

ЭПИЗОТИЧЕСКИЙ ОЧАГ КОКЛЮША У ОБЕЗЬЯН ВИДА PAPIO GAMADRYAS

А.Ю. Медкова¹, Г.И. Каратаев¹, З.В. Шевцова², А.З. Матуа², Е.Г. Семин¹, А.А. Амичба²,
Л.Н. Синяшина¹, И.Г. Конджария², В.С. Баркая², З.Я. Миквабия², А.Л. Гинцбург¹

¹ Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт экспериментальной патологии и терапии
Академии наук Абхазии, Сухум, Абхазия

Epizootic pertussis focus of hamadryad baboons

A.Yu. Medkova¹, G.I. Karataev¹, Z.V. Shevtsova², A.Z. Matua², E.G. Semin¹, A.A. Amichba², L.N. Sinyashina¹,
I.G. Kondzariya², V.S. Barkaya², Z.Ya. Mikvabia², A.L. Gintsburg¹

¹ Federal Science Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

² Science Research Institute of Experimental Pathology and Therapy of Abkhazian Academy of Sciences, Sukhum, Abkhazia

Резюме

Введение. Изучение патогенеза и иммунитета при коклюше затруднено в связи с отсутствием адекватной экспериментальной модели. Описанный нами ранее экспериментальный коклюш у половозрелых обезьян Старого Света сопровождался развитием характерных клинико-лабораторных признаков коклюша при отсутствии кашля. В процессе отбора обезьян для дальнейшей работы по совершенствованию экспериментальной модели для изучения коклюша у неполовозрелых павианов гамагрилов неожиданно были обнаружены специфические противокклюшные антитела.

Цель. Выявление источника бактерий *B. pertussis* и пути их передачи павианам гамагрилам, а также изучение реакции организма серопозитивных неполовозрелых павианов на вторичный контакт с возбудителем коклюша при экспериментальном заражении.

Результаты. 18 обследованных павианов гамагрилов разного пола, размещённые в двух соседних вольерных клетках, находились в состоянии соматического здоровья. В сыворотке крови всех животных и одного из сотрудников по уходу за животными были выявлены специфические антитела класса IgG и IgM к возбудителю коклюша. Методом ПЦР в режиме реального времени из материала назофарингеальных мазков зарегистрированы единичные геном-эквиваленты *B. pertussis* у рабочего по уходу за животными и трёх павианов гамагрилов в возрасте 7–9 месяцев. Серопозитивные неполовозрелые павианы гамагрилы были экспериментально заражены вирулентными бактериями *B. pertussis* 475. Результаты определения количества геном-эквивалентов *B. pertussis* и относительного количества специфических IgG и IgM у неполовозрелых павианов гамагрилов после экспериментального заражения были сопоставимы с таковыми у взрослых, дважды инфицированных обезьян. Гуморальный иммунный ответ характеризовался бустерным эффектом с быстрой элиминацией возбудителя.

Заключение. Зарегистрирован случай передачи бактерий *B. pertussis* павианам гамагрилам естественным

Abstract

The absence of an adequate experimental animal model makes difficult study of immunity against whooping cough and its pathogenesis. Experimental whooping cough reported by us earlier in pubescent non-human primates of the Old World was accompanied by specific clinical and laboratory marks in the absence of cough. The possibility of pertussis modelling while experimental whooping cough in impuberal hamadryad baboons was investigated. In the process of selection of monkeys for the further studies for perfecting of experimental model for pertussis research unexpectedly were detected specific pertussis antibodies in impuberal hamadryad baboons.

*The aim of the study: revealing of source of infection and transmission of pertussis to hamadryad baboons and investigation of response of antibody-positive impuberal hamadryad baboons to secondary contagion by *B. pertussis* bacteria while experimental infection.*

Results. 18 veterinary checked, somatically healthy hamadryad baboons of various gender managed in two neighboring cages. Specific pertussis IgM and IgG antibodies were found in blood serum of all the animals and one of the monkey keepers. By real-time PCR in nasopharyngeal swabs of the monkey keeper and three 7- and 9-month-old hamadryad baboons were registered single *B. pertussis* genom equivalents. Seropositive impuberal hamadryad baboons were experimentally challenged by virulent *B. pertussis* 475 strain. Quantity of *B. pertussis* genom equivalents and percentage of IgM and IgG antibodies in impuberal hamadryad baboons after experimental infection were detected. These results were comparable with such received after secondary experimental challenge of monkeys by *B. pertussis*. Humoral immune response was characterized by booster effect and rapid *B. pertussis* elimination.

Conclusion. The case of transmission of *B. pertussis* bacteria to hamadryad baboons by natural contagion and epizootic focus of pertussis in apery conditions were registered. In dynamics of immune response and level of bacterial load in experimentally infected impuberal and pubescent hama-

путем и эпизоотический очаг коклюша в условиях питомника. Не выявлено значимых различий в динамике развития иммунного ответа и бактериальной нагрузки у экспериментально инфицированных неполовозрелых и половозрелых павианов гамадрилов. Показана возможность передачи бактерий *B. pertussis* без характерного коклюшного кашля от человека к обезьяне и от обезьяны к обезьяне. Описаны перспективы изучения коклюша на экспериментальной модели обезьян Старого Света.

Ключевые слова: коклюш, бактерии *B. pertussis*, передача возбудителя инфекции, эпизоотия, экспериментальное заражение, обезьяны Старого Света, геном-эквивалент, иммуноглобулины.

Введение

Коклюш — антропонозное инфекционное заболевание, вызываемое бактериями *Bordetella pertussis*, передающееся в естественных условиях воздушно-капельным путем. Индекс контагиозности 70–100%. Современный коклюш отличается разнообразными формами клинического течения. Типичные формы коклюша с пароксизмальным кашлем встречаются все реже. Атипичные формы коклюша протекают без характерных для этого заболевания симптомов и чаще у подростков и взрослых, а также у вакцинированных детей. Ведущую роль в диагностике коклюша занимают лабораторные показатели инфекции. В последние десятилетия достигнуты значительные успехи в изучении патогенеза заболевания и специфической профилактики, однако многие вопросы так и остаются открытыми. Отсутствие адекватной экспериментальной модели коклюша усложняет изучение механизмов и типов иммунного ответа при заболевании и после вакцинации, при персистенции возбудителя и бактерионосительстве. Выживание *B. pertussis* в окружающей среде крайне ограничено. Источником распространения коклюша считаются кашляющие больные. Сведения о распространении *B. pertussis* бессимптомными носителями ограничены. Возбудитель коклюша патогенен для человека, и нет никаких данных о животных — переносчиках возбудителя или резервуаре инфекции. Попытки использования для изучения коклюша лабораторных животных — мышей, морских свинок, крыс, поросят, обезьян — с разным успехом предпринимаются с начала прошлого века [1–5]. На моделях животных невозможно оценить кашель. Наиболее распространенная «мышинная модель» не позволяет экстраполировать результаты экспериментов непосредственно на людей. Для изучения заболеваний человека более близкой и адекватной экспериментальной моделью являются обезьяны [6]. Лабораторно-клиническое изучение показателей экспериментального коклюша описано нами у половозрелых обезьян Старого Света [3]. Интраназальное

*dryad baboons were not revealed significant differences. The possibility of asymptomatic *B. pertussis* transmission from man to monkey and from monkey to man without definitive spasmodic cough was reviewed. Pertussis research perspectives using experimental model of non-human primates of the Old World were marked.*

Key words: pertussis, *Bordetella pertussis* bacteria, natural contagion, transmission of pertussis infection, epizootic focus, experimental challenge, non-human primates of the Old World, genom equivalent, pertussis antibodies.

заражение бактериями *B. pertussis* макак резусов, макак яванских, макак японских и павианов гамадрилов в возрасте от 3 до 5 лет сопровождалось развитием характерных клинико-лабораторных признаков коклюша при отсутствии пароксизмального кашля. Полученные результаты позволили нам использовать обезьян этого возраста в качестве модели экспериментального коклюша для изучения сроков персистенции возбудителя и выработки специфических антител. С целью совершенствования нашей модели было запланировано заражение вирулентными бактериями *B. pertussis* неполовозрелых детенышей павианов гамадрилов, у которых, по аналогии с новорожденными павианами анубис, интратрахеальное инфицирование могло сопровождаться спазматическим кашлем [4]. При фоновом обследовании, проводимом до начала экспериментального заражения, у троих из пяти детенышей павианов гамадрилов, к нашему удивлению, были обнаружены в сыворотке крови специфические антитела к бактериям *B. pertussis*. Серопозитивные детеныши павианов гамадрилов могли быть инфицированы возбудителем коклюша только естественным путем. Возможность естественного заражения коклюшем обезьян была описана у высших человекообразных приматов в открытых вольерах зоопарка в Швеции в 1990 г. [7]. Для подтверждения факта естественного инфицирования обезьян и характеристики очага необходимо было выявить источник возбудителя и изучить распространённость коклюша среди других обезьян. Для этого необходимо было проведение лабораторно-клинического обследования неполовозрелых павианов гамадрилов, их сородичей и соседей по вольерным клеткам, а также рабочих по уходу за животными. Косвенное подтверждение инфицированности бактериями *B. pertussis* серопозитивных павианов гамадрилов было возможно также при изучении ответной реакции организма обезьян на вторичный контакт с возбудителем коклюша после экспериментального заражения. Сопоставление защитной реакции организма обезьян, инфицированных бактериями

B. pertussis естественным и экспериментальным путем, представляет дополнительный интерес для оптимизации модели коклюша.

Цель исследования — выявление источника бактерий *B. pertussis* и пути их передачи павианам гамадрилам, а также изучение реакции организма серопозитивных неполовозрелых павианов на вторичный контакт с возбудителем коклюша после экспериментального заражения.

Материалы и методы

Исследования проводили на базе Сухумского питомника обезьян НИИ экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии. Всего было обследовано 18 павианов гамадрилов в возрасте от 7 месяцев до 18 лет из двух разных семей, проживающих в отдельных соседних вольерных клетках. Кроме того, проведено лабораторно-клиническое обследование и сбор анамнеза у сотрудников питомника, ухаживающих за животными (рабочих по уходу за животными).

Для общей анестезии обезьян применяли Золетил 50/100 мг в концентрации 10 мг/мл (0,03–0,04 мл). Каждому животному проводили премедикацию ксилазингидрохлоридом в дозе 20 мг/мл. Серопозитивным павианам в возрасте 7, 8 и 9 месяцев (идентификационные номера 31033, 31037 и 31040) интратрахеально вводили вирулентные бактерии *B. pertussis* 475 в количестве 10⁹ в 1 мл раствора фосфатного буфера (рН 7,0–7,2).

Лабораторно-клиническое обследование включало: визуальный осмотр носоглотки, измерение температуры тела, определение общего клинического и биохимического анализа крови, идентификацию возбудителя коклюша и определение титра специфических антител.

Материал для выявления колонизации верхних дыхательных путей обезьян бактериями *B. pertussis* и персистенции возбудителя коклюша получали с задней стенки глотки с помощью назофарингеальных тампонов.

Бактериологический посев проводили на селективной среде КУА (казеиново-угольный агар) с добавлением ампицилина 25 мг/мл с идентификацией выросших колоний путем микроскопии после окраски по Граму и в реакции агглютинации со специфическими противокклюшными сыворотками к агглютиногенам 1, 2 и 3 *B. pertussis* («Медгамал» ФГБУ ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России).

Для выделения ДНК смывы с назофарингеальных тампонов центрифугировали 10 мин при 12000 об/мин (центрифуга «Eppendorf», Германия), осадок ресуспендировали в 100 мкл раствора фосфатного буфера. Суспензию обрабатывали раствором гуанидинтиоцианата с последующей

сорбцией ДНК на магнитном сорбенте фирмы «Promega» США [8]. Выявление ДНК бактерий *B. pertussis* проводили методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с помощью разработанной нами тест-системы [8].

Общий анализ крови и содержание глюкозы определяли на анализаторах — Particle Counter Model PCE -21 и Biochem SA (Германия).

Специфические антитела IgG и IgM к коклюшному токсину (КТ) и филаментозному гемагглютинину (ФГА) определяли в реакции ИФА Ridascreen (Германия).

Наблюдение за обезьянами вели круглосуточно в течение 14 дней после заражения с помощью видеорегистратора Datakam (Тайвань) и веб-камеры.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Microsoft Excel 2007 и методов статистического анализа, принятых в биологии и медицине [9]. Для каждого исследуемого параметра определяли среднее значение и стандартное отклонение. Для сравнения величин использовали параметрический t-критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Обследование павианов гамадрилов и обслуживающего персонала для выявления лабораторно-клинических признаков коклюша

На момент обследования три неполовозрелых павиана (31033, 31037 и 31040) и 15 павианов гамадрилов разного возраста и пола — сородичи и соседи по клеткам 3 детенышей — находились в состоянии соматического здоровья. Поведение животных, поедаемость корма, температура тела и общеклинические показатели крови соответствовали норме. Не было зарегистрировано увеличения общего количества лейкоцитов и уровня глюкозы в крови, характерных для начала развития коклюшной инфекции. Клинических признаков и лабораторных показателей коклюша не было выявлено и при амбулаторном обследовании сотрудников питомника. В анамнезе сотрудников на протяжении двух предшествующих обследованию месяцев респираторных инфекций, длительного кашля и контактов с больными коклюшем не было.

В сыворотке крови у всех обследованных обезьян и у одного из рабочих по уходу за животными были выявлены специфические антитела к возбудителю коклюша класса IgG и IgM в разных концентрациях. Максимальное количество IgG было обнаружено у рабочего по уходу за животными и двух павианов гамадрилов: 9-месячного детеныша 31033 и его матери 31835 (табл.).

Относительное количество IgG у остальных животных составляло 0,11–0,30. Максимальное количество IgM обнаружено у обезьян в возрасте 4 и 16 лет (31918 и 31565), находившихся в разных

Результаты лабораторного обследования павианов гамадрила, размещённых в двух клетках, и рабочего по уходу за животными

Клетка	№ обезьяны	Возраст	Относительное значение IgG*	Относительное значение IgM*	ГЭ** в 5 мкл образца
Клетка 1	31565	16 лет	0,55±0,03	0,40±0,02	н. о.
	31835	6 лет	0,81±0,05	0,14±0,02	н. о.
	32038	1 год	0,30±0,02	0,01±0,01	н. о.
	31556	18 лет	0,30±0,02	0,30±0,02	н. о.
	32017	11 лет	0,28±0,02	0,23±0,02	н. о.
	32004	1,8 лет	0,20±0,02	0,23±0,01	н. о.
	32005	1,8 лет	0,13±0,01	0,19±0,01	н. о.
	31961	3 года	0,19±0,01	0,10±0,01	н. о.
	32042	9 мес.	0,22±0,02	0,03±0,01	н. о.
	31952	3 года	0,22±0,01	0,50±0,03	н. о.
	32037	9 мес	0,48±0,02	0,14±0,01	2–3
Клетка 2	31918	4 года	0,15±0,02	0,49±0,02	н. о.
	31959	3 года	0,25±0,02	0,15±0,02	н. о.
	31960	3 года	0,11±0,01	0,14±0,02	н. о.
	31551	3 года	0,27±0,01	0,26±0,03	н. о.
	31919	4 года	0,19±0,02	0,19±0,02	н. о.
	32040	7 мес	0,30±0,02	0,02±0,01	1–2
	32033	9 мес	0,48±0,05	0,14±0,02	2–3
Рабочий по уходу за животными		50 лет	0,91±0,06	0,13±0,01	2–3

*Относительное значение специфических антител к возбудителю коклюша определено из соотношения ОПi/ ОПК + , где ОПi – оптическая плотность i-го образца, ОПК + – оптическая плотность К + (по двум повторам).

ГЭ** в 5 мкл образца количество геном-эквивалентов *B. pertussis* в 5 мкл образца (материалы и методы).

Н.о. – не определяли.

клетках. У других обезьян антитела IgM не выявили. У рабочего по уходу за животными уровень IgM был ниже 11 МЕ/мл, что, по классификации фирм-изготовителя тест-системы, интерпретируется как отрицательный результат.

Для определения уровня специфических иммуноглобулинов в сыворотках крови обезьян нами использованы тест-системы Ridascreen (Германия), предназначенные для анализа сыворотки крови человека. Тестирование этих тест-систем на панели сывороток обезьян макак резусов и павианов гамадрилов показало, что значения оптической плотности (ОП) образцов сыворотки животных, не имевших контакта с возбудителем коклюша, как правило, в несколько раз ниже значений ОП сыворотки человека (К-), входящей в набор. Поэтому, с нашей точки зрения, ОП в тесте ИФА исследуемых образцов больше 0,1 (относительное количество в наших экспериментах больше 0,13) может указывать на контакт животного с возбудителем коклюша. В пользу сделанного допущения указывали результаты исследования сывороток крови от 3 павианов гамадрилов из клетки 2, пере-

саженных за 6,5 месяцев до описанных экспериментов в другие клетки. Значение ОП образцов этих сывороток, измеренные при определении IgG и IgM, так же, как и нескольких десятков протестированных ранее отрицательных сывороток, в 3 и более раз оказались ниже соответствующих значений К-сыворотки человека.

Наличие специфических противокклюшных IgG и IgM у большинства из 15 взрослых павианов гамадрилов, размещённых в тех же клетках, что и серопозитивные неполовозрелые павианы (32033, 32037 и 32040), указывало на их инфицированность возбудителем коклюша. Высокий титр IgG у рабочего по уходу за животными говорил о том, что, вероятнее всего, он и был источником инфекции для начала эпизоотического процесса. Развитие эпизоотического очага наблюдается, как правило, при наличии цепи непрерывной передачи возбудителя, поэтому заражение всех животных от одного рабочего по уходу за животными представляется маловероятным.

Высокий уровень IgG (рис. 1) в сыворотке крови у половозрелых обезьян Старого Света после

повторного экспериментального инфицирования сохранялся до 18 месяцев [3], тогда как после первого заражения количество IgG, как правило, не превышало (10 – 20% К+) через 2 – 3 месяца [3] (рис. 1).

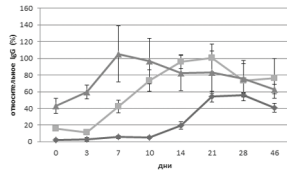


Рис. 1. Динамика изменения относительного количества IgG в сыворотке крови после экспериментальной инфекции половозрелых и неполовозрелых павианов гамадрилов. Ромбы — точки на графике, соответствующие первой экспериментальной инфекции трёх половозрелых павианов гамадрилов вирулентными бактериями *V. pertussis* 475. Квадраты — повторная инфекция половозрелых павианов. Треугольники — экспериментальная интратрахеальная инфекция неполовозрелых павианов гамадрилов. По оси абсцисс — сроки наблюдения (дни), на оси ординат — относительное количество IgG в %, определенное из соотношения $\frac{ОП_i}{ОПК+}$, где ОП_i — средняя по двум измерениям и трём обезьянам оптическая плотность *i*-го образца, ОПК+ — оптическая плотность К+ (по двум измерениям)

Значения специфических иммуноглобулинов IgM у обезьян в наших экспериментах достигали максимума к 7–20-му дню и снижались до близких к фоновому значению к 50-му дню (рис. 2).

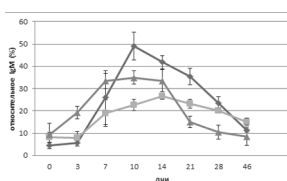


Рис. 2. Динамика изменения относительного количества IgM в сыворотке крови после экспериментальной инфекции половозрелых и неполовозрелых павианов гамадрилов. Ромбы — точки на графике, соответствующие первой экспериментальной инфекции трёх половозрелых павианов гамадрилов вирулентными бактериями *V. pertussis* 475. Квадраты — повторная инфекция половозрелых павианов. Треугольники — экспериментальная интратрахеальная инфекция неполовозрелых павианов гамадрилов. По оси абсцисс — сроки наблюдения (дни), на оси ординат — относительное количество IgM в %, определенное из соотношения $\frac{ОП_i}{ОПК+}$, где ОП_i — средняя по двум измерениям и трём обезьянам оптическая плотность *i*-го образца, ОПК+ — оптическая плотность К+ (по двум измерениям)

По некоторым данным, у людей, перенесших коклюш, сроки выработки защитных антител от начала манифестного периода составляют в среднем 3–5 недель для IgM и IgG соответственно [10, 11], что в пересчёте на возможные сроки заражения составляет 4–5 недель для IgM и 6–7 недель для IgG. Выявленные отличия сроков выработки противокклюшных антител у человека и обезьян могут быть связаны с особенностью использованной лабораторной модели и с большей инфицирующей дозой при экспериментальном заражении животных.

Оценив значения временных параметров динамики накопления специфических иммуноглобулинов, мы провели ориентировочный анализ возможной картины инфицирования обследованных павианов гамадрилов. Обезьяна 31918, имевшая в крови высокий уровень IgM (0,49) и низкий уровень IgG (0,15), могла быть инфицирована позже остальных — менее 30 дней до взятия крови. Обезьяна с высоким уровнем IgG (0,81) и низким уровнем IgM (0,14) была инфицирована, вероятно, ранее 30 дней до обследования, 1,5–2 месяца назад. Таким образом, серопозитивные детеныши павианов гамадрилов 32033, 32037 и 32040 были инфицированы за 2 или более месяцев до контрольного анализа крови. Высокий уровень IgG (0,91) и низкий уровень IgM (0,14) у рабочего по уходу за животными указывал на то, что коклюш в атипичной форме он перенес около 1,5–2 месяцев назад, но, возможно, это случай бактерионосительства при коклюше, встречающегося у взрослых людей и подростков [8].

Методом ПЦР-РВ в 5 мкл образца ДНК у 3 неполовозрелых павианов гамадрилов в возрасте 7, 8 и 9 месяцев и рабочего по уходу за животными также было зарегистрировано несколько копий геном-эквивалентов бактерий *V. pertussis* (см. табл.), что подтвердило присутствие возбудителя коклюша в верхних дыхательных путях обследуемых. Результаты бактериологического посева смывов с назофарингеальных тампонов на селективную среду КУА с кровью были отрицательными.

Реакция организма серопозитивных неполовозрелых павианов гамадрилов на контакт с возбудителем коклюша при экспериментальном заражении

Для экспериментальной инфекции из 18 животных были выбраны три неполовозрелых павиана гамадрила в возрасте 7, 8 и 9 месяцев, у которых при обследовании в носоглотке обнаружили ДНК бактерий *V. pertussis* и в сыворотке крови специфические IgG и IgM антитела к ФГА и КТ *V. pertussis*. Обезьянам интратрахеально инокулировали вирулентные бактерии *V. pertussis* 475. При развитии экспериментального коклюша у обезьян оценивали изменение

визуальных и лабораторных показателей: наличие катаральных явлений, вязкой слизи в верхних дыхательных путях, изменение температуры тела, количества лейкоцитов, уровня глюкозы в крови, выявление бактерий *V. pertussis* в носоглотке (геном-эквивалентов *V. pertussis* в ПЦР-РВ) и уровня специфических IgG и IgM антител. С целью детекции приступов кашля за обезьянами наблюдали круглосуточно с помощью видеорегистратора и веб-камеры.

За время наблюдения не было выявлено внешних признаков нарушения общего состояния здоровья, катаральных явлений в верхних дыхательных путях и образования мокроты, температура тела животных оставалась в обычных для них пределах (37,5–39°C). Не было зарегистрировано кашля. Общее количество лейкоцитов ($6-8 \times 10^3/\text{мкл}$) и глюкозы в периферической крови ($5-6 \text{ ммоль/л}$) не отличалось от значений $6,7 \pm 0,8 \times 10^3/\text{мкл}$ и $5,1 \pm 0,6 \text{ ммоль/л}$ соответственно, наблюдаемых в норме у павианов гамадрилов этого возраста, обитающих в Сухумском питомнике [12].

Результаты определения количества геном-эквивалентов (ГЭ) *V. pertussis* у неполовозрелых и половозрелых павианов гамадрилов представлены на рисунке 3.

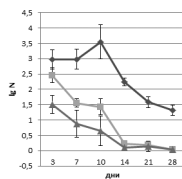


Рис. 3. Динамика изменения количества ГЭ *V. pertussis* 475 после экспериментальной инфекции половозрелых и неполовозрелых павианов гамадрилов. Ромбы — точки на графике, соответствующие первой экспериментальной инфекции трёх половозрелых павианов гамадрилов вирулентными бактериями *V. pertussis* 475. Квадраты — повторная инфекция половозрелых павианов. Треугольники — экспериментальная интранатрахеальная инфекция неполовозрелых павианов гамадрилов. По оси абсцисс — сроки наблюдения (дни), на оси ординат — lg N. N — количество геном-эквивалентов *V. pertussis* в 5 мкл раствора ДНК, выделенной из смывов назофарингеальных тампонов.

При первой экспериментальной инфекции взрослых павианов гамадрилов в течение 7–14 дней наблюдалось размножение бактерий с последующей элиминацией возбудителя в течение 1,5–2 месяцев. Единичные ГЭ регистрировали в носоглотке половозрелых обезьян через 3 месяца и позже [3]. Экспериментальная инфекция серопозитивных павианов гамадрилов развивалась иначе. Размножения бактерий в носоглотке не наблюдали, происходила их полная элиминация к 28-му дню. Кривая колонизации верхних дыхательных путей детёнышей павианов

бактериями *V. pertussis* близка к таковой у взрослых обезьян, дважды зараженных вирулентными бактериями. Несколько меньшее число бактерий *V. pertussis*, регистрируемых в носоглотке молодых павианов гамадрилов на протяжении первых 10 дней, могло быть связано со способом инокуляции (см. рис. 3). Вероятно, при интраназальном введении половозрелым обезьянам в носоглотке адгезируется большее количество бактерий, чем при интранатрахеальном.

При бактериологическом посеве рост коклюшных бактерий на селективной среде наблюдали в течение 2–3 недель (максимум в течение 28 дней) после первого экспериментального инфицирования и 7–10 дней — после второго. Аналогичные результаты были получены нами при обнаружении возбудителя коклюша в лёгких мышей после интраназального заражения [13]. Возможно, это связано с переходом бактерий *V. pertussis* в некультивируемое состояние или с низкой чувствительностью бактериологического метода, которая, по данным разных источников, составляет от 10 до 30% при типичных формах коклюша [11, 14].

С 3-го по 7-й день после повторного инфицирования половозрелых павианов гамадрилов и экспериментально инфицированных серопозитивных неполовозрелых павианов гамадрилов 32033, 32037 и 32040 наблюдали нарастание количества IgG в сыворотках крови (см. рис. 1), достигавших значений, превышающих К+ положительной сыворотки. Количество IgG антител в сыворотках крови однократно инфицированных половозрелых павианов увеличивалось, начиная с 10-го дня и достигало меньших величин, чем при повторном заражении ($p < 0,001$).

Динамика изменения количества IgM антител у взрослых павианов гамадрилов после первого и повторного инфицирования и у экспериментально зараженных вирулентными бактериями *V. pertussis* серопозитивных детёнышей павианов гамадрилов представлены на рисунке 2. В отличие от соответствующих графиков для IgG антител, кривые не имеют выраженных отличий. Не позднее 1,5 месяцев после первого инфицирования наблюдали снижение уровня IgM до значения К-. Следует отметить, что за время наблюдения уровень IgM, в отличие от IgG, не превышал 50% от значений IgM (К+). Пониженный уровень IgM у обезьян, по сравнению с человеком, возможно, связан с недостаточной эффективностью тест-системы Ridascreen (Германия), предназначенной для исследования сывороток человека, а не обезьян.

Динамика изменения количества ГЭ *V. pertussis* и специфических IgG антител у неполовозрелых серопозитивных павианов гамадрилов и взрослых обезьян, дважды инфицированных вирулент-

ными бактериями *B. pertussis*, была качественно идентичной. Значительное отличие измеренных параметров после первого и второго экспериментального заражения выявлено у взрослых обезьян. Повторное инфицирование сопровождалось нарастанием IgG антител и быстрой элиминацией возбудителя. Это позволило нам заключить, что для неполовозрелых павианов гамадрилов экспериментальное заражение бактериями *B. pertussis* было повторным контактом с возбудителем коклюша. Этот вывод подтверждали отсутствие клинических симптомов и изменения лабораторных показателей у серопозитивных детёнышей павианов при инфицировании бактериями *B. pertussis* интактных обезьян.

Следовательно, серопозитивные неполовозрелые павианы гамадрилы 32033, 32037 и 32040 были инфицированы возбудителем коклюша естественным путём, по крайней мере, за 1,5–2 месяца до взятия контрольных (фоновых) анализов крови. Результаты обследования 15 павианов гамадрилов из двух смежных вольерных клеток подтвердили передачу возбудителя коклюша от обезьяны к обезьяне естественным путем, что указывает на возникновение эпизоотического очага.

Независимо от возраста павианов гамадрилов, при естественном пути заражения коклюш, по-видимому, протекал без характерного кашля, поскольку не был замечен сотрудниками питомника. Экспериментальный коклюш у других видов обезьян Старого Света в наших опытах также протекал без кашля [3]. Тем не менее, J.M. Warfel et al. при интратрахеальном заражении *B. pertussis* D420 7–9-месячных павианов анубис, близких родственников павианов гамадрилов, у некоторых из них зарегистрировали характерный для типичных форм коклюша спазматический кашель. Однако у макак резусов, так же, как и в наших экспериментах, выявить кашель им не удалось.

Возможно, микробиота верхних дыхательных путей взрослых павианов гамадрилов, макак резусов, макак яванских и макак японских препятствует развитию кашля при экспериментальном заражении *B. pertussis*. Выживаемость и адгезивность вирулентных бактерий *B. pertussis* в лёгких в зависимости от состава микрофлоры показана на мышинной модели. Обработка мышей антибиотиками широкого спектра действия приводила к снижению заражающей дозы, необходимой для развития экспериментальной инфекции в среднем в 100 раз [15].

Заключение

На момент обследования все обезьяны, обитающие в соседних вольерных клетках Сухумского питомника обезьян НИИ экспериментальной патологии и терапии АНА, находились в состоянии

соматического здоровья и не проявляли признаков заболевания коклюшем. В результате проведенного исследования специфические антитела к возбудителю коклюша были выявлены у большей части павианов гамадрилов. Более детально обследованы три неполовозрелых павиана гамадрила в возрасте 7, 8 и 9 месяцев до и после экспериментального инфицирования вирулентными бактериями *B. pertussis*. Динамика изменения количества ГЭ *B. pertussis* в верхних дыхательных путях неполовозрелых павианов гамадрилов после экспериментального инфицирования, изменение уровня IgG антител в сыворотке крови характеризовались выраженным бустерным эффектом и соответствовали картине, наблюдаемой при двукратном экспериментальном инфицировании взрослых обезьян. Эти результаты, а также отсутствие лабораторных и клинических признаков коклюша после экспериментального заражения неполовозрелых серопозитивных павианов гамадрилов подтвердили факт их естественного заражения коклюшем за 1,5–2 месяца до начала фонового обследования.

Проведенное нами исследование выявило возможность естественного пути передачи бактерий *B. pertussis* павианам гамадрилам от человека, перенесшего коклюш в атипичной форме (без кашля) или (и) являющегося бессимптомным носителем возбудителя инфекции. Заболевание распространялось в процессе передачи бактерий *B. pertussis* от обезьяны к обезьяне, в результате чего значительная часть животных в клетках была инфицирована. Образовался эпизоотический очаг коклюша у павианов гамадрилов. Независимо от возраста обезьян, течение заболевания в результате естественного инфицирования не сопровождалось пароксизмальным кашлем. Таким образом, передача бактерий *B. pertussis* от человека к обезьяне и от обезьяны к обезьяне произошла при отсутствии кашля. Этот факт подтвердил передачу бактерий *B. pertussis* возбудителя коклюша у людей от бактерионосителей и больных коклюшем в атипичных формах. Полученные нами данные позволили предположить, что человек, возможно, не единственный естественный резервуар возбудителя коклюша. Отсутствие отличий в течение экспериментального коклюша у половозрелых и неполовозрелых павианов гамадрилов, инфицированных бактериями *B. pertussis* естественным путем, позволяет использовать для экспериментального моделирования коклюша как неполовозрелых, так и взрослых обезьян Старого Света. Таким образом, экспериментальная модель коклюша у обезьян перспективна для изучения прогностического уровня специфических противокклюшных IgM, IgG и IgA антител, продуцируемых на разных стадиях заболевания, гуморального и клеточного ответа после вакцинации и при персистенции бактерий *B. pertussis* и других параметров

пато- и иммуногенеза, что позволяет формулировать новые подходы к диагностике, лечению и профилактике коклюша.

Благодарности

Работа финансировалась в рамках Госзадания Минздрава России по теме «Организация геномов и механизмы регуляции генов патогенных микроорганизмов» и Государственного контракта № 13411.1008799.13.152 Минпромторга России «Доклинические исследования живой вакцины интраназального применения для профилактики коклюша». Шифр «2.1 Вакцина коклюш 2013» по теме: «Доклинические исследования живой вакцины интраназального применения для профилактики коклюша».

Авторы выражают глубокую признательность за техническую помощь лаборанту-исследователю ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России Г.М. Корольковой и сотрудникам НИИ экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии И.Н. Дочия и С.Ш. Эмир-оглы за помощь в работе с животными, заведующей отделением анестезиологии и реанимации при Республиканской больнице г. Сухум Н.А. Харчилава — за помощь при внутритрахеальном заражении обезьян.

Литература

1. Elahi S, Holmstrom J, Gerdt V. The benefits of using diverse animal models for studying pertussis. *Trends Microbiol.* 2007, 15(10):462-8.
2. Gerdt V. *J. Infect. Dis.* Mouse and pig models for studies of natural and vaccine-induced immunity to *Bordetella pertussis*. 2014, 1; 209 Suppl 1:S16-9.
3. Кубрава, Д.Т. Экспериментальный коклюш у обезьян / Д.Т. Кубрава [и др.] // Вестник РАМН. — 2013. — Вып. 8. — С. 4–8.
4. Warfel JM, Beren J, Kelly VK, Lee G, Merkel TJ. Nonhuman primate model of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 2012, 80(4):1530-6.
5. Warfel JM, Beren J, Merkel TJ. Airborne transmission of *Bordetella pertussis*. *J. Infect. Dis.* 2012; 206(6): 902-6.
6. Моделирование инфекционных заболеваний человека на лабораторных приматах / Б.А. Лапин [и др.]. — Сочи: Изд-во ООО «Стерх», 2011. — 225 с.
7. Gustavsson OE, Röken BO, Serrander R. An epizootic of whooping cough among chimpanzees in a zoo. *Folia Primatol (Basel).* 1990; 55(1):45-50.
8. Медкова, А.Ю. Выявление инсерционных авирулентных bvg- мутантов *Bordetella pertussis* у больных коклюшем, острой респираторной вирусной инфекцией и практически здоровых людей / А.Ю. Медкова [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2010. — № 4. — С. 9–13.
9. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. — М.: Практика, 1999. — 459 с.
10. Зайцев, Е.М. Изотипы противокклюшных антител у больных коклюшем на разных сроках заболевания / Е.М. Зайцев [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2011. — № 3. — С. 53–56.
11. Бабаченко, И.В. Коклюш у детей / И.В. Бабаченко. — М.: Комментарии, 2014. — 176 с.
12. Матуа, А.З. Сравнительно возрастные аспекты иммунного статуса низших обезьян (макак резусов и павианов гамадрилов) : дис. ... к-та биол. наук / А.З. Матуа. — СПб., 2010. — 18 с.
13. Медкова, А.Ю. Накопление авирулентных инсерционных Bvg- мутантов *Bordetella pertussis* при экспериментальной инфекции лабораторных мышей / А.Ю. Медкова [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2013. — № 4. — С. 22–25.
14. Vestreheim DF, Steinbakk M, Bjørnstad ML, et al. Recovery of *Bordetella pertussis* from PCR-positive nasopharyngeal samples is dependent on bacterial load. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(12):4114-15.
15. Weyrich LS, Feaga HA, Park J, et al. Resident microbiota affect *Bordetella pertussis* infectious dose and host specificity. *J. Infect Dis.* 2014; 209(6):913-21.

References

1. Elahi S, Holmstrom J, Gerdt V. The benefits of using diverse animal models for studying pertussis. *Trends Microbiol.* 2007, 15(10):462-8.
2. Gerdt V. *J. Infect. Dis.* Mouse and pig models for studies of natural and vaccine-induced immunity to *Bordetella pertussis*. 2014, Apr 1;209 Suppl 1:S16-9.
3. Kubrava D.T., Medkova A.Yu., Sinyashina L.N., Shevtsova Z.V., et al. Jeksperimental'nyj kokljush u obez'jan. *Vestnik Rossijskoj Akademii medicinskih nauk.* 2013; 8:28-33 (in Russian).
4. Warfel J.M., Beren J., Kelly V.K., Lee G., et al. Nonhuman primate model of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.* 2012, vol.80, no.4. pp.1530-1536.
5. Warfel J.M., Beren J., Merkel T.J. Airborne transmission of *Bordetella pertussis*. *J. Infect. Dis.* 2012, vol. 206, no.6, pp. 902-906.
6. Lapin B.A., Dzhikidze Je.K., Shevcova Z.V., Stasilevich Z.K. Modelirovanie infekcionnyh zabojevanij cheloveka na laboratornyh primatah: Sochi; 2011 (in Russian).
7. Gustavsson O.E., Röken B.O., Serrander R. An epizootic of whooping cough among chimpanzees in a zoo. *Folia Primatol (Basel).* 1990, vol.55, no.1, pp. 45-50.
8. Medkova A.Yu., Alyapkina Yu.S., Sinyashina L.N., Amelina I.P., et al. Vyjavlenie insercionnyh avirulentnyh bvg- mntanov *Bordetella pertussis* u bol'nyh kokljushem, ostroj respiratornoj virusnoj infekciej i prakticheski zdorovyh ljudej. *Children infections.* 2010; 4:19-22 (in Russian).
9. Glantz S.A. // *Mediko-biologicheskaja statistika — Moscow: Praktika, 1999/ 459 C.* (in Russian).
10. Zaytsev E.M., Krasnoproshina L.I., Mazurova I.K., Petrova M.S., et al. // *Izotypy protivokokljushnyh antitel u bol'nyh kokljushem na raznyh srokah zabojevanija.* *J. Microbiol. Epidemiol. Immunol.* 2011 no. 3. pp. 53-56. (in Russian).
11. Babachenco I.V. *Kokljush u detej.* Moscow; 2014 (in Russian).
12. Matua A.Z. Sravnitel'no vozrastnye aspekty immunnogo statusa nizshih obez'jan (makak rezusov i pavianov gamadrilov). *Avt. Ref. Diss. Saint-Petersburg,* 2010. 18 p (in Russian).
13. Medkova A.Ju., Sinjashina L.N., Rumjanceva Ju.P., Voronina O.L., et al. Nakoplenie avirulentnyh insercionnyh Bvg- mntanov *Bordetella pertussis* pri jeksperimental'noj infekcii laboratornyh myshej. *Molekuljarnaja genetika, mikrobiologija i virusologija.* 2013; 4:22-26 (in Russian).
14. Vestreheim D.F., Steinbakk M., Bjørnstad M.L., Moghadam A., et al. Recovery of *Bordetella pertussis* from PCR-positive nasopharyngeal samples is dependent on bacterial load. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(12):4114-15.
15. Weyrich L.S., Feaga H.A., Park J., Muse S.J., et al. *J. Infect Dis.* Resident microbiota affect *Bordetella pertussis* infectious dose and host specificity. 2014; 209(6):913-21.

Авторский коллектив:

Медкова Алиса Юрьевна — научный сотрудник Федерального научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, к.м.н.; тел.: 8(499)193-61-90, e-mail: baburida@yandex.ru

Каратаев Геннадий Иванович — ведущий научный сотрудник Федерального научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, руководитель лаборатории генетики бактерий, д.б.н.; тел.: 8(499)193-61-90, e-mail: karataevgi@rambler.ru

Шевцова Зинаида Всеволодовна — заведующая лабораторией иммунологии и вирусологии Научно-исследовательского института экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии, д.м.н., профессор, академик РАЕН; тел.: +7-840-226-77-52, e-mail: niiepit@rambler.ru

Матуа Алиса Зауровна — старший научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии Научно-исследовательского института экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии, к.б.н., доцент; тел./факс: +7-840-226-77-52, +7-840-226-45-17, e-mail: azmatua76@mail.ru

Семи́н Евгений Григорьевич — младший научный сотрудник лаборатории генетики бактерий Федерального научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи; тел.: 8(499)193-61-90, e-mail: recitar@mail.ru

Ами́чба Астанда Арнольдовна — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии и лаборатории экспериментальной гематологии Научно-исследовательского института экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии; тел.: +7-840-226-77-52, +7-840-226-77-52, e-mail: niiepit@rambler.ru

Синяшина Людмила Николаевна — старший научный сотрудник Федерального научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, к.м.н.; тел.: 8(499)193-61-90, e-mail: karataevgi@rambler.ru

Конджария Ирина Георгиевна — старший научный сотрудник лаборатории иммунологии и вирусологии Научно-исследовательского института экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии, к.б.н., доцент; тел.: +7-840-226-77-52, +7-840-226-77-52, e-mail: niiepit@rambler.ru

Баркая Владимир Спиридонович — заместитель директора по науке, заведующий отделом патофизиологии Научно-исследовательского института экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии, профессор, член-корреспондент РАЕН, тел.: +7-840-226-77-52, e-mail: niiepit@rambler.ru

Миква́бия Зураб Ясонович — директор Научно-исследовательского института экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии, д.м.н., член-корреспондент РАЕН; тел.: +7-940-777-24-66, e-mail: niiepit@rambler.ru

Гинцбург Александр Леонидович — директор Федерального научно-исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, д.б.н., профессор, академик РАН; тел.: +7(499)193-61-90, e-mail: www.gamaleya.ru