t_2-t_1$	$t_3-t_2$	$t_4-t_3$	$t_5-t_4$	$t_6-t_5$	$t_7-t_6$	$t_8-t_7$	$t_9-t_8$	$t_{10}-t_9$	$t_{11}-t_{10}$
$\mu = \Delta X / X \Delta t$	0	0,8	0,202	0,58	0,807	0,73	0,285	0,316	0,09	0
$q_{P1} = \Delta P_1 / X \Delta t$	0	0	0,36	0,007	0,014	0,013	0,017	0,005	0,001	0
$q_{P2} = \Delta P_2 / X \Delta t$	0	0	0,016	0,004	0,007	0,006	0,008	0,009	0,002	0

избытком биомассы.

Скорость потребления глюкозы клетками представлена зависимостью:

$$q_s = \frac{\mu \cdot X}{Y_{XS}}, \quad (4)$$

где  $Y_{XS}$  – расходный коэффициент, г/г.

Следовательно, модель кинетики процесса состоит из дифференциальных уравнений, учитывающих изменение концентрации биомассы, концентрации глюкозы в питательной среде и продукта синтеза (антигенов) во времени. Система уравнений представлена следующим образом:

$$\begin{cases} \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \\ \frac{dS}{dt} = -q_s \cdot X \\ \frac{dP_1}{dt} = \begin{cases} 0, \text{ если } 0 \leq t \leq 3 \\ q_{P1max} \frac{X^2}{(K_{P1}S + X)} - K_{ip1} \cdot X^2, \text{ если } t \geq 3 \end{cases} \\ \frac{dP_2}{dt} = \begin{cases} 0, \text{ если } 0 \leq t \leq 3 \\ q_{P2max} \frac{X^2}{(K_{P2}S + X)} - K_{ip2} \cdot X^2, \text{ если } t \geq 3, \end{cases} \end{cases} \quad (5)$$

где  $K_{p1}, K_{ip1}, K_{p2}, K_{ip2}$  – кинетические константы, г/л;  $q_s$  – скорость потребления глюкозы клетками,  $ч^{-1}$ ;  $q_{P1max}, q_{P2max}$  – удельная максимальная скорость образования О-антигена и токсина соответственно,  $ч^{-1}$ ;  $X$  – концентрация биомассы, г/л.

В системе из 3 дифференциальных уравнений (5) для первой стадии процесса можно исключить уравнения, описывающие кинетику накопления токсина и О-антигена, так как отсутствует их синтез.

$$\begin{cases} \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \\ \frac{dS}{dt} = -q_s \cdot X. \end{cases} \quad (6)$$

Также можно предположить, что удельная скорость роста биомассы будет выражаться уравнением Моно:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S_L}{K_S + S_L}. \quad (7)$$

Для определения значения коэффициента  $K_S$  был произведен расчет системы дифференциальных уравнений (6). В качестве начальных условий послужили концентрации биомассы и глюкозы:  $X_0=0,13$  г/л,  $S_0=22,0$  г/л.

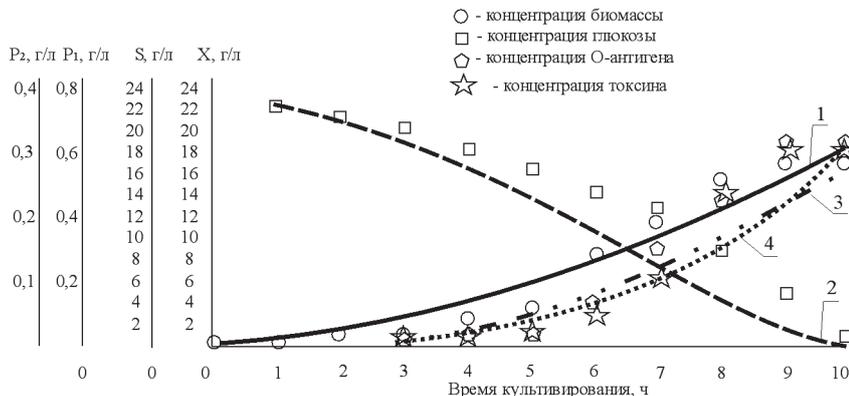
На основе анализа экспериментальных данных и с использованием разработанного программного обеспечения в среде Mathcad 15.0 были получены значения максимальной удельной скорости роста  $\mu_{max}=0,99$   $ч^{-1}$ , параметра  $Y_{XS}=0,824$  г/г и коэффициента  $K_S=0,5$  г/л.

Математическая модель для второй стадии процесса (после 3 ч) представлена тремя дифференциальными уравнениями (5), а скорость роста описывается выражением (2).

В качестве начальных условий послужили конечные концентрации биомассы и глюкозы на первой стадии, а также  $P_{10}=0,032$  г/л,  $P_{20}=0,014$  г/л. Для определения значений коэффициентов  $K_{is}, q_{P1max}, q_{P2max}, K_{p1}, K_{ip1}, K_{p2}, K_{ip2}$  с использованием разработанного программного обеспечения в среде Mathcad 15.0 был произведен расчет системы дифференциальных уравнений (5) и были получены следующие значения:  $K_{p1}=1,7$  г/л,  $K_{p2}=2,2$  г/л,  $K_{ip1}=0,001$  г/л,  $K_{ip2}=0,001$  г/л,  $K_{is}=0,122$ ,  $q_{P1max}=0,007$   $ч^{-1}$  и  $q_{P2max}=0,005$   $ч^{-1}$ .

Результаты моделирования процесса представлены на рисунке.

Был произведен анализ отклонений расчетных значений от экспериментальных. Максимальная относительная ошибка концентраций составила: 5 % для биомассы, 20 % для глюкозы и 15 % для О-антигена и токсина, что является приемлемыми величинами для трудно прогнозируемых биотехнологических процессов. На основании вышеизложенного можно сделать вывод, что предложенная математическая модель приемлема для описания процесса биосинтеза токсина и О-антигена в ходе периодического глутинного культивирования *V. cholerae* 569В Инаба.



Сопоставление экспериментальных значений и данных, полученных в ходе моделирования: 1 – кривая роста холерного вибриона; 2 – динамика потребления глюкозы; 3 – динамика накопления О-антигена; 4 – динамика накопления токсина (расчитанные значения)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии. М.: КолосС; 2004. 296 с.
2. Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Задохин С.П., Еремин С.А., Волох О.А., Алешина Ю.А. Математическая модель кинетики накопления О-антигена в ходе периодического глубинного культивирования *Vibrio cholerae* М-41 Огава с лимитацией по углеродному субстрату. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 1:91–3.
3. Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Задохин С.П., Еремин С.А., Волох О.А., Алешина Ю.А. Программа для расчета концентрации и скорости роста микроорганизмов и продуктов их биосинтеза в зависимости от концентрации субстрата. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ 2012614773 РФ, опубл. 20.09.12 г. Бюл. № 3(80).

## References

1. Biryukov V.V. [The Bases of Industrial Biotechnology]. M.: KolosS; 2004. 296 p.
2. Komissarov A.V., Nikiforov A.K., Zadokhin S.N., Eremin S.A., Volokh O.A., Aleshina Yu.A. [Mathematical model of kinetics of O-antigen accumulation in the process of periodic submerged cultivation of *Vibrio chol-*

*erae* M-41 Ogawa with limitation on carbon substrate]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 1:91–3.

3. Komissarov A.V., Nikiforov A.K., Zadokhin S.N., Eremin S.A., Volokh O.A., Aleshina Yu.A. [Program for calculation of concentrations and growth speed of microorganisms and their biosynthesis products depending on substrate concentration]. RF State registration certificate 2012614773.

## Authors:

*Komissarov A.V., Nikiforov A.K., Zadokhin S.N., Eremin S.A., Volokh O.A., Aleshina Yu.A.* Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

## Об авторах:

*Комиссаров А.В., Никифоров А.К., Задохин С.Н., Еремин С.А., Волох О.А., Алешина Ю.А.* Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 13.09.13.

Т.А.Полунина, Н.П.Гусева, И.А.Кузьмиченко, З.Л.Девдариани, С.П.Заднова, А.В.Степанов, М.Н.Киреев

## НОВЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Предложено два варианта нового метода, оптимизирующего условия получения и очистки ЛПС из штаммов *Y. pestis*, а также позволяющего исключить применение ядовитых и трудноудаляемых реактивов, упростить и удешевить методику, рационально утилизировать отходы производства. Метод включает предварительную водно-солевую экстракцию бактерий для удаления легкорастворимых веществ с последующим разрушением их ультразвуком в лизирующем буфере (0,1 М Трис-НСl, pH 8,0; 10 ммоль ЭДТА, 1 % Тритон X-100). Для депротеинизации неочищенного эндотоксина в первом случае используется коммерческая протеиназа К (Sigma), а во втором – ферментный комплекс протеовибрин, выделенный из отхода производства вакцины холерной бивалентной химической. Для очистки ЛПС от нуклеиновых кислот введена процедура подкисления образца ледяной уксусной кислотой до pH 3,2–3,4. Варианты способа позволяют улучшить качество препаратов ЛПС относительно метода-прототипа и получать эндотоксин возбудителя чумы, практически не отличающийся по физико-химической характеристике, гомогенности, иммунохимической активности и специфичности от антигена, полученного классической водно-фенольной экстракцией по O. Westphal.

*Ключевые слова:* *Yersinia pestis*, липополисахарид, протеовибрин.

T.A.Polunina, N.P.Guseva, I.A.Kuz'michenko, Z.L.Devdariani, S.P.Zadnova, A.V.Stepanov, M.N.Kireev

## New Method of Plague Agent Lipopolysaccharide Obtaining

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

Put forward are two alternatives of a new method for optimization of conditions of LPS obtaining and purification from *Y. pestis* strains; as well as for avoiding application of poisonous and hard-to-remove reagents; for simplification and cost-cutting of the technique; and for rationalization of production waste management. This method involves preliminary salt-water extraction of bacteria, for elimination of easy-dissolving substances, with the subsequent fracturing using ultrasound in lysing buffer (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0; 10 mmol of EDTA, 1 % Triton X-100). The first alternative for deproteinization of non-purified endotoxin is the commercial preparation of proteinase K (Sigma), the second one – an enzyme complex – proteovibrin, isolated from waste material accumulated in the process of cholera chemical bivalent vaccine production. Apart from this, introduced has been a phase of sample acidification by applying glacial acetic acid up to pH 3,2–3,4 to decontaminate LPS from nucleic acids. These two variations of the method provide for enhancement of LPS preparation quality as compared to prototype method, and for obtainment of plague agent endotoxin that is hardly distinguishable in physical-chemical properties, homogeneity, immunochemical activity and specificity from the antigen, manufactured by means of water-phenol extraction following Westphal O. technique.

*Key words:* *Yersinia pestis*, lipopolysaccharide, proteovibrin.

Липополисахарид (ЛПС) *Yersinia pestis*, благодаря своим мощным иммуномодулирующим свойствам, рассматривается как один из перспективных антигенов для создания диагностических и профилактических препаратов. Для выяснения биологических функций, химической структуры и серологической активности необходимо иметь очищенные препараты ЛПС, для чего разработаны и широко используются несколько различных методов и их модификаций, однако все они не лишены недостатков.

Известны способы получения ЛПС грамотрицательных бактерий трихлор-уксусной кислотой, водно-бутанольной и водно-эфирной смесью [2]. Для выделения R-формы ЛПС, к которой относится ЛПС чумного микроба, предложен метод экстракции смесью фенола-хлороформа-петролейного эфира по Galanos [9].

Наибольшую популярность имеет водно-фенольный способ получения ЛПС по O. Westphal

[11], основанный на обработке микробной массы горячей водно-фенольной смесью. Модификациями этого метода является очистка препарата с помощью неионного детергента Тритон X-114 [3], а также удаление нуклеиновых кислот осаждением уксусной кислотой [4]. Однако способы экстракции ЛПС с использованием фенола и других органических веществ в разных вариантах относятся к жестким химическим методам выделения эндотоксина и приводят к изменению исходной молекулярной организации биополимера, нарушая его нативную структуру и биологические свойства. Кроме того, фенол является летучим, агрессивным, ядовитым для человека и экологически вредным веществом.

Также применяются щадящие способы получения ЛПС, к которым относится метод R.P.Darveau [7], где клетки разрушают механически продавливанием через French-press, а ЛПС очищают от примесей обработкой панкреатическими нуклеазами,

проназой, ЭДТА и SDS. В другом методе предложено разрушение бактерий путем кипячения в лизирующем буфере с SDS и меркаптоэтанолом с последующей депротеинизацией материала протеиназой K [10]. Использование детергента SDS в обоих методах существенно усложняет процедуру получения ЛПС, т.к. SDS является трудноудаляемой примесью, снижающей качество получаемых препаратов.

Более простым в исполнении является способ выделения ЛПС кишечной палочки, при котором после лизиса клеток в буфере, содержащем ЭДТА, фенилметил-сульфонилхлорид (ФМСФ) и Тритон X-100, осветленный экстракт депротеинизировали протеиназой K [1]. Однако этот метод не предусматривает очистку от нуклеиновых кислот. Таким образом, отмеченные недостатки служат основанием для поиска новых методов выделения и очистки специфических полисахаридов.

Целью работы явилась разработка оптимального метода получения ЛПС чумного микроба, основанного на упрощении процедуры его выделения и сокращении количества этапов очистки антигена с использованием щадящей обработки материала протеолитическими ферментами разного происхождения.

### Материалы и методы

Препараты ЛПС получали из лиофилизированных клеток штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, выращенных при 28 °С и обеззараженных 0,5 % формалином в течение 12–18 ч по технологии, изложенной в производственном регламенте 01898109-04-04 на «Имуноглобулины диагностические флуоресцирующие псевдотуберкулезные».

При выделении ЛПС использовали протеолитические ферменты – коммерческую протеиназу K (Proteinase K, «Sigma», США) и ферментный комплекс холерного вибриона протеовибрин [7].

Определение химического состава проводили общепринятыми методами: суммарные углеводы – по Дюбуа с тимолом и серной кислотой, белки – по Лоури, нуклеиновые кислоты – по Спирину.

Электрофорез в PAGE-SDS проводили по методу W.K.Laemmli [10]. Нагрузка на гелевую дорожку составляла 10–20 мкл препарата. Для характеристики препаратов в отношении белковых примесей гели обрабатывали Кумасси голубым, для выявления полисахаридов – азотнокислым серебром.

Обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ОФ ВЭЖХ) проводили при комнатной температуре с использованием градиентной системы Breeze на колонке Symmetry 300™ C 18 (5 мкм; 4,6×150 мм; «Waters», США). Для получения хроматографических данных при 254 нм использовали УФ-детектор, скорость элюции – 1 мл/мин.

Имунохимическую активность полученных препаратов изучали в реакции иммунодиффузии в геле по Оухтерлони (РИД) и твердофазным иммуноферментным методом (ТИФА). Для постановки

РИД использовали поликлональные чумные агглютинирующие лошадиные сыворотки (РосНИПЧИ «Микроб») и экспериментальные серии моноклональных IgG к ЛПС *Y. pestis* EV 28 °С, выделенные из асцитической жидкости линейных мышей BALB/c, которые далее метили пероксидазой хрена и использовали в ТИФА. Специфичность препаратов ЛПС чумного микроба определяли с экспериментальными мышинными сыворотками, полученными к штаммам других видов: *Yersinia pseudotuberculosis* Ia; *Francisella tularensis holarctica*; *Escherichia coli* 5198/99; *Salmonella typhimurium* 20.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием t-критерия Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

В качестве прототипа нами был использован достаточно эффективный и простой способ экстракции эндотоксина из кишечной палочки [1]. При попытке применить этот способ на модели возбудителя чумы был получен препарат ЛПС, содержащий большое количество белка и нуклеиновых кислот. Кроме того, использование ингибитора протеаз ФМСФ негативно влияло на внесенный протеолитический фермент, однако отдельные этапы этого метода были включены в дальнейшую разработку.

Предварительно проводили водносолевую экстракцию бактерий для удаления легкорастворимых веществ в течение 18 ч при 4 °С. После центрифугирования осадок суспензировали в лизирующем буфере (0,1 М Трис-НСl, pH 8,0; 10 ммоль ЭДТА, 1 % Тритон X-100) из расчета 5 мл на 1 г влажных клеток. В отличие от описанных выше методов деструкцию клеток проводили обработкой суспензии ультразвуком в дезинтеграторе УЗДН-2Т при частоте излучения 44 кГц и максимальной мощности 5 раз по 1 мин с интервалом 1 мин. После центрифугирования при 16 тыс. об/мин в течение 50 мин при 4 °С к экстракту добавляли протеиназу K до конечной концентрации 80 мкг/мл и инкубировали 60 мин при 56 °С. Очистку ЛПС от нуклеиновых кислот проводили путем подкисления (под контролем pH-метра) полученного образца ледяной уксусной кислотой до pH 3,2–3,4 и центрифугирования при 6 тыс. об/мин в течение 30 мин. ЛПС выделяли путем добавления центрифугата по каплям к 8 объемам охлажденного до 0 °С 96 % этилового спирта, осадок отделяли центрифугированием. От низкомолекулярных примесей ЛПС освобождали с помощью диализа осадка против дистиллированной воды в течение 18–20 ч, затем препараты лиофилизировали.

В предлагаемой процедуре на этапе депротеинизации неочищенного эндотоксина нами установлена возможность замены коммерческой протеиназы K на ферментный комплекс протеовибрин, обладающий высокой протеолитической активностью. Протеовибрин получен из отхода производства

оральной холерной вакцины – ультрафильтрата детоксицированной культуральной жидкости производственного штамма М-41 серовара Огава холерного вибриона при концентрировании О-антигенсодержащего компонента вакцины на ультрафильтрационном аппарате марки УВА-ПС-20-1040.

Лиофилизированный протеовибрин представляет собой хорошо растворимый в воде сыпучий порошок темно-коричневого цвета с содержанием белка (55±7) %. В протеовибрине присутствуют протеолитические ферменты, гидролизующие белки в диапазоне рН 5,6–8,5, с активностью 8.000–20.000 усл. ед. на 1 мг белка.

Предварительно для дозирования протеовибрина определяли его протеолитическую активность параллельно с коммерческой протеиназой К методом титрования на плотной тест-среде с 10 % обезжиренного молока, рН 7,6±0,2 [5]. Анализ трех серий протеовибрина показал, что его активность в 2 раза ниже, чем у протеиназы К. В соответствии с этим протеовибрин добавляли до конечной концентрации в образце 160 мкг/мл и инкубировали при 37 °С, рН 8,0 в течение 18 ч. В остальном этапы этого варианта выделения ЛПС аналогичны описанному выше.

В результате были получены и охарактеризованы препараты ЛПС (по 3 серии каждого), выделенные двумя вариантами предлагаемого способа: с использованием протеиназы К (ЛПС<sub>1</sub>) и ферментного комплекса протеовибрина (ЛПС<sub>2</sub>), а также методом экстракции ЛПС [1], послужившим прототипом (ЛПС<sub>3</sub>). Для сравнения был взят препарат ЛПС возбудителя чумы, полученный классической водно-фенольной экстракцией по О. Westphal (ЛПС<sup>W</sup>).

Все серии препаратов ЛПС, выделенных разными методами, представляли собой хлопья белого цвета, хорошо растворимые в воде и 0,9 % растворе NaCl.

Проведенный сравнительный химический анализ препаратов ЛПС<sub>1</sub>, ЛПС<sub>2</sub>, ЛПС<sub>3</sub> и ЛПС<sup>W</sup> показал сходные характеристики по проценту выхода образцов от сухого веса клеток (3,9±0,2), однако по другим параметрам имелось значительное различие. Так, об-

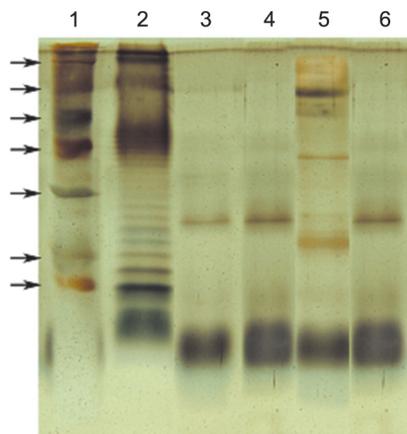


Рис. 1. Электрофореграмма препаратов ЛПС в 12,5 % ПААГ  
Дорожки: 1 – маркеры молекулярной массы 116,0; 66,2; 45,0; 35,0; 25,0; 18,4; 14,4 кДа; 2 – ЛПС *E. coli* 055:B5 (S-форма ЛПС, Sigma, США.); 3 – ЛПС<sub>1</sub>; 4 – ЛПС<sub>2</sub>; 5 – ЛПС<sub>3</sub>; 6 – ЛПС<sup>W</sup>. Окраска азотнокислым серебром

разец ЛПС<sub>3</sub> содержал повышенное количество белка (8,4±0,2) и нуклеиновых кислот (3,2±0,1), препараты ЛПС<sub>1</sub>, ЛПС<sub>2</sub> и ЛПС<sup>W</sup> по проценту содержания белка, углеводов и нуклеиновых кислот имели близкие цифры, которые составляли 1,2±0,4; 38,9±0,2 и 0,3±0,1 соответственно.

Электрофоретическое исследование в PAGE-SDS показало, что препараты ЛПС<sub>1</sub>, ЛПС<sub>2</sub>, ЛПС<sub>3</sub> и ЛПС<sup>W</sup> представлены типичной R-формой, имеют ряд идентичных полос, однако в препарате ЛПС<sub>3</sub> отмечается дополнительная полоса, соответствующая маркеру с молекулярной массой 66,2 кДа, которая окрашивалась на белок Кумасси голубым (рис. 1).

Сравнительный анализ хроматограмм образцов ЛПС<sub>1</sub>, ЛПС<sub>2</sub>, ЛПС<sub>3</sub> и ЛПС<sup>W</sup>, полученных методом ОФ ВЭЖХ, показал, что профили элюции исследованных антигенов относительно идентичны. Отмечается один основной пик высокой амплитуды на 1,2–1,5 мин, который был собран и исследован электрофоретически. Было показано, что во всех случаях в этом пике содержался полисахарид. В препарате ЛПС<sub>3</sub> отмечается два дополнительных пика малой амплитуды на 1,2 и 2,0 мин (рис. 2).

Анализ иммунологической активности показал, что препараты ЛПС<sub>1</sub>, ЛПС<sub>2</sub> и ЛПС<sup>W</sup> в реакции иммунодиффузии с поликлональными чумными агглюти-

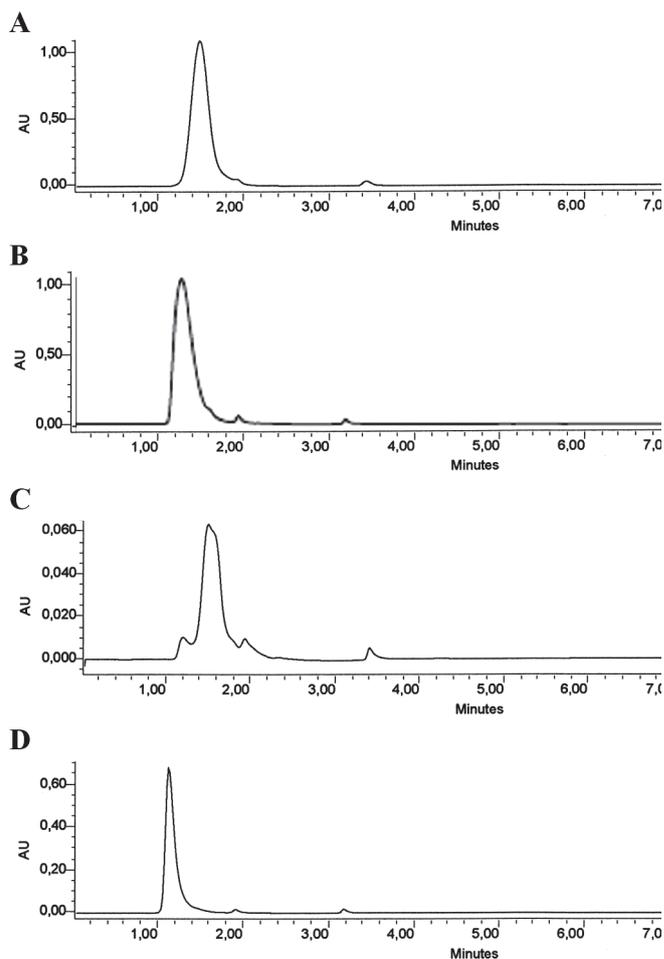


Рис. 2. ОФ ВЭЖХ-анализ патогенов *Y. pestis* EV при 254 нм  
Профили элюции: А – ЛПС<sub>1</sub>; В – ЛПС<sub>2</sub>; С – ЛПС<sub>3</sub>; D – ЛПС<sup>W</sup>

нирующими лошадиными сыворотками и моноклональными IgG к ЛПС *Y. pestis* EV 28 °C давали одну четкую совмещаемую линию преципитации в концентрации 1 мг/мл, что говорит об их серологической гомогенности. Образцы ЛПС<sub>3</sub> в РИД давали более слабую размытую линию преципитации, частично совмещаемую с линиями других образцов. Сравнительное тестирование препаратов ЛПС в ТИФА показало, что иммунологическая активность препаратов ЛПС<sub>1</sub>, ЛПС<sub>2</sub> и ЛПС<sup>W</sup> в 3 раза выше, чем у ЛПС<sub>3</sub> (0,96±0,02) и составляет 0,32±0,03; 0,36±0,15 и (0,26±0,05) мкг/мл соответственно. Специфичность препаратов эндотоксина подтверждена отрицательной реакцией с сыворотками к штаммам других видов.

Таким образом, предложен оптимизированный метод получения и технологичная схема очистки ЛПС чумного микроба, позволяющие исключить использование ядовитых и трудноудаляемых реактивов, упростить и удешевить методику, рационально утилизировать отходы производства. Варианты способа позволяют улучшить качество препаратов ЛПС относительно метода-прототипа и получать эндотоксин возбудителя чумы, практически не отличающийся по физико-химической характеристике, гомогенности, иммунохимической активности и специфичности от антигена, полученного классической водно-фенольной экстракцией по O. Westphal.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бурьгин Г.Л., Матора Л.Ю., Щеголев С.Ю. Способ получения липополисахаридов. Патент РФ 2237719, опубл. 10.10.2004.
2. Захарова И.Я., Косенко Л.В. Методы изучения микробных полисахаридов. Киев: Наукова думка; 1982. 192 с.
3. Марков Е.Ю., Николаев В.Б. Способ получения бактериальных липополисахаридов. Патент РФ 2051969, опубл. 10.01.1996.
4. Махнева З.К., Вишневская Т.А., Прохоренко И.Р. Влияние метода выделения на выход и состав липополисахаридов из фотосинтезирующих бактерий. *Прикладная биохим. и микробиол.* 1996; 32(4):444–7.
5. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Киреев М.Н., Белякова Н.И., Клокова О.Д. Тест-среды для определения активности твиназы, протеазы и фосфолипазы в холерной химической вакцине и ее компонентах. *Пробл. особо опасных инф.* 2002; 1(83):148–53.
6. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Киреев М.Н., Плотников О.П., Грачева И.В., Виноградова Н.А., Солодовников Н.С., Червякова Н.С., Нижегородцев С.А., Антонычева М.В. Способ получения питательной основы и питательная среда для куль-

тивирования микроорганизмов рода *Yersinia* и *Vibrio*. Патент РФ 2360962, опубл. 10.07.2009.

7. Darveau R.P., Hancock R.T.W. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella thyphimurium* strains. *J. Bacteriol.* 1983; 155(2):831–8.
8. Galanos C., Luderitz O., Westphal O. A new method for the extraction of R lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.* 1969; 9:245–9.
9. Laemmli W.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature.* 1970; 227:680–5.
10. Hitchcock P.J., Brown T.M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silverstained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* 1983; 154:269–77.
11. Westphal O., Luderitz O., Bister F. Uber die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Z. Naturforsch. Teil B.* 1952; 7:148–55.

#### References

1. Burygin G.L., Matora L.Yu., Shchegolev S.Yu. [Method of lipopolysaccharide production]. RF Patent 2237719. 10.10.2014.
2. Zakharova I.Ya., Kosenko L.V. [Methods of Microbial Lipopolysaccharide Investigations]. Kiev: Naukova Dumka; 1982. 192 p.
3. Markov E.Yu., Nikolaev V.B. [Method of bacterial lipopolysaccharide production]. RF Patent 2051969. 10.01.1996.
4. Makhneva Z.K., Vishnivetskaya T.A., Prokhorenko I.R. [Impact of the methods applied on the yield and composition of lipopolysaccharides isolated from photosynthetic bacteria]. *Prikladnaya Biokhimiya Mikrobiol.* 1996; 32(4):444–7.
5. Kuz'michenko I.A., Gromova O.V., Dzharipidze M.N., Kireev M.N., Belyakova N.I., Klokov O.D. [Test-media for identification of twnase, protease and phospholipase activity in cholera chemical vaccine and its components]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2002; 1(83):148–53.
6. Kuz'michenko I.A., Gromova O.V., Kireev M.N., Plotnikov O.P., Gracheva I.V., Vinogradova N.A., Solodovnikov N.S., Chervyakova N.S., Nizhegorodtsev S.A., Antonycheva M.V. [Method of nutrient base and nutrient media manufacturing for cultivating microorganisms belonging to *Yersinia* and *Vibrio* species]. RF Patent 2360962.
7. Darveau R.P., Hancock R.T.W. Procedure for isolation of bacterial lipopolysaccharides from both smooth and rough *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella thyphimurium* strains. *J. Bacteriol.* 1983; 155(2):831–8.
8. Galanos C., Luderitz O., Westphal O. A new method for the extraction of R lipopolysaccharide. *Eur. J. Biochem.* 1969; 9:245–9.
9. Laemmli W.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature.* 1970; 227:680–5.
10. Hitchcock P.J., Brown T.M. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silverstained polyacrylamide gels. *J. Bacteriol.* 1983; 154:269–77.
11. Westphal O., Luderitz O., Bister F. Uber die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Z. Naturforsch. Teil B.* 1952; 7:148–55.

#### Authors:

Polunina T.A., Guseva N.P., Kuz'michenko I.A., Devdariani Z.L., Zadnova S.P., Stepanov A.V., Kireev M.N. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Полунина Т.А., Гусева Н.П., Кузьмиченко И.А., Девдариани З.Л., Заднова С.П., Степанов А.В., Киреев М.Н. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 26.09.13.

ПАМЯТИ ЛАРИСЫ ВЕНИАМИНОВНЫ ЛЯПУСТИНОЙ



10 июня 2014 г. ушла из жизни Ляпустина Лариса Вениаминовна – заместитель директора по научно-производственной работе Ставропольского научно-исследовательского противочумного института, заведующая лабораторией подготовки специалистов, доктор медицинских наук, замечательный человек.

Более 30 лет своей жизни Лариса Вениаминовна посвятила научной, преподавательской и организаторской работе в Ставропольском научно-исследовательском противочумном институте. Ларисой Вениаминовной внесен существенный вклад в решение научно-прикладных вопросов профилактики и лабораторной диагностики бруцеллеза в Российской Федерации, создание новых средств диагностики особо опасных инфекций. При ее непосредственном участии разработаны нормативные документы и налажено производство бактериофагов бруцеллезных диагностических, питательной среды для транспортировки биоматериала и накопления бруцелл, эритроцитарного бруцеллезного антигенного диагностикума, иммуноглобулинов диагностических бруцеллезных флуоресцирующих сухих, поли- и моноспецифических диагностических бруцеллезных сывороток.

Много сил и энергии отдавала Лариса Вениаминовна вопросам модернизации научно-производственной базы института, разработки и внедрения в практику здравоохранения диагностических препа-

ратов нового поколения.

Руководя лабораторией подготовки специалистов, Лариса Вениаминовна читала лекции на курсах повышения квалификации в институте, в высших учебных медицинских учреждениях, являлась организатором выездных курсов для подготовки специалистов учреждений Роспотребнадзора Северо-Кавказского и Южного федеральных округов Российской Федерации, пользовалась заслуженным авторитетом слушателей курсов.

Лариса Вениаминовна выполняла большую общественную работу. Много лет она участвовала в работе Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации, была членом проблемной комиссии «Диагностика, профилактика и лечение особо опасных инфекционных болезней».

Ларисой Вениаминовной Ляпустиной опубликовано около 200 научных работ, она соавтор 12 методических документов федерального уровня, 26 авторских свидетельств и патентов на изобретения. За многолетний и добросовестный труд неоднократно поощрялась почетными грамотами и благодарностями Министерства здравоохранения РФ, Роспотребнадзора, дирекции института, награждена знаком «Отличнику здравоохранения Российской Федерации».

Уход из жизни Ларисы Вениаминовны – большая, невосполнимая утрата для всех, кто с ней работал и сотрудничал.

Она была замечательным ученым и педагогом, великодушным, добрым, порядочным и отзывчивым человеком, светлая память о ней навсегда сохранится в сердцах ее друзей, коллег и учеников.