

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 4

2016

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
В.П.Топорков, докт. мед. наук, профессор
С.А.Щербакова, докт. биол. наук
Т.Н.Щуковская, докт. мед. наук, профессор

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

С.В.Балахонов, докт. мед. наук, профессор (Иркутск)
В.Е.Безмертный, канд. мед. наук (Москва)
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, академик РАН (Оболensk)
А.Н.Куличенко, докт. мед. наук, член-корр. РАН (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)
А.В.Топорков, докт. мед. наук (Волгоград)

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», 2016

2016, Issue 4

Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [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 V.P., Doctor of Medical Science, Professor
Shcherbakova S.A., Doctor of Biological Science
Shchukovskaya T.N., Doctor of Medical Science, Professor

Editorial Council

Balakhonov S.V., Doctor of Medical Science, Professor (Irkutsk)
Bezsmertny V.E., Candidate of Medical Science (Moscow)
Bondarev V.P., Doctor of Medical Science, Professor (Moscow)
Borisevich S.V., Doctor of Biological Science, Professor (Sergiev Possad)
Gintsburg A.L., Doctor of Medical Science, Member of the RAS (Moscow)
Dyatlov I.A., Doctor of Medical Science, Member of the RAS (Obolensk)
Kulichenko A.N., Doctor of Medical Science, Corresponding
Member of the RAS (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)
Toporkov A.V., Doctor of Medical Science (Volgograd)

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. 2016. Вып. 4. 1–106

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

Подписано в печать 14.12.16. Формат 60×88 1/8. Бумага мелованная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 12,9. Гарнитура Таймс. Заказ 1299
Журнал отпечатан в типографии ООО «ИППОЛиТ-XXI век». 410012, Саратов, Б. Казачья, 79/85

Попова А.Ю., Кутырев В.В., Балахонов С.В., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Щучинов Л.В., Попов Н.В., Косилко С.А., Дубровина В.И., Корзун В.М., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Денисов А.В., Рождественский Е.Н., Бугоркова С.А., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Топорков В.П., Слудский А.А., Раздорский А.С., Матросов А.Н., Поршаков А.М., Лопатин А.А., Щербакова С.А. Координация мероприятий противочумных учреждений Роспотребнадзора по оздоровлению Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы в 2016 г.

5

Эпидемиология

Базарова Г.Х., Дугаржапова З.Ф., Мищенко А.И., Лукьяненко Н.В., Шевченко В.В. Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по сибирской язве в Алтайском крае и Республике Алтай (1985–2015 гг.)

11

Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Манин Е.А., Прислегина Д.А., Таран Т.В., Дубянский В.М., Шапошникова Л.И., Волюнкина А.С., Лисицкая Я.В., Котенёв Е.С., Грижебовский Г.М., Куличенко А.Н. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням на территории Северо-Кавказского федерального округа в 2015 г.

15

Козлова Т.В., Игнаткина А.С., Дорофеев Э.М., Попов В.П., Орлов Д.С. Распространение, численность и эпизоотологическое значение клеща *Dermacentor reticulatus* на территории Тульской области.

20

Матросов А.Н., Щучинов Л.В., Денисов А.В., Мищенко А.И., Рождественский Е.Н., Слудский А.А., Раздорский А.С., Михайлов Е.П., Шарова И.Н., Поршаков А.М., Кузнецов А.А., Попов Н.В., Чипанин Е.В., Корзун В.М., Токмакова Е.Г., Балахонов С.В., Щербакова С.А., Макин А.А., Архипов Г.С., Кутырев В.В. Неспецифическая профилактика чумы в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2016 г.

25

Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Водопьянов А.С., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Чемисова О.С., Кругликов В.Д., Титова С.В. Ретроспективный молекулярно-эпидемиологический анализ эпидемии холеры в Республике Дагестан в 1994 г.

33

Попова А.Ю., Демина Ю.В., Ежлова Е.Б., Куличенко А.Н., Рязанова А.Г., Малеев В.В., Плоскирева А.А., Дятлов И.А., Тимофеев В.С., Нечепуренко Л.А., Харьков В.В. Вспышка сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 году, эпидемиологические особенности ...

42

Шамсутдинов А.Ф., Тюрин Ю.А., Пяташина М.А., Борисова Л.О., Трифонов В.А., Бойко В.А., Решетникова И.Д., Исаева Г.Ш., Васильева Е.Г. Природная очаговость иксодового клещевого боррелиоза, гранулоцитарного анаплазмоза и моноцитарного эрлихиоза человека в Республике Татарстан

47

Микробиология

Балахонов С.В., Ярыгина М.Б., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Витязева С.А., Остык А.С., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Денисов А.В., Косилко С.А., Корзун В.М. Случай заболевания человека чумой в Кош-Агачском районе Республики Алтай в 2015 г. Сообщение 2. Микробиологическая и молекулярно-генетическая характеристика изолированных штаммов

51

Popova A.Yu., Kuttyrev V.V., Balakhonov S.V., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakskina N.D., Shchuchinov L.V., Popov N.V., Kosilko S.A., Dubrovina V.I., Korzun V.M., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., Rozhdestvensky E.N., Bugorkova S.A., Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Toporkov V.P., Sludsky A.A., Razdorsky A.S., Matrosov A.N., Porshakov A.M., Lopatin A.A., Shcherbakova S.A. Coordination of Measures of Plague Control Institutions, Aimed at Rehabilitation and Sanitation of Gorno-Altai High-Mountain Natural Plague Focus in 2016

Epidemiology

Bazarova G.Kh., Dugarzhapova Z.F., Mishchenko A.I., Luk'yanenko N.V., Shevchenko V.V. Epizootiological-Epidemiological Situation on Anthrax in the Altai Territory and the Republic of Altai (1985–2015)

Vasilenko N.F., Maletskaya O.V., Manin E.A., Prislegina D.A., Taran T.V., Dubyansky V.M., Shaposhnikova L.I., Volynkina A.S., Lisitskaya Ya.V., Kotenev E.S., Grizhebovsky G.M., Kulichenko A.N. Epidemiological Situation on Natural Focal Infectious Diseases in the Territory of the North-Caucasian Federal District in 2015

Kozlova T.V., Ignat'kova A.S., Dorofeev E.M., Popov V.P., Orlov D.S. Dissemination, Abundance Rates and Epizootiological Significance of the Tick *Dermacentor reticulatus* in the Territory of the Tula Region

Matrosov A.N., Shchuchinov L.V., Denisov A.V., Mishchenko A.I., Rozhdestvensky E.N., Sludsky A.A., Razdorsky A.S., Mikhailov E.P., Sharova I.N., Porshakov A.M., Kuznetsov A.A., Popov N.V., Chipanin E.V., Korzun V.M., Tokmakova E.G., Balakhonov S.V., Shcherbakova S.A., Makin A.A., Arkhipov G.S., Kuttyrev V.V. Non-Specific Prophylaxis of Plague in the Gorno-Altai High-Mountain Natural Focus in 2016

Onishchenko G.G., Moskvitina E.A., Vodop'janov A.S., Monakhova E.V., Pisanov R.V., Vodop'janov S.O., Chemisova O.S., Kruglikov V.D., Titova S.V. Retrospective Molecular-Epidemiological Analysis of Cholera Epidemic in the Republic of Dagestan in 1994

Popova A.Yu., Demina Yu.V., Ezhlova E.B., Kulichenko A.N., Ryazanova A.G., Maleev V.V., Ploskireva A.A., Dyatlov I.A., Timofeev V.S., Nечepurenko L.A., Khar'kov V.V. Outbreak of Anthrax in the Yamalo-Nenets Autonomous District in 2016, Epidemiological Peculiarities

Shamsutdinov A.F., Tyurin Yu.A., Patyashina M.A., Borisova L.O., Trifonov V.A., Boiko V.A., Reshetnikova I.D., Isaeva G.Sh., Vasil'eva E.G. Natural Focality of Lyme Borreliosis, Granulocytic Anaplasmosis, and Monocytic Ehrlichiosis in Humans in the Republic of Tatarstan

Microbiology

Balakhonov S.V., Yarygina M.B., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Vityazeva S.A., Ostyak A.S., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., Kosilko S.A., Korzun V.M. A Case of Human Plague in Kosh-Agach Region of the Republic of Altai in 2015. Communication 2. Microbiological and Molecular-Genetic Characteristics of the Isolated Strains

Лемасова Л.В., Ткаченко Г.А., Савченко С.С., Бондарева О.С., Антонов В.А. Разработка мультиплексной тест-системы для обнаружения и дифференциации <i>Burkholderia mallei</i> и <i>Burkholderia pseudomallei</i> методом ПЦР в режиме реального времени	56
Максютов Р.А. Комплексный подход к видоспецифичной детекции вируса оспы коров.....	60
Никитина А.В., Помелова В.Г., Быченкова Т.А., Парамонов Д.В., Кострюкова Т.С., Осин Н.С. Иммуночипы для одновременного обнаружения пяти ботулотоксинов методом фосфоресцентного анализа (ФОСФАН).....	64
Осина Н.А., Касьян Ж.А., Касьян И.А., Ляшова О.Ю., Осин А.В. Определение видовой принадлежности штаммов бруцелл из фонда Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» с помощью амплификационных и рестрикционных технологий	69
Плеханов Н.А., Заднова С.П. Структурно-функциональный анализ генов, кодирующих биосинтез мано-чувствительных гемагглютинирующих пилей адгезии у различных штаммов <i>Vibrio cholerae</i> биовара Эль Тор.....	75
Сеничкина А.М., Осина Н.А., Абдрашитова А.С., Германчук В.Г. Определение диагностической эффективности ПЦР с использованием наборов реагентов «Ген <i>Francisella tularensis</i> - РЭФ» и «Ген <i>Francisella tularensis</i> - РГФ» при исследовании биологического материала от животных с экспериментальной туляремией	79
Сутягин В.В., Мекка-Меченко Т.В., Когай О.В., Бердибеков А.Т. Длительность сохранения генов чумного микроба (<i>Yersinia pestis</i>) в костных останках млекопитающих	85
Челдышова Н.Б., Крицкий А.А., Лозовский Ю.В., Гусева Н.П. Сравнительный MLVA-анализ штаммов <i>Vibrio cholerae</i> классического биовара, выделенных в России и за рубежом.....	88

Биотехнология, иммунология

Ковтун Ю.С., Курилова А.А., Катунина Л.С., Василенко Е.И. Сравнительная оценка белковых гидролизатов при разработке на их основе питательной среды для культивирования бруцелл.....	93
Михайлов Л.М., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Баранникова Н.Л., Токарева Л.Е., Ястремская К.Ю., Балахонов С.В. Получение гипериммунных сывороток к термоэкстрактам из бруцелл в S- и L-формах.....	98

Краткие сообщения

Костюкова Т.А., Ляпин М.Н., Морозов К.М. Алгоритм ликвидации аварии при работе с патогенными биологическими агентами в боксах микробиологической безопасности	102
---	-----

Юбилей

К 100-летию Масгута Айкимбаевича Айкимбаева	105
К 60-летию Сергея Владимировича Балахонова	105

Информация

Lemasova L.V., Tkachenko G.A., Savchenko S.S., Bondareva O.S., Antonov V.A. Development of Real-Time Multiplex PCR Assay for the Detection and Differentiation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*

Maksyutov R.A. Complex Approach to Species-Specific Detection of Cowpox Virus

Nikitina A.V., Pomelova V.G., Bychenkova T.A., Paramonov D.V., Kostryukova T.S., Osin N.S. Microarray Immunoassay Tests for Simultaneous Detection of Five Botulinum Toxins by Phosphorescence Analysis (PHOSPHAN)

Osina N.A., Kas'yan Zh.A., Kas'yan I.A., Lyashova O.Yu., Osin A.V. Determination of Specific Appurtenance of Brucella Strains Stored in the State Collection of Pathogenic Bacteria "Microbe", Using Amplification and Restriction Techniques

Plekhanov N.A., Zadnova S.P. Structural-Functional Analysis of the Genes, Encoding Biosynthesis of Mannose-Sensitive Hemagglutinating Pili of Adhesion in Different *Vibrio cholerae* El Tor Strains

Senichkina A.M., Osina N.A., Abdrashitova A.S., Germanchuk V.G. Assessment of Diagnostic Efficiency of PCR Kits «Gen *Francisella tularensis* - REF» and «Gen *Francisella tularensis* - RGF» when Analyzing Biological Samples from Animals with Experimental Tularemia

Sutyagin V.V., Mekka-Mechenko T.V., Kogay O.V., Berdibekov A.T. Duration of Conservation of Plague Microbe (*Yersinia pestis*) Genes in Mammalian Bone Remains

Cheldyshova N.B., Kritsky A.A., Lozovsky Yu.V., Guseva N.P. Comparative MLVA-Analysis of *Vibrio cholerae* Strains of Classical Biovar, Isolated in the Russian Federation and Abroad

Biotechnology, Immunology

Kovtun Yu.S., Kurilova A.A., Katunina L.S., Vasilenko E.I. Comparative Evaluation of Protein Hydrolysates in the Process of Constructing Based on Them Nutrient Medium for Brucella Cultivating

Mikhailov L.M., Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Barannikova N.L., Tokareva L.E., Yastremskaya K.Yu., Balakhonov S.V. Preparation of Hyperimmune Sera to Thermoextracts of Brucella S- and L-Forms

Brief Communication

Kostyukova T.A., Lyapin M.N., Morozov K.M. Algorithm of Emergency Elimination when Working inside Bio-Safety Cabinets with Pathogenic Biological Agents

Anniversaries

To the 100-th Anniversary of Masgut A. Aykimbaev
To the 60-th Anniversary of Sergey V. Balakhonov

Information

А.Ю.Попова^{1,2}, В.В.Кутырев³, С.В.Балахонов⁴, Е.Б.Ежлова¹, Ю.В.Демина¹, Н.Д.Пакскина¹,
Л.В.Щучинов⁵, Н.В.Попов³, С.А.Косилко⁴, В.И.Дубровина⁴, В.М.Корзун⁴, Е.П.Михайлов⁶,
А.И.Мищенко⁶, А.В.Денисов⁶, Е.Н.Рождественский⁶, С.А.Бугоркова³, Г.А.Ерошенко³, Я.М.Краснов³,
В.П.Топорков³, А.А.Слудский³, А.С.Раздорский³, А.Н.Матросов³, А.М.Поршаков³, А.А.Лопатин³,
С.А.Щербакова³

КООРДИНАЦИЯ МЕРОПРИЯТИЙ ПРОТИВОЧУМНЫХ УЧРЕЖДЕНИЙ РОСПОТРЕБНАДЗОРА ПО ОЗДОРОВЛЕНИЮ ГОРНО-АЛТАЙСКОГО ВЫСОКОГОРНОГО ПРИРОДНОГО ОЧАГА ЧУМЫ В 2016 г.

¹Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Российская Федерация; ²Российская медицинская академия последилового образования, Москва, Российская Федерация;
³ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; ⁴ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российская Федерация; ⁵Управление Роспотребнадзора по Республике Алтай, Горно-Алтайск, Российская Федерация; ⁶ФКУЗ «Алтайская противочумная станция», Горно-Алтайск, Российская Федерация

Цель работы – обобщение результатов профилактических (противоэпидемических) мероприятий связанных с ликвидацией эпидемического очага чумы в Кош-Агачском районе Республики Алтай в 2016 г. **Материалы и методы.** Использованы данные отчетной и первичной документации ФКУЗ «Алтайская противочумная станция, Управления Роспотребнадзора по Республике Алтай», ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб», ФКУЗ «Иркутский НИПЧИ». **Результаты и выводы.** Отмечено, что выполненный в 2016 г. комплекс организационных, противоэпидемических, санитарно-профилактических противочумных мероприятий является важным этапом оздоровления Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы, конечной целью которого является предельно возможная минимизация риска первичных заражений человека чумой, а в случае их возникновения – оперативное проведение мероприятий по локализации и ликвидации эпидемического очага. Обосновано, что для снижения эпидемических рисков в 2017 г. необходимо продолжить профилактическую вакцинацию, проведение дезинсекции и дератизации на участках прогностического обострения эпизоотической обстановки, что предусмотрено в «Комплексном плане мероприятий учреждений Роспотребнадзора по оздоровлению Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы в Кош-Агачском районе Республики Алтай в 2017 г.». Для снижения эпидемических рисков также необходимо обеспечить выполнение «Программы по снижению риска завоза и распространения чумы на территории Российской Федерации из трансграничного Сайлюгемского природного очага» в рамках реализации распоряжения Правительства Российской Федерации № 1864-р от 05.09.2016 г.

Ключевые слова: эпидемический очаг, оздоровление природного очага, вакцинация населения, эпизоотическая активность, полногеномное секвенирование.

Корреспондирующий автор: Николай Владимирович Попов, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

A.Yu.Popova^{1,2}, V.V.Kutyrev³, S.V.Balakhonov⁴, E.B.Ezhlova¹, Yu.V.Demina¹, N.D.Pakskina¹,
L.V.Shchuchinov⁵, N.V.Popov³, S.A.Kosilko⁴, V.I.Dubrovina⁴, V.M.Korzun⁴, E.P.Mikhailov⁶,
A.I.Mishchenko⁶, A.V.Denisov⁶, E.N.Rozhdestvensky⁶, S.A.Bugorkova³, G.A.Eroshenko³,
Ya.M.Krasnov³, V.P.Toporkov³, A.A.Sludsky³, A.S.Razdorsky³, A.N.Matrosov³, A.M.Porshakov³,
A.A.Lopatin³, S.A.Shcherbakova³

Coordination of Measures of Plague Control Institutions, Aimed at Rehabilitation and Sanitation of Gorno-Altai High-Mountain Natural Plague Focus in 2016

¹Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation;
²Russian Medical Academy of Post-Graduate Training, Moscow, Russian Federation; ³Russian Research Anti-Plague Institute
“Microbe”, Saratov, Russian Federation; ⁴Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian
Federation; ⁵Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Altai, Gorno-Altai, Russian Federation; ⁶Altai Plague Control
Station, Gorno-Altai, Russian Federation

Objective of the study is to sum-up the results of prophylactic (anti-epidemic) measures associated with elimination of epidemic focus in Kosh-Agach Region of the Republic of Altai in 2016. **Materials and methods.** Utilized were the data of reporting and source documentation from Altai Plague Control Station, Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Altai, RusRAPI “Microbe”, and Irkutsk RAPI. **Results and conclusions.** It is pointed out that carried out in 2016 complex of organizational, anti-epidemic, and sanitary-prophylactic activities against plague is the important stage of rehabilitation of Gorno-Altai high-mountain natural plague focus, the final goal of which is maximally possible decrement of risks of primary human infection with plague, and in case of occurrence of such – performing of prompt response measures on localization and elimination of epidemic focus. It has been substantiated that for epidemic risk minimization in 2017 it is necessary to continue prophylactic vaccination, disinsection and deratization in the areas of predictive epizootic situation aggravation, which is contained in “Complex Action Plan of the Rospotrebnadzor Institutions for Sanitation and Rehabilitation of Gorno-Altai high-mountain natural plague focus in Kosh-Agach Region of the Altai Republic

in 2017". It is also necessary to provide for implementation of the Program on lowering risks of importation from cross-border Sailyugemsky natural focus and spread of plague in the territory of the Russian Federation, within the frames of RF Government Order No 1864-p, dated 05.09.2016.

Key words: epidemic focus, sanitation of natural focus, immunization of the population, epizootic activity, full-genome sequencing.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Nikolay V. Popov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Popova A.Yu., Kutryev V.V., Balakhonov S.V., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakskina N.D., Shchuchinov L.V., Popov N.V., Kosilko S.A., Dubrovina V.I., Korzun V.M., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., Rozhdestvensky E.N., Bugorkova S.A., Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Toporkov V.P., Sludsky A.A., Razdorsky A.S., Matrosov A.N., Porshakov A.M., Lopatin A.A., Shcherbakova S.A. Coordination of Measures of Plague Control Institutions, Aimed at Rehabilitation and Sanitation of Gorno-Altai High-Mountain Natural Plague Focus in 2016. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 4:5–10. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-5-10

В связи с выявлением в 2012–2016 гг. микроочагов основного подвида чумного микроба с высоким эпидемическим потенциалом в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге и возникновением эпизоотий чумы среди промыслового вида – серого сурка, риски заражения населения значительно выросли [1, 4]. Единичные заражения человека имели место в 2014 г. [3] и 2015 г. [2]. В настоящее время сохраняется напряженная эпидемиологическая обстановка, связанная с наличием контингентов высокого риска заражения среди постоянного и временного населения (несанкционированный промысел, строительство газопроводов, туристические маршруты, верблюдоводство, отгонное животноводство) [6]. Последнее определяет необходимость значительного усиления эпидемиологического надзора за территорией Горно-Алтайского высокогорного природного очага, равно как и других энзоотичных по чуме территорий, на которых зарегистрирована одновременная циркуляция штаммов основного и неосновного подвидов чумного микроба.

В 2016 г. прогнозы на повышение эпизоотической активности и роста потенциальной эпиде-

мической опасности Горно-Алтайского высокогорного природного очага полностью оправдались. В весенне-летний период 2016 г. сложилась крайне неблагоприятная эпизоотическая обстановка, обусловленная широким распространением основного подвида чумного микроба *Y. pestis* ssp. *pestis* на участках с высокой плотностью серых сурков в Уландрыкском, Тархатинском, Талдуайском мезоочагах (рис. 1).

Эпизоотии чумы зарегистрированы на общей площади 916,6 кв. км. Обширные разлитые эпизоотии с циркуляцией возбудителя основного подвида обнаружены на площади 833,6 км², локальные эпизоотии с циркуляцией возбудителя алтайского подвида – на 83,0 км². В 2016 г. от носителей и переносчиков возбудителя чумы выделено 65 штаммов чумного микроба, в том числе 63 основного и 2 алтайского подвидов. Возбудитель чумы основного подвида выделен от следующих объектов: серого сурка – 26 штаммов (в том числе 22 от трупов и остатков стола хищных птиц), блохи *Oropsylla silantiewi* с серого сурка – 29, вши с серого сурка – 7, блохи *Oropsylla alaskensis* из входов нор монгольской пищухи – 1 штамм. Возбудитель чумы алтайского подвида вы-

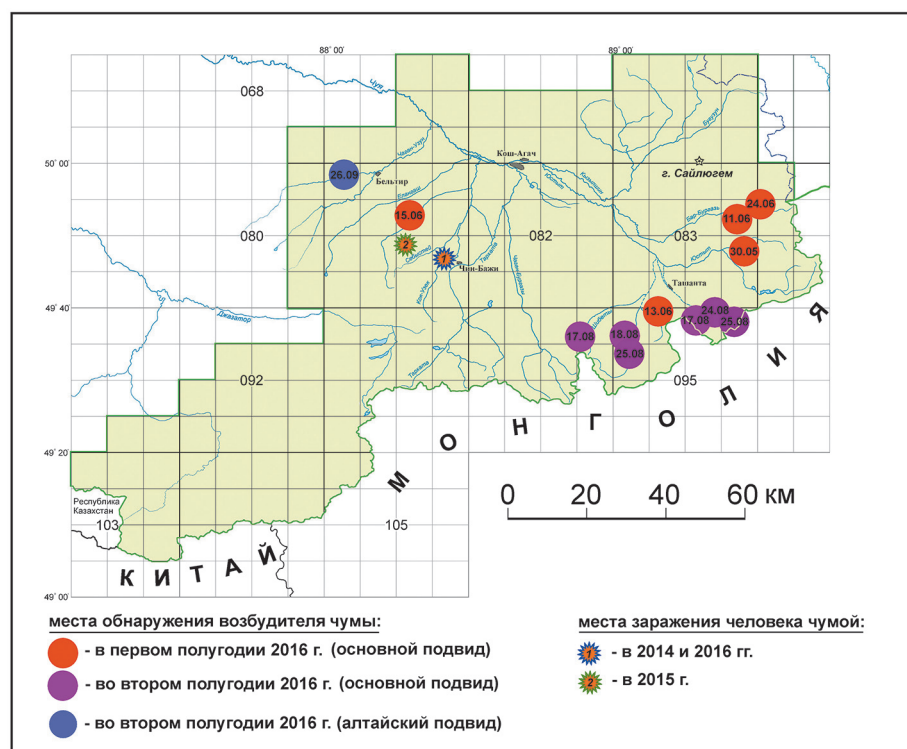


Рис. 1. Эпизоотическая обстановка на территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы в 2016 г.

делен от монгольской пищухи – 1 штамм, от блохи *Paramonopsyllus scalonae* с монгольской пищухи – 1 штамм.

Также получены 102 положительных серологических результата: от серого сурка – 60 (из них добытые животные – 20, трупы и остатки стола хищников – 21, костные останки – 14, шкурки – 5); от длиннохвостого суслика – 14 (в том числе от остатков стола хищников – 1); от монгольской пищухи – 16; от плоскочерепной полевки – 10; от тушканчика-прыгуна – 2.

Методом ПЦР в 74 пробах полевого материала выявлена ДНК *Y. pestis*. В 67 из них – *Y. pestis* ssp. *pestis*, в 7 – *Y. pestis* ssp. *altaica*. 66 находок ДНК основного подвида получено из различного материала от серых сурков, из них от добытых грызунов – 4, от трупов и остатков стола хищников – 38, от костных останков – 18, от шкурок – 6. Одна положительная находка ДНК основного подвида получена от длиннохвостого суслика (остатки стола хищных птиц). ДНК возбудителя алтайского подвида обнаружена у 6 монгольских пищух и в одной пробе костных останков этого зверька.

В связи с высокой эпидемической опасностью незаконной добычи серого сурка в летне-осенний период 2016 г. на всей территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага значительно повышена противоэпидемическая готовность медицинских учреждений. Для выявления границ эпизоотических участков проведен направленный поиск эпизоотий в поселениях этого промыслового вида, располагающихся в верхних частях долин рек, стекающих с хребтов Сайлюгем, Чихачева, Южно-Чуйский. В летне-осенний период здесь отмечены наиболее высокие риски заражения чумой, вплоть до середины сентября, когда большая часть популяции серого сурка залегает в спячку.

Несмотря на значительное усиление противоэпидемической работы в июле 2016 г., на территории Кош-Агачского района Республики Алтай (в границах Тархатинского участка Горно-Алтайского высокогорного природного очага) было зарегистрировано заболевание человека бубонной формой чумы. Заражение было связано с отстрелом сурка на животноводческой стоянке в ур. Тюнkelю (участок Вершина р. Ирбисту). Ранее, в непосредственной близости (в 5–10 км) от этого участка также были зарегистрированы случаи заражения человека: в 2014 г. – на участке Вершина р. Сербисту, в 2015 г. – на участке Вершина р. Елангаш. Больной в 2016 г. – мальчик 10 лет, пребывая в гостях у родственников, заразился при разделке сурка, добытого в результате незаконного промысла. Несколькими днями ранее, по месту своего жительства в с. Кош-Агач, он поранил большой палец на левой руке. Больной 12 июля 2016 г. был госпитализирован в инфекционное отделение ЦРБ районного центра с. Кош-Агач с диагнозом бубонной чумы. Против чумы не был привит. На основании решения Республиканской СПЭК с 13 июля 2016 г. были раз-

вернуты мероприятия по ликвидации эпидемического очага чумы по месту жительства больного. По результатам расследования выявлено и госпитализировано 15 человек контактных (из них на момент госпитализации вакцинировано от чумы только 4 взрослых). Больной получил курс специфического лечения и в удовлетворительном состоянии 26 июля выписан из больницы. К 28.07.2016 г. было закончено наблюдение за контактными лицами, пребывающими в госпитале при ЦРБ п. Кош-Агач. Решением Республиканского СПЭК от 29.07.2016 г. на территории Кош-Агачского района Республики Алтай очаг бубонной чумы признан ликвидированным.

Для обеспечения координации и взаимодействия органов и учреждений Роспотребнадзора, Минздрава Республики Алтай, ветеринарной службы, МВД, МЧС, местных органов исполнительной власти при проведении профилактических (противоэпидемических) мероприятий оперативно разработан «Комплексный план мероприятий противочумных учреждений Роспотребнадзора по оздоровлению Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы в Кош-Агачском районе Республики Алтай в августе-декабре 2016 г.». В процессе реализации этих мероприятий было обеспечено эпидемиологическое благополучие населения в регионе.

Комплекс мер неспецифической профилактики включал интенсификацию эпизоотологического мониторинга в очаге, направленного на обследование участков высокого риска инфицирования человека чумой. Большое значение придавалось выявлению изменений границ распространения серого сурка, определению численности зверька и его блох, а также состоянию популяций и численности монгольской пищухи, длиннохвостого суслика, синантропных грызунов и их блох. Объединенными усилиями противочумных и региональных учреждений Роспотребнадзора проведены дезинфектологические мероприятия в объемах, обеспечивающих ликвидацию эпидемического очага и подавление эпизоотий чумы в поселениях сурка [5]. При выполнении мероприятий обеспечивалось тесное взаимодействие с местными органами исполнительной власти, сотрудниками МВД, МЧС, Министерством здравоохранения, Комитетом по использованию и воспроизводству животного мира, Комитетом ветеринарии и Госветинспекции, Министерством экономического развития и туризма Республики Алтай, администрацией Национального парка «Сайлюгемский», пограничной службой. Большое внимание уделялось подготовке медицинского персонала по вопросам клиники, диагностики и лечения чумы, ветеринарных работников по профилактике чумы верблюдов, проведению информационно-разъяснительной работы среди населения Кош-Агачского района. Разработка и внедрение электронной «Интерактивной карты по управлению оздоровительными мероприятиями в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы» позволили оперативно анализировать результаты

работ и корректировать их. Внедрение в практику эпидемиологического надзора ГИС-технологий позволило определить современные границы циркуляции основного подвида чумного микроба, выявить участки с высоким риском заражения на территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы. Полученный опыт организации и проведения профилактических (противоэпидемических) мероприятий использован при разработке «Комплексного плана мероприятий учреждений Роспотребнадзора по оздоровлению Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы в Кош-Агачском районе Республики Алтай в 2017 г.».

Специалистами ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Алтай» проведены дезинфектологические мероприятия: поселковая дезинсекция на площади 82,1 тыс. м², поселковая дератизация – на 304,3 тыс. м², а также полевая дезинсекция на площади 30,4 км². На всех эпизоотических участках специальными бригадами охотников проведена механическая дератизация в поселениях серого сурка путем отстрела – элиминировано 787 экземпляров зверьков. Проведено одно учение с вводом условного больного чумой (на СКП с. Ташанта, ноябрь 2016 г.), проинструктировано по чуме 717 медицинских и 73 ветеринарных работников. В медицинских учреждениях проведено 11 семинаров по клинике чумы, 67 проверок готовности к первичным противочумным мероприятиям. Прочитано 27 лекций для населения. Информационно-разъяснительной работой охвачено около 19000 чел. постоянного и временного населения.

Параллельно с мерами по осуществлению неспецифической профилактики в течение 2016 г. в плановом порядке и по эпидемическим показаниям проводилась профилактическая вакцинация населения Кош-Агачского района вакциной живой чумной (ЖЧВ). Для вакцинации использовали вакцину производства ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора серии 1–15 и 5, прививка выполнялась накожным способом. К концу года вакцинацией было охвачено 17877 чел. от общего числа жителей района 18318 чел. Не были провакцинированы только дети до 2 лет, лица с противопоказаниями, а также не проживающие по месту регистрации. В 2016 г. у населения, постоянно проживающего на территории Кош-Агачского района и вакцинированного против чумы в период с марта по сентябрь этого года, было проведено выборочное исследование сывороток крови. Специалистами ФКУЗ «Иркутский противочумный институт» Роспотребнадзора в период с апреля по октябрь 2016 г. выполнялись комплексные иммунологические исследования среди вакцинированных лиц, проживающих на территории Кош-Агачского района и отнесенных к группе риска по заболеванию чумой (медицинские работники, работники МЧС, персонал специализирован-

ных подразделений). Был исследован клинический материал (кровь, сыворотка крови, клетки крови) от 60 чел., впервые вакцинированных против чумы. В рамках научной тематики планируются дальнейшие исследования по оценке иммунологической эффективности противочумной вакцинации в природных очагах инфекции. Учитывая имеющиеся данные по сохранению эпизоотической активности в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы на 2017 г., остается необходимость своевременного проведения в плановом порядке вакцинации и ревакцинации постоянно проживающего на территории очага населения и временного, прибывающего на эндемичную территорию в период активизации основного носителя чумы.

Для выяснения происхождения штаммов *Y. pestis* основного подвида, выделенных в Горно-Алтайском высокогорном очаге в 2016 г., проведено полногеномное секвенирование 13 штаммов, полученных от заболевшего человека и добытых сурков. Выполнен сравнительный анализ полногеномных последовательностей этих штаммов с ранее секвенированными геномами штаммов *Y. pestis* основного подвида, выделенными в этом очаге в 2012, 2014 и 2015 гг., а также штаммов из Тувинского горного очага и пограничных районов Монголии. Установлено близкое генетическое родство циркулирующих на этих территориях штаммов *Y. pestis* основного подвида, относящихся к филогенетической ветви 4.ANT античного биовара, не встречающейся в других природных очагах чумы мира (рис. 2). На основании полученных данных сделан вывод о наличии единого мегаочага *Y. pestis*, сформировавшегося в границах ареала основного подвида чумного микроба 4.ANT античного биовара в Юго-Восточной области Горного Алтая, включающий Горно-Алтайский высокогорный, Тувинский горный очаги и Баян-Улгэгейский аймак Монголии.

Для повышения эффективности проводимого эпидемиологического мониторинга в Горно-Алтайском высокогорном очаге смешанного типа разработан комплекс способов для проведения дифференциации штаммов *Y. pestis* основного (ssp. *pestis*) и алтайского (ssp. *altaica*) подвигов, отличающихся по вирулентности и эпидемической значимости. На основе впервые найденных мутаций генома, маркерных для основного и алтайского подвигов, разработан высокочувствительный способ дифференциации штаммов этих подвигов методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени. Также повышена разрешающая способность в отношении генетически однородных штаммов основного подвида из Горного Алтая традиционно используемой системы мультилокусного анализа варибельного числа tandemных повторов MLVA25 за счет дополнения ее семью варибельными локусами VNTR. Применение методов полногеномного секвенирования, ПЦР-РВ и MLVA позволило провести комплексный молекулярно-генетический

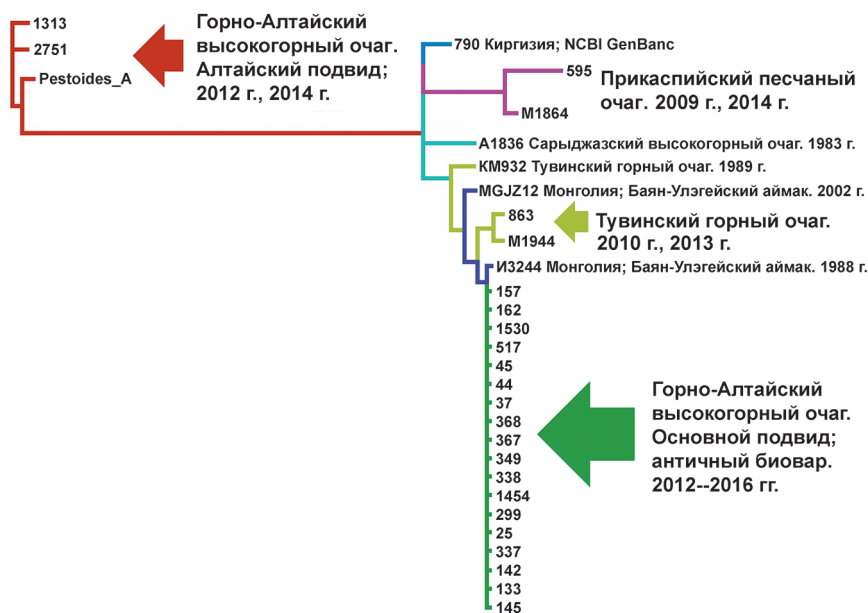


Рис. 2. Сравнительный филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* основного подвида, выделенных в Горно-Алтайском высокогорном очаге в 2012–2016 гг. Дендрограмма построена методом Maximum Likelihood в программе PhyML 3.1 по данным полногеномного SNP анализа штаммов

анализ штаммов *Y. pestis* при расследовании случая заболевания чумой человека в Кош-Агачском районе Республики Алтай в 2016 г. и подтвердить данные эпидемиологического заключения о заражении человека при разделке большого чумой сурка.

С учетом опыта организации противочумных мероприятий в Республике Алтай в 2014–2016 гг. проведена переработка нормативно-методических документов по эпидемиологическому надзору за чумой на территории Российской Федерации, в том числе подготовлены проекты санитарно-эпидемиологических правил «Профилактика чумы» (взамен СП 3.1.7.2492-09) и методических указаний «Организация и проведение эпидемиологического надзора в природных очагах чумы на территории Российской Федерации» (взамен МУ 3.1.3.2355–08). Переработаны также нормативно-методические документы, регламентирующие тактику эпизоотологического мониторинга территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы и ее профилактику.

В заключение отметим, что в результате выполнения «Комплексного плана мероприятий противочумных учреждений Роспотребнадзора по оздоровлению Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы в Кош-Агачском районе Республики Алтай в августе–декабре 2016 г.» значительно снижены эпидемические риски на территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы. Особо подчеркнем, что согласно эпизоотологическому прогнозу в 2017 г. сохранится высокая эпизоотическая активность Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы. В связи с этим для минимизации эпидемической опасности необходимо обеспечить упреждающее проведение профилактических мероприятий на участках прогностического обострения эпизоотической обстановки, что предусмотрено в «Комплексном плане мероприятий учреждений Роспотребнадзора по оздоровлению Горно-

Алтайского высокогорного природного очага чумы в Кош-Агачском районе Республики Алтай в 2017 г.». Для этого в мае–июне 2017 г. необходимо провести полевую дезинсекцию поселений серого сурка на участках высокого риска заражения, в соответствии с выполненным эпидемиологическим районированием Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы. Также необходимо продолжить изучение высокогорной части ареала алтайского сурка, где сохраняется высокая вероятность обнаружения новых микроочагов основного подвида чумного микроба. С целью сохранения эпидемиологического благополучия населения на территории Горно-Алтайского природного очага чумы необходимо также обеспечить реализацию Программы по снижению риска завоза и распространения чумы на территории Российской Федерации из трансграничного Сайлюгемского природного очага этой болезни в рамках реализации распоряжения Правительства Российской Федерации № 1864-р от 05.09.2016 г.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балахонов С.В., Афанасьев М.В., Шестопалов М.Ю., Остяз А.С., Витязева С.А., Корзун В.М., Вержуцкий Д.Б., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Денисов А.В., Ивченко Н.И., Рождественский Е.Н., Висков Е.Н., Фомина Л.А. Первый случай выделения *Yersinia pestis* subsp. *pestis* в Алтайском горном природном очаге чумы. Сообщение 1. Микробиологическая характеристика, молекулярно-генетическая и масс-спектрометрическая идентификация изолята. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 1: 60–4.
2. Балахонов С.В., Попова А.Ю., Мищенко А.И., Михайлов Е.П., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Денисов А.В., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Щучинов Л.В., Зарубин И.В., Семенова Ж.Е., Маденова Н.М., Дюсенбаев Д.К., Ярыгина М.Б., Чипанин Е.В., Косилко С.А., Носков А.К., Корзун В.М. Случай заболевания человека чумой в Кош-Агачском районе Республики Алтай в 2015 г. Сообщение 1. Клинико-эпидемиологические и эпизоотологические аспекты. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 1:55–60.
3. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Щучинов Л.В., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Денисов А.В., Шарова

И.Н., Попов Н.В., Кузнецов А.А. Заболевание человека чумой в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2014 г. Сообщение 1. Эпидемиологические и эпизоотологические особенности проявлений чумы в Горно-Алтайском высокогорном (Сайлюгемском) природном очаге чумы. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 4:9–16.

4. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Шарова И.Н., Мищенко А.И., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Михайлов Е.П., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Куклева Л.М., Черкасов А.В., Оглодин Е.Г., Куклев В.Е., Одинок Г.Н., Щербакова С.А., Балахонов С.В., Афанасьев М.В., Витязева С.А., Шестопалов М.Ю., Климов В.Т. Заболевание человека чумой в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2014 г. Сообщение 2. Особенности лабораторной диагностики и молекулярно-генетические характеристики выделенных штаммов. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 4:43–51.

5. Матросов А.Н., Щучинов Л.В., Денисов А.В., Мищенко А.И., Рождественский Е.Н., Слудский А.А., Раздорский А.С., Михайлов Е.П., Шарова И.Н., Поршаков А.М., Кузнецов А.А., Попов Н.В., Чипанин Е.В., Корзун В.М., Токмакова Е.Г., Балахонов С.В., Щербакова С.А., Кутырев В.В., Макин А.А., Архипов Г.С. Профилактические мероприятия в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы в 2016 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 4:25–32.

6. Попов Н.В., Безсмертный В.Е., Матросов А.Н., Князева Т.В., Кузнецов А.А., Федоров Ю.М., Попов В.П., Вержуцкий Д.Б., Корзун В.М., Косилко С.А., Чипанин Е.В., Дубянский В.М., Малеев О.В., Григорьев М.П., Зенкевич Е.С., Топорков В.П., Балахонов С.В., Куличенко А.Н., Кутырев В.В. Эпизоотическая активность природных очагов чумы Российской Федерации в 2015 г. и прогноз на 2016 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 1:13–9.

References

1. Balakhonov S.V., Afanas'ev M.V., Shestopalov M.Yu., Ostyak A.S., Vityazeva S.A., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., Ivzhenko N.I., Rozhdestvensky E.N., Viskov E.N., Fomina L.A. [The first case of *Yersinia pestis* subsp. *pestis* isolation in the territory of Altai mountain natural plague focus. Communication 1. Microbiological characteristics, molecular-genetic and mass-spectrometric identification of the isolate]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 1:60–4.
2. Balakhonov S.V., Popova A.Yu., Mishchenko A.I., Mikhailov E.P., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Denisov A.V., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Shchuchinov L.V., Zarubin I.V., Semenova Zh.E., Madenova N.M., Dyusenbaev D.K., Yarygina M.B., Chipanin E.V., Kosilko S.A., Noskov A.K., Korzun V.M. [A case of human infection with plague in the Kosh-Agach Region of the Republic of Altai in 2015. Communication 1. Clinical-epidemiological and epizootiological aspects]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 1:55–60.
3. Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakskina N.D., Shchuchinov L.V., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Denisov A.V., Sharova I.N., Popov N.V., Kuznetsov A.A. [Infection of an individual with plague in the Gorno-Altai high-mountain natural focus in 2014. Communication 1. Epidemiological and epizootiological peculiarities of plague manifestations in the Gorno-Altai high-mountain (Sailyugemsky) natural plague focus]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 4:9–16.
4. Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakskina N.D., Sharova I.N., Mishchenko A.I., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Mikhailov E.P., Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Kukleva L.M., Cherkasov A.V., Oglozin E.G., Kuklev V.E., Odiokov G.N., Shcherbakova S.A., Balakhonov S.V., Afanas'ev M.V., Vityazeva S.A., Shestopalov M.Yu., Klimov V.T. [Infection of an individual with plague in the Gorno-Altai high-mountain natural focus in 2014. Communication 2. Peculiarities of laboratory diagnostics and molecular-genetic characterization of the isolated strains]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 4:43–51.
5. Matrosov A.N., Shchuchinov L.V., Denisov A.V., Mishchenko A.I., Rozhdestvensky E.N., Sludsky A.A., Razdorsky A.S., Mikhailov E.P., Sharova

I.N., Porshakov A.M., Kuznetsov A.A., Popov N.V., Lopatin A.A., Chipanin E.V., Korzun V.M., Tokmakova E.G., Balakhonov S.V., Shcherbakova S.A., Makin A.A., Arkhipov G.S., Kutyrev V.V. [Non-specific prophylaxis of plague in the Gorno-Altai high-mountain natural focus in 2016]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 4:25–32.

6. Popov N.V., Bezsmertny V.E., Matrosov A.N., Knyazeva T.V., Kuznetsov A.A., Fedorov Yu.M., Popov V.P., Verzhutsky D.B., Korzun V.M., Kosilko S.A., Chipanin E.V., Dubyansky V.M., Maletskaya O.V., Grigor'ev M.P., Zenkevich E.S., Toporkov V.P., Balakhonov S.V., Kulichenko A.N., Kutyrev V.V. [Epizootic activity of natural plague foci of the Russian Federation in 2015, and prognosis for 2016]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 1:13–9.

Authors:

Popova A.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. Russian Medical Academy for Post-Graduate Training; 2/1, Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russian Federation.

Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakskina N.D. 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.

Kutyrev V.V., Bugorkova S.A., Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Shcherbakova S.A., Toporkov V.P., Popov N.V., Sludsky A.A., Razdorsky A.S., Lopatin A.A., Matrosov A.N., Porshakov A.M. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Balakhonov S.V., Kosilko S.A., Dubrovina V.I., Korzun V.M. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Shchuchinov L.V. Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Altai, 173, Kommunistschesky Av., Gorno-Altai, 649002, Russian Federation. E-mail: rpn_ra@mail.gorny.ru.

Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., Rozhdestvensky E.N. Altai Plague Control Station, 2, Zavodskaya St., Gorno-Altai, 649002, Russian Federation. E-mail: chuma@mail.gorny.ru.

Об авторах:

Попова А.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. Российская медицинская академия последипломного образования; Российская Федерация, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1.

Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Российская Федерация, 127994, Москва, Вадковский переулок, дом 18, строение 5 и 7.

Кутырев В.В., Бугоркова С.А., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Щербакова С.А., Топорков В.П., Попов Н.В., Слудский А.А., Раздорский А.С., Лопатин А.А., Матросов А.Н., Поршаков А.М. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Балахонов С.В., Косилко С.А., Дубровина В.И., Корзун В.М. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилессера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Щучинов Л.В. Управление Роспотребнадзора по Республике Алтай. Российская Федерация, 649002, Горно-Алтайск, проспект Коммунистический, 173. E-mail: rpn_ra@mail.gorny.ru.

Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Денисов А.В., Рождественский Е.Н. Алтайская противочумная станция. Российская Федерация, 649002, Горно-Алтайск, ул. Заводская, 2. E-mail: chuma@mail.gorny.ru

Поступила 24.11.16.

Г.Х.Базарова¹, З.Ф.Дугаржапова², А.И.Мищенко¹, Н.В.Лукьяненко³, В.В.Шевченко⁴

ЭПИЗООТОЛОГО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО СИБИРСКОЙ ЯЗВЕ В АЛТАЙСКОМ КРАЕ И РЕСПУБЛИКЕ АЛТАЙ (1985–2015 гг.)

¹ФКУЗ «Алтайская противочумная станция», Горно-Алтайск, Российская Федерация; ²ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российская Федерация; ³ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет», Барнаул, Российская Федерация; ⁴ГБУЗ «Краевая клиническая больница, Краевой центр эпидемиологии», Барнаул, Российская Федерация

Цель работы. Изучение ситуации по сибирской язве в Алтайском крае и Республике Алтай в 1985–2015 гг. **Материалы и методы.** Использованы статистические и отчетные формы учреждений Роспотребнадзора, ветеринарии, Россельхознадзора в Республике Алтай и Алтайском крае, ФКУЗ «Алтайская противочумная станция». Лабораторное исследование культур *Bacillus anthracis*, полевого и клинического материалов проведено в соответствии с МУ 4.2.2413-08. **Результаты и выводы.** В Алтайском крае в 1985–2015 гг. наблюдалось выраженное неблагополучие по сибирской язве, определяемое большим количеством СНП (1262 пунктов) и их высокой плотностью (7,68); регистрацией шести новых СНП в пяти районах; превышением показателей среднегодовой заболеваемости СХЖ (0,111 на 100 тыс. голов) и людей ($0,022 \pm 0,001 \%$). Республика Алтай относится к территориям с относительно эпизootолого-эпидемиологическим благополучием по сибирской язве. Современная ситуация по сибирской язве в Алтайском крае характеризуется преобладанием старых неманифестных СНП; заболеваемостью КРС фермерских и личных хозяйств; регистрацией вспышечной заболеваемости среди не привитых сельских жителей. Основной причиной инфицирования людей было участие в вынужденном убое, разделке туш большого скота и кулинарной обработке инфицированного мяса (88,2 %), болезнь проявлялась в кожной форме (94,1 %). Отмечен недостаточный уровень организации санитарно-ветеринарных мероприятий на частных подворьях и фермерских хозяйствах.

Ключевые слова: сибирская язва, стационарно неблагополучные по сибирской язве пункты, заболеваемость.

Корреспондирующий автор: Галина Хамроевна Базарова, e-mail: altai-chuma@mail.ru.

G.Kh.Bazarova¹, Z.F.Dugarzhapova², A.I.Mishchenko¹, N.V.Luk'yanenko³, V.V.Shevchenko⁴

Epizootiological-Epidemiological Situation on Anthrax in the Altai Territory and the Republic of Altai (1985–2015)

¹Altai Plague Control Station, Gorno-Altai, Russian Federation; ²Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation; ³Altai State Medical University, Barnaul, Russian Federation; ⁴Territorial Clinical Hospital, Territorial Center of Epidemiology, Barnaul, Russian Federation

Objective of the study is to analyze the situation on anthrax in the Altai Territory and the Republic of Altai in 1985–2015. **Materials and methods.** Utilized were statistical and report forms provided by the Rospotrebnadzor, veterinary, and Phytosanitary Surveillance Service institutions in the Republic of Altai and Altai Territory, as well as by Altai Plague Control Station. Laboratory investigations of *Bacillus anthracis* cultures, field and clinical samples was conducted in accordance with Methodological Recommendations 4.2.2413-08. **Results and conclusions.** Between 1985–2015, in the Altai Territory, an expressed unfavorable situation on anthrax was observed, defined by the large number of stationary potentially hazardous areas (SPHA) (1262 sites) and their high density (7.68); registration of six novel SPHA in five separate districts; and excess of long-term average annual morbidity rates among live-stock animals (0.111 per 100 thousand animals) and the population ($0.022 \pm 0.001 \%$). The Republic of Altai is classified as a territory with relatively favorable epizootiological-epidemiological situation on anthrax. Current situation on anthrax in this region is characterized by domination of old non-manifesting SPHA; infections among cattle stock on farms and private subsidiary holdings; and registration of sporadic cases among non-vaccinated rural population. The major cause of human infection was participation in compulsory slaughtering, cutting, and skinning of cattle, as well as in cooking of the infected meat (88.2 %). It manifested itself in cutaneous anthrax (94.1 %). Indicated has been an ineffective organization of sanitary-veterinary measures in private holdings and on the farms.

Key words: anthrax, stationary potentially hazardous as regards anthrax areas, morbidity rates.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Galina Kh. Bazarova, e-mail: altai-chuma@mail.ru.

Citation: Bazarova G.Kh., Dugarzhapova Z.F., Mishchenko A.I., Luk'yanenko N.V., Shevchenko V.V. Epizootiological-Epidemiological Situation on Anthrax in the Altai Territory and the Republic of Altai (1985–2015). *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 4:11–14. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-11-14

В Российской Федерации отмечается неравномерность территориального распределения стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов

(СНП) с преобладанием заболеваемости крупного рогатого скота (КРС) в Северо-Кавказском, Южном, Приволжском, Центральном и Сибирском (на юге)

федеральных округах [4]. В период социально-экономического кризиса 1990-х годов снизилось поголовье сельскохозяйственных животных (СХЖ) как в стране, так и в сибирском регионе (в 2,6 раза), что существенно повлияло на уровень заболеваемости сибирской язвой среди СХЖ [3]. На юге Западной и Восточной Сибири в связи с интенсивным развитием животноводческой отрасли в субъектах с большим количеством СНП и их высокой плотностью риск возникновения эпизоотий сибиреязвенной инфекции значительно возрастает. Сибирская язва широко распространена в Алтайском крае. В лесостепной, предгорной и салаирской природно-географических частях края сибирской язвой болеют в основном КРС и свиньи, степной – КРС и мелкий рогатый скот [6]. Развитие животноводческой отрасли на современном этапе, в том числе на частных подворьях, фермерских хозяйствах, и трудности санитарно-ветеринарного контроля в этом секторе создают определенные риски развития эпизоотий сибирской язвы среди СХЖ и заболевания людей. В связи с этим изучение современного развития эпидемического процесса сибирской язвы является весьма актуальным для организации эпидемиологического надзора, санитарно-ветеринарных и противоэпидемических мероприятий.

Цель работы – изучение ситуации по сибирской язве в Алтайском крае и Республике Алтай в 1985–2015 гг. Основные задачи – исследование особенностей эпидемического процесса, эпизоотологической ситуации и клинико-диагностических аспектов сибирской язвы.

Материалы и методы

Ретроспективный эпизоотолого-эпидемиологический анализ заболеваемости сибирской язвой в Алтайском крае проведен за 1985–2015 гг. на основании статистических и отчетных форм Роспотребнадзора (№ 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях») и Россельхознадзора (№ 1-ВЕТ «Сведения о заразных болезнях животных»), сборников статистических и аналитических материалов Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, отчетов Алтайской противочумной станции, данных управлений ветеринарии и Роспотребнадзора, Центров гигиены и эпидемиологии в Республике Алтай и Алтайском крае, кадастров стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации и Алтайского края [1, 6]. Эпидемиологический анализ проведен с применением статистических методов. Лабораторное исследование культур *Bacillus anthracis* проведено в соответствии с МУ 4.2.2413-08 [2].

Результаты и обсуждение

В настоящее время Алтайский край является зоной высокого риска заражения сибирской язвой и имеет выраженное эпизоотолого-эпидемиологическое

неблагополучие. Край занимает первое место в Сибири по количеству учтенных СНП (1262), что составляет 18,9 % от общего количества региона (6670). Старыми неманифестными пунктами являются 97,8 % (1234) СНП Алтайского края и рецидивно манифестными – 1,8 % (22). В 1985–2015 г. сибирская язва впервые зарегистрирована в шести населенных пунктах пяти районов Алтайского края (Советский, Тальменский, Третьяковский, Усть-Калманский и Целинный). В трех новых СНП отмечались единичные случаи сибирской язвы среди СХЖ, в остальных трех – эпизоотии. Республика Алтай относится к территориям с относительным эпизоотолого-эпидемиологическим благополучием по сибирской язве. В республике насчитывается 61 старый неманифестный СНП (100 %). Последний случай сибирской язвы произошел в 1961 г. в с. Чепош Элекмонарского района Горно-Алтайского АО.

Алтайский край находится на втором месте (7,46) после Омской области (8,28) по плотности СНП (количественное соотношение СНП к единице площади территории на 1 тыс. кв. км.). В Республике Алтай отмечается крайне низкая плотность (0,65), что в 11,5 раза меньше чем в Алтайском крае.

В 1985–2015 гг. сибирская язва регистрировалась у СХЖ в 19 районах края. При эпизоотической активности в 30 СНП эпидемические осложнения наблюдались в 7 СНП, в основном в летний период. Алтайский край занимает первое место по заболеваемости СХЖ (0,111 на 100 тыс. голов), превышая в 5,2 раза среднесибирский уровень (0,078). Всего за 31 год наблюдения в крае заболела 71 голова СХЖ, из них 54 КРС, 8 свиней, 9 лошадей.

За исследуемый период на территории Сибири заболели сибирской язвой 84 человека в семи субъектах, из них 17 человек (20,2 %) в девяти СНП Алтайского края (рис. 1).

Среднегодовная заболеваемость людей в крае ($0,022 \pm 0,001 \text{ ‰}$) превышает в 1,8 раза показатель по Сибири ($0,012 \pm 0,004 \text{ ‰}$), рис. 1. Край занимает четвертое место после республик Тыва и Бурятия, Омской области. Сибирской язвой болели не привитые сельские жители (100 %) преимущественно лица мужского пола (94,1 %) в возрасте 30–39 лет (64,7 %). В возрастной группе 40–49 лет отмечено 23,5 % заболевших, 50–59 и старше 60 лет – по 5,9 % (рис. 2). В 64,7 % случаев регистрировалась

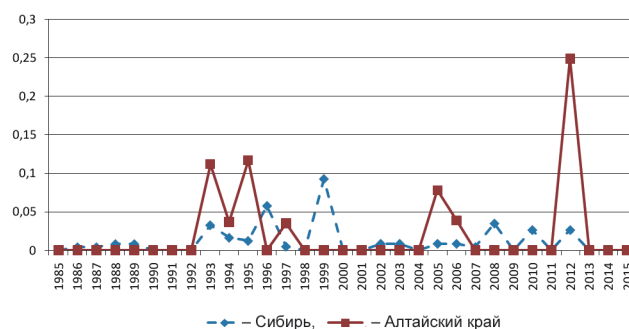


Рис. 1. Динамика заболеваемости людей сибирской язвой в Алтайском крае и в среднем по Сибири за 1985–2015 гг. (на 100 тыс. населения)

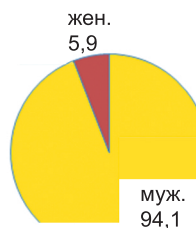
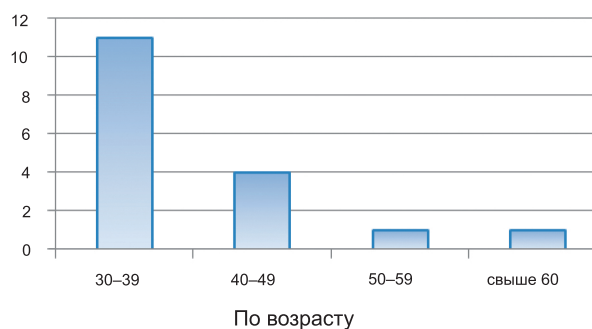


Рис. 2. Половозрастная структура заболеваемости людей сибирской язвой в Алтайском крае за 1985–2015 гг. (абс. число)

вспышечная заболеваемость.

У заболевших в 94,1 % случаев наблюдалась кожная форма болезни, при этом инкубационный период составлял в среднем 2–8 дней. Больные обращались за медицинской помощью в разные сроки болезни: в первые сутки – три человека; во вторые – два; на третьи–пятые – по одному; шестые – три и на десятые – два. Летальный исход от генерализованной формы болезни отмечен в одном случае (5,9 %), при позднем обращении с момента начала клинических проявлений. Диагноз сибирской язвы у трех больных (17,6 %) был установлен на основании только клинических проявлений и эпидемиологического анамнеза.

Клинический диагноз сибирской язвы в 64,7 % случаев подтвержден выделением культуры из источников инфекции и фактора передачи – мяса вынужденно забитых животных. Кожно-аллергические пробы с антраксином дали положительные результаты в 58,8 % случаев (10 человек). В 2006 г. в смыве язвы одного больного выделена культура *B. anthracis* (5,9 %). В 2012 г. из шести больных диагноз подтвержден у трех человек двумя методами – обнаружением антигена сибиреязвенного микроба в пробах мочи и детекцией ДНК *B. anthracis* в крови и содержимом карбункулов, язв; кроме того, в клиническом материале четвертого больного выделена ДНК сибиреязвенного микроба и в крови специфическое свечение. У двух больных выявлены антитела в парных сыворотках крови.

Основной причиной инфицирования людей было участие в вынужденном убое и разделке туш, снятии шкур и кулинарной обработке мяса КРС (88,2 %), в одном случае (5,9 %) фактором передачи послужило кожсырье и еще в одном (5,9 %) источник инфекции выявить не удалось. Заболевания людей носили непрофессиональный бытовой характер (88,2 %) и относились к непрофессиональной группе приусадебного типа животноводческого подтипа [6].

В 2012 г. сибирской язвой в Алтайском крае заболели пять голов КРС и шесть человек (0,249 на 100 тыс. населения) с одним летальным исходом. В Целинном районе отмечалась эпизоотия среди КРС с эпидемическими осложнениями, в виде групповой заболеваемости (пять человек), и в Быстроистокском – спорадические случаи.

13 августа при вскрытии павшей коровы на месте падежа в присутствии хозяина ветеринарным врачом установлен диагноз пищевого отравления. 21 авгу-

ста, спустя восемь дней, у владельца скота появились клинические признаки, и на четвертый день болезни он обратился за медицинской помощью с жалобами на резкое ухудшение состояния, в связи с чем был госпитализирован в Бийскую ЦРБ. При поступлении предъявлял жалобы на острые боли в пояснице (в анамнезе – мочекаменная болезнь), гематурию, лихорадку, слабость, головную боль. На кисти правой руки появилась кровоточащая язва, отек, на голени правой ноги – язва с сукровичным отделяемым, геморрагическая сыпь по телу. Несмотря на проводимую интенсивную терапию, состояние больного ухудшалось. Больной скончался от инфекционно-токсического шока при генерализованной форме болезни. При исследовании прижизненно отобранного клинического материала в лаборатории ООИ ФБУЗ «ЦГиЭ в Алтайском крае» в крови обнаружена ДНК *B. anthracis*, и в моче выявлен антиген сибиреязвенного микроба (РНГА).

19 августа пала вторая корова в другом личном подворье. После разделки туши, хозяин раздал мясо знакомым в селах Дружба и Марушка и вывез на пашеку на корм собакам. Из восьми собак пять заболели и две пали. 24 августа мужчина обратился за медицинской помощью и был госпитализирован с подозрением на кожную форму сибирской язвы. В отделяемом язвы обнаружены ДНК *B. anthracis* (ПЦР) и антиген сибиреязвенного микроба (РНГА и реакция Асколи), а в пробе мочи – антиген в РНГА.

25 августа отмечен третий падеж животного еще у одного жителя с. Дружба. Из уха павшего животного в краевой ветеринарной лаборатории была изолирована культура сибиреязвенного микроба. 26 августа заболела четвертая корова, проведено комплексное лечение против сибирской язвы, результаты исследования крови на сибирскую язву – отрицательные, животное выздоровело.

При расследовании причин возникновения эпизоотии установлено, что заболевшие сибирской язвой коровы, не привитые против сибирской язвы, выпасались на пастбище, граничащим с рекультивированной территорией полигона твердых бытовых и биологических отходов, где ранее сбрасывали трупы павших животных. В 2011 г. в этих местах проводились земляные работы по освобождению площадей под посевы пшеницы и строительство дамбы.

Во время ежедневных подворных обходов осмотрены 750 жителей с. Марушка и 644 – с. Дружба. Проведена специфическая вакцинация 257 человек.

27 августа в с. Марушка среди контактных 38 человек, находившихся под медицинским наблюдением, активно выявлено еще трое больных: у одного обнаружен антиген в пробе мочи и выделена ДНК сибиреязвенного микроба в экссудате карбункула, у двух других – выявлены специфические антитела в парных сыворотках (от 1:40 до 1:320 в РНГА).

В очагах сибирской язвы с. Марушка и с. Дружба Целинного района с 24 августа по 2 сентября отобраны 48 проб клинического материала от больных и подозрительных на заболевание сибирской язвой людей (кровь, экссудаты из ран, моча), а также 222 пробы объектов окружающей среды (почва пастбищ и ферм, трава пастбищ, водопроводная вода и вода поверхностных водоемов у пастбищ, корма). В пробе почвы места падежа коровы обнаружены антиген и ДНК сибиреязвенного микроба в РНГА и ПЦР.

Следующие спорадические случаи сибирской язвы в крае произошли в с. Быстрый Исток Быстроистокского района, где ранее случаи заболеваний и падежа СХЖ регистрировались в 1932 и 1942 гг. 17 октября в индивидуальном крестьянском хозяйстве заболел пятимесячный теленок. Животное выпасалось на привязи на участке, где, с противоположной целью, было проведено опаживание и, вероятно, вскрылось старое сибиреязвенное захоронение. Хозяин заметил ухудшение состояния теленка и посчитал, что животное ударил бык. С его слов, на следующий день после вынужденного убоя теленка он порезал указательный палец правой руки. Через два дня мужчина ушиб мизинец левой руки. Спустя девять дней у него на руках появились две болезненные пустулы. Заболевший обратился за медицинской помощью, через три дня амбулаторного лечения с жалобами на наличие безболезненных язв на обеих кистях с черным струпом, окруженным красным валиком, сильным отеком, лимфаденитом в подмышечных впадинах и субфебрильной температурой, госпитализирован в инфекционное отделение с подозрением на сибирскую язву. В трех пробах клинического материала больного (содержимое карбункулов мизинца, предплечья и флегмоны правой кисти) обнаружена ДНК *B. anthracis* и специфическое свечение в МФА (кровь).

При эпидемиологическом расследовании установлено, что в разделке мяса и мясопродуктов принимали участие жена и дочь, мясо было отправлено на автобусе с водителем в г. Бийск и передано второй дочери. Семья дочери с двумя знакомыми употребляли пельмени из этого мяса. В группе контактных под медицинским наблюдением находились и принимали профилактическое лечение 14 человек. После установления диагноза сибирской язвы у больного мясо было изъято и направлено на исследование. Из пробы мяса в лаборатории ФКУЗ «Алтайская ПЧС» выделена культура *B. anthracis* [7]. В пробе почвы места убоя теленка изолирована культура и идентифицирована как атипичный штамм *B. anthracis*.

Таким образом, вспышечная и спорадическая заболеваемость сибирской язвой КРС и людей в

Алтайском крае в 2012 г. подтверждена выделением культуры *B. anthracis* из источника инфекции и факторов передачи, клинический диагноз у людей подтвержден молекулярно-генетическим и серологическим методами. Комплекс противоэпизоотических и противоэпидемических профилактических мероприятий в двух районах края проведен в полном объеме.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барышников П.И., Федорова Г.А., Высочин А.В., Миронов А.В., Салдан И.П., Азарова Н.А., Калинина У.В. Заболеваемость сибирской язвой среди населения и Кадастр неблагополучных пунктов болезни животных в Алтайском крае. Барнаул; 2013. 83 с.
2. Лабораторная диагностика и обнаружение возбудителя сибирской язвы. Методические указания 4.2.2413-08. М.; 2009. 67 с.
3. Непоклонов А.Е. Эпизоотическая ситуация по зооантропонозным инфекциям в Российской Федерации. В кн.: Ветеринарные и медицинские аспекты зооантропонозов. Покров; 2003. Ч. 1. С. 16–22.
4. Симонова Е.Г., Локтионова М.Н., Картавая С.А. Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по сибирской язве на территории Приволжского федерального округа Российской Федерации. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2012; 3(22):93–6.
5. Черкасский Б.Л. Эпидемиология и профилактика сибирской язвы. М.: ОАО «ИнтерСЭН»; 2002. 384 с.
6. Черкасский Б.Л., редактор. Кадастр стационарно-неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации. М.: ОАО «ИнтерСЭН»; 2005. 829 с.

References

1. Baryshnikov P.I., Fedorova G.A., Vysochin A.V., Mironov A.V., Saldan I.P., Azarova N.A., Kalinina U.V. [Anthrax Incidence among the Population and Cadastre of Potentially Hazardous as regards Animal Infection Areas in the Altai Territory]. Barnaul; 2013. 83 p.
2. [Laboratory diagnostics and detection of anthrax causative agent]. Methodological recommendations 4.2.2413-08. M.; 2009. 67 p.
3. Nepoklonov A.E. [Epizootic situation on zoonanthropozone infections in the Russian Federation]. In: [Veterinary and Medical Aspects of Zoonanthropozone]. Pokrov; 2003. Part I. P. 16–22.
4. Simonova E.G., Loktionova M.N., Kartavaya S.A. [Epizootiological-epidemiological situation on anthrax in the territory of the Trans-Volga Federal District of the Russian Federation]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2012; 3(22):93–6.
5. Cherkassky B.L. [Epidemiology and Prophylaxis of Anthrax]. M.: "InterSAN"; 2002. 384 p.
6. Cherkassky B.L., editor. [Cadastre of Stationary Potentially Hazardous as regards Anthrax Areas of the Russian Federation]. M.: "InterSAN"; 2005. 829 p.

Authors:

- Bazarova G.Kh., Mishchenko A.I. Altai Plague Control Station. 2, Zavodskaya St., Gorno-Altaysk, 649002, Russian Federation. E-mail: altai-chuma@mail.ru.
- Dugarzhapova Z.F. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.
- Luk'yanenko N.V. Altai State Medical University. 1, Lyapidevsky St., Barnaul, Russian Federation.
- Shevchenko V.V. Territorial Clinical Hospital, Territorial Center of Epidemiology. 1, Lyapidevsky St., Barnaul, Russian Federation.

Об авторах:

- Базарова Г.Х., Мищенко А.И. Алтайская противочумная станция. Российская Федерация, 649002, г. Горно-Алтайск, Заводская, д. 2. E-mail: altai-chuma@mail.ru.
- Дугаржапова З.Ф. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилисера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.
- Лукьяненко Н.В. Алтайский государственный медицинский университет. Российская Федерация, г. Барнаул, ул. Ляпидевского, д. 1.
- Шевченко В.В. Краевая клиническая больница, Краевой центр эпидемиологии. Российская Федерация, г. Барнаул, ул. Ляпидевского, д. 1.

Поступила 08.07.16.

Н.Ф.Василенко, О.В.Малецкая, Е.А.Манин, Д.А.Прислегина, Т.В.Таран, В.М.Дубянский, Л.И.Шапошникова, А.С.Волынкина, Я.В.Лисицкая, Е.С.Котенёв, Г.М.Грижебовский, А.Н.Куличенко

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ОБСТАНОВКА ПО ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫМ ИНФЕКЦИОННЫМ БОЛЕЗНЯМ НА ТЕРРИТОРИИ СЕВЕРО-КАВКАЗСКОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА В 2015 г.

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

Цель работы. Анализ эпидемиологических и эпизоотологических проявлений природно-очаговых инфекций на территории Северо-Кавказского федерального округа Российской Федерации в 2015 г. **Материалы и методы.** Использованы донесения, представленные Управлениями Роспотребнадзора, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» субъектов СКФО, ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, ФКУЗ Дагестанская и Кабардино-Балкарская противочумные станции Роспотребнадзора. Обработку полученных данных проводили с использованием программы Excel. **Результаты и выводы.** Выявлено 8 нозологических форм природно-очаговых инфекций, в том числе бактериальной этиологии – 6 (75 %), вирусной – 2 (25 %). В Ставропольском крае зарегистрировано 164 больных: кишечным иерсиниозом – 67, Крымской геморрагической лихорадкой – 43, клещевым боррелиозом (болезнью Лайма) – 40, лептоспирозом – 9, псевдотуберкулезом – 2, по одному больному – бешенством, гранулоцитарным анаплазмозом человека и моноцитарным эрлихиозом человека. В Республике Дагестан зарегистрированы 2 больных Крымской геморрагической лихорадкой, 1 – туляремией. В Карачаево-Черкесской Республике также выявлены по одному больному лептоспирозом и Крымской геморрагической лихорадкой (завозной случай из Ставропольского края). На наличие маркеров 12 нозологических форм природно-очаговых инфекций исследовано 8502 пробы полевого материала, по 10 из них получены положительные результаты. Наиболее обширный эпизоотологический мониторинг проведен в Ставропольском крае (по 10 нозологиям), где установлена циркуляция 8 возбудителей.

Ключевые слова: эпидемиологическая обстановка, эпизоотологический мониторинг, природно-очаговые инфекции, маркеры возбудителей, субъекты юга России.

Корреспондирующий автор: Надежда Филипповна Василенко, e-mail: snipchi@mail.stv.ru.

N.F.Vasilenko, O.V.Maletskaya, E.A.Manin, D.A.Prislegina, T.V.Taran, V.M.Dubyansky, L.I.Shaposhnikova, A.S.Volynkina, Ya.V.Lisitskaya, E.S.Kotenev, G.M.Grizebovsky, A.N.Kulichenko

Epidemiological Situation on Natural Focal Infectious Diseases in the Territory of the North-Caucasian Federal District in 2015

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Objective of the study is to analyze epidemiological and epizootiological manifestations of natural-focal infections in the territory of the North-Caucasian Federal District (NCFD) in 2015. **Materials and methods.** Utilized were the reports of the Rospotrebnadzor Administrations, "Centers of Hygiene and Epidemiology" in the NCFD entities, Stavropol Research Anti-Plague Institute, Dagestan and Kabardino-Balkaria Plague Control Stations. Data processing was conducted using Excel Microsoft ware. **Results and conclusions.** Identified have been 8 nosological forms of natural-focal infections, including infections of bacterial etiology – 6 (75 %), and viral etiology – 2 (25 %). The majority of patients (164) are identified in the Stavropol Region: 67 (intestinal yersiniosis), 43 (Crimean-Congo hemorrhagic fever), 40 (Lyme borreliosis), 9 (leptospirosis), 2 (pseudotuberculosis), 1 (rabies), 1 (human granulocytic anaplasmosis) and 1 (human monocytic ehrlichiosis). The patients with 2 nosological forms of natural focal infections are identified in the Republic of Dagestan: 2 – Crimean-Congo hemorrhagic fever and one patient – tularemia. Also 2 nosological forms of natural focal infections are revealed in the Republic of Karachay-Cherkessia: one case of leptospirosis and one case of Crimean-Congo hemorrhagic fever (imported from the Stavropol region). 8502 field samples have been tested for the presence of markers of 12 nosological forms of natural-focal infections. Positive results for 10 of them have been obtained. The most comprehensive epizootiological monitoring has been carried out in the Stavropol Territory (10 nosological forms), whereat circulation of 8 pathogenic agents is registered.

Key words: epidemiological situation, epizootiological monitoring, natural focal infections, markers of pathogens, constituent entities of the South of Russia.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Nadezhda F. Vasilenko, e-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Citation: Vasilenko N.F., Maletskaya O.V., Manin E.A., Prislegina D.A., Taran T.V., Dubyansky V.M., Shaposhnikova L.I., Volynkina A.S., Lisitskaya Ya.V., Kotenev E.S., Grizebovsky G.M., Kulichenko A.N. Epidemiological Situation on Natural Focal Infectious Diseases in the Territory of the North-Caucasian Federal District in 2015. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 4:15–19. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-15–19

Территория Северо-Кавказского федерального округа (СКФО) Российской Федерации является эндемичной по широкому спектру природно-очаговых инфекций (ПОИ) бактериальной и вирусной при-

роды, требующих особого внимания в силу того, что этиологические агенты большинства из них относятся к возбудителям II группы патогенности, а обострение обстановки по некоторым из них может

привести к чрезвычайной эпидемической ситуации [2, 3]. В связи с этим анализ эпидемиологической обстановки и проведение эпизоотологического обследования данной территории являются актуальными и необходимыми.

Цель данной работы – анализ эпидемиологических и эпизоотологических проявлений природно-очаговых инфекций на территории Северо-Кавказского федерального округа Российской Федерации в 2015 г.

Материалы и методы

Для проведения анализа эпидемиологических и эпизоотологических проявлений ПОИ использованы донесения, представленные Управлениями Роспотребнадзора, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» субъектов СКФО, ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, ФКУЗ Дагестанская и Кабардино-Балкарская противочумные станции Роспотребнадзора. Обработку полученных данных проводили с использованием программы Excel.

Результаты и обсуждение

Структура заболеваемости ПОИ в СКФО имеет свои особенности. Из 16 нозологических форм природно-очаговых инфекционных болезней, подлежащих регистрации в Российской Федерации в соответствии с формой 1 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» [6], в СКФО ежегодно регистрируются: туляремия, лептоспироз, клещевой боррелиоз (КБ), псевдотуберкулез, кишечный иерсиниоз, Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ).

В 2015 г. на территории СКФО зарегистрировано 169 случаев заболевания ПОИ (в 2014 г. – 119), из которых 77,8 % были вызваны возбудителями бактериальной природы, 22,2 % – вирусной. По сравнению с 2014 г. количество инфекционных болезней, вызванных бактериями, возросло в 1,4 раза, а инфекций вирусной этиологии – в 1,2 раза [5]. Заболеваемость, как и в предыдущие годы, регистрировалась по актуальным для СКФО инфекциям, а также отмечены по одному случаю заболевания бешенством и впервые – гранулоцитарным анаплазмозом человека (ГАЧ) и моноцитарным эрлихиозом человека (МЭЧ).

В 2015 г. на территории СКФО наибольшее количество составили больные кишечным иерсиниозом – 39,6 % от числа всех ПОИ. Число больных (67) по сравнению с предыдущим годом повысилось на 42,5 %, интенсивный показатель заболеваемости на 100 тыс. населения (ИП) составил 2,4. Все больные проживали в Ставропольском крае (СК). Большинство больных было выявлено в Ставрополе (46, ИП – 10,95), кроме того, случаи заболевания зарегистрированы в 3 городах и 8 административных районах. Больные кишечным иерсиниозом так же, как и в 2014 г., выявлялись в течение всего года, вы-

раженной сезонности при регистрации случаев заболеваний не отмечено. Болели преимущественно взрослые (88,1 %, 59 человек), дети до 14 лет составили 11,9 %. Среди заболевших преобладали городские жители (83,6 %).

Заболеваемость кишечным иерсиниозом привлекает пристальное внимание органов здравоохранения и Роспотребнадзора, так как болезнь наносит значительный экономический ущерб и характеризуется тяжелым клиническим течением, возникновением рецидивов, трудностью клинической диагностики и возникновением групповых очагов.

Эпизоотологический мониторинг возбудителя кишечного иерсиниоза в 2015 г. проводился только в Кабардино-Балкарской Республике (КБР). Бактериологическим методом маркеры *Yersinia enterocolitica* у мышевидных грызунов не выявлены.

Псевдотуберкулез в СКФО с 2008 г. регистрируется только в Ставропольском крае, где больные выявляются ежегодно, в последние годы – на уровне спорадических случаев. В 2015 г. зарегистрировано 2 больных псевдотуберкулезом, один из которых – двухлетний ребенок, заболевший в результате употребления в пищу немытых фруктов и овощей. У взрослого заболевание протекало в среднетяжелой форме, у ребенка – в легкой.

Эпизоотологический мониторинг возбудителя псевдотуберкулеза также проводился только в КБР. Положительных результатов не получено.

Актуальной ПОИ продолжает оставаться клещевой боррелиоз (КБ). Количество выявленных случаев заболевания клещевым боррелиозом (болезнью Лайма) в СКФО в 2015 г. по сравнению с 2014 г. увеличилось на 53,8 %, всего зарегистрировано 40 больных в СК (ИП – 2,42), где болезнь отмечается ежегодно.

Большинство больных так же, как и в 2014 г., было зарегистрировано в Кисловодске (32 случая, ИП – 24,63). Больные КБ выявлялись в течение всего года, за исключением января–февраля, большинство случаев зарегистрировано в июне–августе. Среди больных был только один сельский житель, 97,5 % – городские жители. В возрастной структуре больных преобладали взрослые, дети до 14 лет составили 17,5 % (7 человек). С профессиональной деятельностью случаи заболевания не связаны, болели лица различных профессий и социального статуса. Все больные в анамнезе указали укус клещом.

Эпизоотологический мониторинг возбудителя КБ проводился в СК, Республике Дагестан (РД) и Карачаево-Черкесской Республике (КЧР).

В СК маркеры *Borrelia burgdorferi s.l.* выявлены на территории 8 административных образований. Наибольшее количество положительных проб (84 – 53,5 %), как и в предыдущие годы, отмечено в Кисловодске (2013 г. – 80 проб, 70,2 %; 2014 г. – 101 проба, 68,7 %). В целом инфицированность клещей *B. burgdorferi s.l.* осталась на уровне 2014 г. (36,4 %).

В РД на территории Левашинского района 16S рРНК *B. burgdorferi s.l.* выявлена в 1 пробе клещей. В 2014 г. маркеры возбудителя КБ обнаружены в 4 районах из 9 обследованных, зараженность клещей составляла 7,5 %. В КЧР положительных результатов не получено.

Одно из первых мест среди зоонозов по распространенности его природных очагов в мире, тяжести клинического течения, частоте летальных исходов и отдаленных клинических последствий занимает лептоспироз [1].

В 2015 г. в СКФО зарегистрировано 10 случаев заболевания лептоспирозом, из них 9 – в СК (ИП – 0,32), 1 – в КЧР (ИП – 3,47). Среди больных лептоспирозом в 2015 г. так же, как и в 2014 г., детей не выявлено. Случаи заболевания у взрослых регистрировались во всех возрастных группах и не имели зависимости от профессиональной деятельности. Большинство случаев (61 %) заражения лептоспирами были связаны с купанием в реке и рыбной ловлей и регистрировались в июле–августе. Все случаи заболевания были подтверждены методами специфической лабораторной диагностики. В среднетяжелой форме заболевание протекало у 70 % больных, в тяжелой – у 30 %. Легких форм течения болезни не отмечалось. У большинства больных отмечалась желтушная форма (60 %).

Эпизоотологический мониторинг природных очагов лептоспироза проводился в СК и КБР. В СК маркеры *Leptospira interrogans* обнаружены на территории 6 районов из 8 обследованных, зараженность мелких млекопитающих лептоспирами составила 4,2 % (в 2014 г. – 9,7 %). В КБР положительных результатов не получено.

Несмотря на то, что природный очаг туляремии занимает площадь большей части территории юга России, заболеваемость этой инфекционной болезнью регистрируется практически ежегодно в Ставропольском крае и Республике Дагестан. В 2015 г. в СК случаи заболевания туляремией не зарегистрированы (в 2014 г. – 3). В РД случай бубонной формы туляремии был выявлен у 53-летней жительницы Кизлярского района, госпитализированной с предварительным диагнозом «Внебольничная правосторонняя нижнедолевая пневмония». Заражение связывают с вдыханием пыли, вероятно, инфицированных кормов при кормлении крупного рогатого скота без применения средств защиты органов дыхания. Заболевание протекало в легкой форме.

Эпизоотологический мониторинг возбудителя туляремии проводился в СК, КБР и КЧР. Отмечено возрастание зараженности *Francisella tularensis* иксодовых клещей и мелких млекопитающих в 2 раза в СК. Маркеры *F. tularensis* обнаружены в 9 административных районах (в 2014 г. – в 3).

В КЧР маркеры возбудителя туляремии выявлены на территории 3 административных районов. Положительные пробы составили 7,4 %. В 2014 г. обследование на туляремию не проводилось. В КБР

в 2014–2015 гг. положительных результатов на туляремию не получено.

Одной из наиболее актуальных ПОИ в СКФО является Крымская геморрагическая лихорадка, которая ежегодно регистрируется в данном регионе с 1999 г. Заболеваемость КГЛ в Российской Федерации нарастала с 1999 г., наибольшее количество больных выявлено в 2006–2008 гг. В 2009–2010 гг. уровень заболеваемости снизился, а с 2012 г. вновь отмечается ее рост [4].

Сохраняется тенденция роста количества больных КГЛ и в СК, число которых увеличилось на 59,3 % по сравнению с 2014 г. (43 случая в 2015 г., 27 – в 2014 г.). Случаи заболевания регистрировались в 17 районах края с максимальным числом в Ипатовском – 11 (ИП – 18,27) и Нефтекумском – 6 (ИП – 9,16) районах. В течение последних 7 лет летальные исходы в СК не отмечены, что свидетельствует о раннем выявлении больных КГЛ и высоком уровне подготовленности медицинских работников.

В РД заболеваемость сохранилась на уровне предыдущего года (2 случая): по одному больному выявлено в Кизлярском (ИП – 1,41) и Тарумовском (ИП – 3,08) районах. В КЧР в предыдущие годы регистрировались только заносные случаи заболевания КГЛ. В 2015 г. выявлен один больной в Карачаевском районе, однако вновь заражение больного произошло за пределами республики – на территории СК.

Случаи заболевания КГЛ регистрировались с апреля по август, с максимальным выявлением 27 (58,7 %) больных в июне. Больные регистрировались во всех возрастных группах, за исключением детей до 14 лет. Среди всех больных отмечен только один городской житель (Будённовск, Ставропольского края). Большинство больных КГЛ составили лица мужского пола – 69,6 %.

При анализе данных эпидемиологического анамнеза выявлено, что 65,3 % больных отмечали укус клещом, в 30,4 % случаев заражение произошло при уходе за сельскохозяйственными животными, в 4,3 % случаев – при участии в сельскохозяйственных работах.

Лабораторно диагноз был подтвержден у 100 % больных методами ПЦР и ИФА. У 35 (76,1 %) больных КГЛ протекала в среднетяжелой форме, в тяжелой – у 9 (19,6 %), в легкой – у 2 (4,3 %). У 12 (26,1 %) больных отмечались проявления геморрагического синдрома.

Эпизоотологический мониторинг возбудителя КГЛ в 2015 г. в СКФО не проводился только в Чеченской Республике (ЧР) и Республике Северная Осетия-Алания (РСО-А).

Наиболее обширная территория (88,5 %) была охвачена эпизоотологическим обследованием в СК. Маркеры возбудителя КГЛ выявлены в 9 административных районах из 23 обследованных. Впервые наибольшее количество позитивных проб обнаружено в Апанасенковском районе – 46 (73 %). В предыдущие годы максимальное число положительных

проб отмечалось в Нефтекумском районе (2014 г. – 8). Большинство положительных проб (90 %) обнаружено у основного переносчика возбудителя КГЛ – клещей *Hyalomma marginatum*. В 2014 г. показатель вирусофорности клещей *H. marginatum* составлял 44,4 %. По сравнению с 2014 г. зараженность полевого материала возросла в 1,7 раза.

В РД циркуляция возбудителя КГЛ установлена на территории 7 обследованных районов. Вирусофорность иксодовых клещей по сравнению с 2014 г. (3,9 %) увеличилась в 6,7 раза и составила 26,3 %. Специалистами ФКУЗ «Дагестанская ПЧС» Роспотребнадзора эпизоотологическое обследование проведено и в Республике Ингушетия (РИ). На территории 3 районов (Сунженского, Назрановского и Джейрахского) выявлены маркеры возбудителя КГЛ. Вирусофорность клещей составила 26,1 %.

В КБР циркуляция возбудителя КГЛ установлена на территории 6 районов и в Нальчике. Инфицированность клещей составила 6,9 %, что выше показателя 2014 г. в 7,7 раза. На территории КЧР положительных результатов не получено. В 2014 г. маркеры возбудителя КГЛ были выявлены в 4 административных районах.

Всего на КГЛ исследовано 1377 проб полевого материала, маркеры выявлены в 4 субъектах СКФО, положительные пробы составили 8,1 %. Проведенный эпизоотологический мониторинг природного очага КГЛ свидетельствует о его сохраняющейся высокой активности, в связи с чем следует усилить контроль за акарицидными обработками пастбищ и сельскохозяйственных животных, а также правильностью сроков их проведения.

Одной из серьезных проблем как здравоохранения, так и ветеринарии остается бешенство. В последние годы существенно ухудшилась ситуация по бешенству, ежегодно возрастает число заболеваний среди животных. Увеличилось количество выявленных эпизоотических очагов на территории субъектов Центрального, Приволжского и Южного федеральных округов Российской Федерации.

В 2015 г. в Российской Федерации зарегистрировано 6 случаев бешенства, в том числе 1 в СКФО (Будённовский район Ставропольского края). Диагноз подтвержден методом ПЦР (забор материала для исследования проведен на 5-е сутки госпитализации). Причиной заболевания явился укус домашней собаки. Эпизоотологический мониторинг возбудителя бешенства в 2015 г. в СКФО не проводился.

Впервые в 2015 г. в СКФО (Ставропольский край) зарегистрировано по одному случаю заболевания гранулоцитарным анаплазмозом человека (ГАЧ) и моноцитарным эрлихиозом человека (МЭЧ). Оба случая зарегистрированы в июне у жителей Ставрополя, причиной которых был контакт с клещом (снятие клещей с домашних животных и раздавливание их в руках). Диагноз подтвержден методом ИФА.

Эпизоотологический мониторинг возбудителей

ГАЧ и МЭЧ проводился в СК и РД. В СК маркеры возбудителя ГАЧ и МЭЧ не выявлены. В 2014 г. ДНК возбудителя ГАЧ была обнаружена в пробах клещей на территории трех районов, их зараженность *Anaplasma phagocytophilum* составляла 9,4 %. ДНК возбудителя МЭЧ была выявлена в одной пробе клещей в Шпаковском районе.

В РД обследование на ГАЧ проведено на территории 2 районов. ДНК возбудителя ГАЧ обнаружена в 3 (75 %) пулах клещей (в Кировском и Магарамкентском районах). В 2014 г. зараженность клещей *A. phagocytophilum* составляла 8,3 %. При исследовании 2 пулов клещей на наличие ДНК возбудителя МЭЧ оба пула показали положительный результат. В 2014 г. мониторинг возбудителя МЭЧ не проводился.

Таким образом, проведенный нами анализ эпизоотологической обстановки в 2015 г. на территории Северо-Кавказского федерального округа показал, что наибольшее количество (164) больных природно-очаговыми инфекциями зарегистрировано в Ставропольском крае: кишечным иерсиниозом – 67 больных, Крымской геморрагической лихорадкой – 43, клещевым боррелиозом (болезнью Лайма) – 40, лептоспирозом – 9, псевдотуберкулезом – 2, по одному больному – бешенством, гранулоцитарным анаплазмозом человека и моноцитарным эрлихиозом человека. Всего выявлено 8 нозологических форм ПОИ, в том числе, бактериальной этиологии – 6 (75 %), вирусной – 2 (25 %). В Республике Дагестан зарегистрированы больные двумя нозологическими формами ПОИ: 2 – КГЛ, 1 – туляремией. В Карачаево-Черкесской Республике также выявлены 2 нозологические формы ПОИ: по одному больному лептоспирозом и КГЛ (заносный случай из СК). В других субъектах СКФО больные природно-очаговыми инфекциями не регистрировались. Возможно, это связано с недостаточным уровнем лабораторной диагностики.

В 2015 г. в СКФО всего исследовано на наличие маркеров ПОИ 8502 пробы полевого материала. Исследования проводились не только на нозологические формы ПОИ, по которым регистрировались больные (таблица).

Наиболее обширный эпизоотологический мониторинг проведен в СК: (по 10 нозологиям), в КБР – по 6, в РД – по 5, в КЧР – по 3, в РИ – по 2 (исследования проведены специалистами ФКУЗ «Дагестанская противочумная станция» Роспотребнадзора), в РСО-А – по 1 нозологии; в ЧР – не проводился (как и в 2013–2014 гг.) В целом эпизоотологическое обследование проводилось по 12 нозологическим формам ПОИ, маркеры выявлены по 10.

Следует отметить, что в целом эпизоотологический мониторинг осуществлялся на не достаточном уровне, в связи с этим в 2016 г. необходимо провести более обширное и углубленное эпизоотологическое обследование территорий субъектов СКФО.

Анализ эпизоотологической и эпизоотологиче-

Объем и результаты эпизоотологического мониторинга ПОИ в 2015 г. в субъектах СКФО

Субъект РФ	Нозологическая форма ПОИ (количество исследованных проб/количество положительных проб)															
	ЛЗН	КГЛ	ГЛПС	Лихорадка Ку	КВЭ	КБ	Лептоспироз	Тяжелая	КПЛ	ГЧ	МЭЧ	Псевдотуберкулез	Кишечный иерсиниоз	Всего проб	Кол-во нозологий	Кол-во выявленных нозологий
Ставропольский край	668/3	870/63*	89/4	682/62	х	431/157*	237/10*	1674/ 42	352/98	56/0*	56/0*	х*	х*	5115	10	8
Кабардино-Балкарская Республика	137/0	343/22	х	х	х	х	684/0	375/0	х	х	х	684/0	684/0	2907	6	1
Карачаево-Черкесская Республика	х	61/0*	х	х	х	7/0	х*	122/9	х	х	х	х	х	190	3	1
Республика Дагестан	х	80/21*	х	85/40	х	1/1	х	х*	х	4/3	2/2	х	х	172	5	5
Республика Северная Осетия-Алания	х	х	х	х	87/0	х	х	х	х		х	х	х	87	1	0
Чеченская Республика	Эпизоотологический мониторинг не проводился															
Республика Ингушетия	х	23/6	х	8/5	х	х	х	х	х	х	х	х	х	31	2	2
Итого	805/3	1377/112	89/4	775/107	87/0	439/158	921/10	2171/51	352/98	60/3	58/2	684/0	684/0	8502		

Примечания: * – зарегистрированы больные; х – эпизоотологический мониторинг не проводился; ЛЗН – лихорадка Западного Нила; ГЛПС – геморрагическая лихорадка с почечным синдромом; КВЭ – клещевой вирусный энцефалит; КПЛ – клещевые пятнистые лихорадки.

ской обстановки по природно-очаговым инфекционным болезням в Северо-Кавказском федеральном округе свидетельствует об их актуальности и необходимости постоянного мониторинга их природных очагов, также особое внимание следует уделить вопросам специфической и неспецифической профилактики данных болезней.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ананьина Ю.В. Лептоспирозы людей и животных: тенденции распространения и проблемы профилактики. *Эпидемиол. и вакцинопрофилактика*. 2010; 2 (51): 3–6.
2. 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; 108:16–8.
3. Василенко Н.Ф., Ермаков А.В., Малецкая О.В., Куличенко А.Н. Эпидемиологическая обстановка по трансмиссивным природно-очаговым инфекциям в регионе Кавказских Минеральных Вод. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 3:16–19.
4. Волюнкина А.С., Котенев Е.С., Лисицкая Я.В., Малецкая О.В., Шапошникова Л.И., Куличенко А.Н. Крымская геморрагическая лихорадка в Российской Федерации в 2014 г., прогноз эпизоотологической обстановки на 2015 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2015; 1:42–5.
5. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф., Манин Е.А., Прислегина Д.А., Дубянский В.М., Григорьев М.П. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном, Северо-Кавказском и Крымском федеральных округах в 2015 г. (Аналитический обзор). Ставрополь: ООО «Литера»; 2016. 96 с.
6. Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях (Форма 1) за январь – декабрь 2014 URL: http://www.fcgie.ru/5/inform/data_2014-12-01.xls

[ru/5/inform/data_2014-12-01.xls](http://www.fcgie.ru/5/inform/data_2014-12-01.xls) (дата обращения: 07.02.2015).

References

1. Anan'ina Yu.V. [Leptospiroses in humans and animals: trends of dissemination and problems of prophylaxis]. *Epidemiol. Vaksino profilakt.* 2010; 2(51):3–6.
2. Varfolomeeva N.G., Ermakov A.V., Vasilenko N.F., Shkarlet G.P., Maletskaya O.V., Kireytseva 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.
3. 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]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 3:16–9.
4. Volynkina A.S., Kotenev E.S., Lisitskaya Ya.V., Maletskaya O.V., Shaposhnikova L.I., Kulichenko A.N. [Crimean hemorrhagic fever in the territory of the Russian Federation in 2014, prognosis of epidemiological situation for 2015]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2015; 1:42–5.
5. Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Vasilenko N.F., Manin E.A., Prislegina D.A., Dubyansky V.M., Grigor'ev M.P. [Epidemiological situation on natural-focal infections in the Southern, North-Caucasian, and Crimean Federal Districts in 2015 (Analytical Review)]. Stavropol; 2016.
6. [Information on infectious and parasitic diseases (Form 2) over the period of January–December, 2014] (cited 07 Feb 2015). Available from: http://www.fcgie.ru/5/inform/data_2014-12-01.xls.

Authors:

Vasilenko N.F., Maletskaya O.V., Manin E.A., Prislegina D.A., Taran T.V., Dubyansky V.M., Shaposhnikova L.I., Volynkina A.S., Lisitskaya Ya.V., Kotenev E.S., Grizhebovsky G.M., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Об авторах:

Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Манин Е.А., Прислегина Д.А., Таран Т.В., Дубянский В.М., Шапошникова Л.И., Волюнкина А.С., Лисицкая Я.В., Котенев Е.С., Грижебовский Г.М., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Поступила 27.06.16.

Т.В.Козлова¹, А.С.Игнат'кова¹, Э.М.Дорофеев¹, В.П.Попов², Д.С.Орлов³

РАСПРОСТРАНЕНИЕ, ЧИСЛЕННОСТЬ И ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ КЛЕЩА *DERMACENTOR RETICULATUS* НА ТЕРРИТОРИИ ТУЛЬСКОЙ ОБЛАСТИ

¹ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Тульской области», Тула, Российская Федерация;
²ФКУЗ «Противочумный центр», Москва, Российская Федерация; ³МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва
Российская Федерация

Цель работы. Обобщение многолетних данных о динамике ареала и численности лугового клеща *D. reticulatus* на территории Тульской области. **Материалы и методы.** Обработаны литературные источники, архивные документы и данные собственных наблюдений в 1949–2013 гг. В работе использованы компьютерные программы Google Earth, база данных ГИС-пакета MapInfo Professional 11.5. **Результаты и выводы.** Выявлено, что в последнее десятилетие *D. reticulatus* встречается не только в лесной и примыкающей к ней западной части лесостепной зоны, но и в восточной и юго-восточной частях лесостепи. Уточнены территории с равномерно высокой плотностью заселения и разреженным распределением клещей этого вида. Установлено, что в лесолуговых участках лесной и аналогичных участках лесостепной зоны в настоящее время обилие клещей не имеет существенных различий. Выявлена корреляция между характером выделения культур возбудителя *F. tularensis* от *D. reticulatus* и интенсивностью эпизоотического процесса туляремийной инфекции, что позволяет своевременно проводить целевое эпизоотологическое обследование и регламентировать профилактические мероприятия.

Ключевые слова: иксодовые клещи, ареал, численность, природно-очаговые инфекции.

Корреспондирующий автор: Татьяна Викторовна Козлова, e-mail: ooi.fbuz@mail.ru, cgig@fbuz71.ru.

T.V.Kozlova¹, A.S.Ignat'kova¹, E.M.Dorofeev¹, V.P.Popov², D.S.Orlov³

Dissemination, Abundance Rates and Epizootiological Significance of the Tick *Dermacentor reticulatus* in the Territory of the Tula Region

¹Center of Hygiene and Epidemiology in the Tula Region, Tula, Russian Federation; ²Plague Control Center, Moscow, Russian Federation; ³M.V.Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Objective of the study is to summarize long-term data on the dynamics of areal and abundance rates of the prairie tick, *D. reticulatus* in the territory of the Tula Region. **Materials and methods.** Processed and reviewed have been literature sources, archive documents, and results of personal observations over a period of 1949–2013. Applied have been computer-based software products Google Earth, MapInfo Professional v. 11.5. wrapped in GIS Software Package. **Results and conclusions.** It is determined that over the last decade *D. reticulatus* has been found not only in the forest and adjacent western forest-steppe zone, but also in the eastern and south-eastern forest-steppe area. Specified have been the territories with uniformly high density of population and sparse distribution of *D. reticulatus* ticks. It is established that nowadays abundance rates of the ticks show no substantial differences both in the forest-meadow areas of the forest zone, and similar areas of the forest-steppe zone. Identified has been correlation between the nature of *F. tularensis* culture isolation from *D. reticulatus* and intensity of epizootic process of tularemia infection, which allows for in-time targeted epizootiological survey and regulation of preventive activities.

Key words: Ixodidae ticks, areal, abundance rates, natural-focal infections.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Tatiana V. Kozlova, e-mail: ooi.fbuz@mail.ru, cgig@fbuz71.ru.

Citation: Kozlova T.V., Ignat'kova A.S., Dorofeev E.M., Popov V.P., Orlov D.S. Dissemination, Abundance Rates and Epizootiological Significance of the Tick *Dermacentor reticulatus* in the Territory of the Tula Region. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 4:20–24. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-20-24

Изучение фауны иксодовых клещей, их распространения, численности, эпизоотологического и эпидемиологического значения в краевой инфекционной патологии на территории Тульской области начато с 1943 г. и продолжается до настоящего времени. Фоновыми видами здесь являются три вида пастбищных иксодовых клещей: *Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794), *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758), *I. trianguliceps* (Birula, 1895) и один гнездовно-норовый – *I. crenulatus* (Koch, 1844). Доминирующим и повсеместно распространенным является клещ *D. reticulatus*. В сборах на флаг его индекс доминирования (ИД) достигает 97,3 %, на скоте – 59,0 %.

Средние многолетние весенние показатели численности на флаг в закустаренных лесолуговых стациях лесной зоны области высокие – 86 экз./фл.-км [4]. Этот вид имеет в основном эпизоотологическое значение, являясь резервуаром *Francisella tularensis holarctica* и возбудителей других опасных инфекционных болезней: эризипелоида, листериоза, Лайм боррелиоза и т.д. (таблица). Заболевания туляремией, связанные с передачей инфекции луговым клещом, регистрировались на территории области не часто [9].

Территория Тульской области занимает площадь 25,7 тыс. км². Расположена в северо-восточной

Участие клещей *D. reticulatus* в циркуляции возбудителей природно-очаговых инфекций в ландшафтных зонах и административных районах Тульской области в 1943–2013 гг.

Зона	Административный район	Инфекции					
		туляремия	лайм боррелиоз	эризипелоид	листериоз	бабезиоз	гранулоцитарный анаплазмоз
Лесная	1. Алексинский	+	+		+		
	2. Венёвский	+				+	
	3. Дубенский	+					
	4. Заокский	+		+			
	5. Ленинский	+		+	+	+	
	6. Одоевский	+					
	7. Суворовский	+				+	
	8. Щёкинский	+					+
	9. Ясногорский	+					
Лесостепная	10. Ефремовский		+				
	11. Каменский		+				
	12. Киреевский						+
	13. Одоевский				+		
	14. Чернский			+			
	15. Щёкинский			+			

части Среднерусской возвышенности ($52^{\circ}57' - 54^{\circ}49' \text{ N}$, $35^{\circ}57' - 38^{\circ}56' \text{ E}$) в двух природных зонах Среднерусской провинции: широколиственных лесов и лесостепи [1, 8]. На большей ее части складываются оптимальные условия для обитания клеща *D. reticulatus* [10]. Особенно четко это проявляется в лесной зоне и прилегающих к ней участках на западе области. Восточные и юго-восточные районы, расположенные в лесостепной зоне и занятые, в основном, землями сельскохозяйственного назначения, до конца прошлого столетия были практически свободными от этого вида клеща [3, 7]. Единичные находки регистрировались в Богородицком, Воловском и Ефремовском районах, около населенных пунктов Андрияновка, Большое Огарёво, Волчья Дубрава Тёпло-Огарёвск, населенных пунктов Белолипки и Богучарово Киреевского района. В соответствии с таким распределением обозначалась роль клеща в эпизоотологии природно-очаговых инфекций, планировалась и проводилась работа по их профилактике. В последнее десятилетие на фоне роста численности *D. reticulatus* [6], обусловленного синергическим воздействием на популяции клещей потепления климата и резким изменением хозяйственной деятельности человека [8], граница ареала этого вида начала смещаться к югу. В этой связи большое внимание было уделено дальнейшему изучению распределения популяций этого важного в эпизоотологическом отношении вида. Уточнение ареала и особенностей размещения, наблюдения за динамикой численности лугового клеща позволили внести некоторые дополнения в имеющиеся данные по краевой эпизоотологии туляремии [3, 5, 7] и других природно-очаговых инфекций, а также пополнить сложившийся комплекс мероприятий по профилактике природно-очаговых инфекций.

Материалы и методы

Изучение ареала клеща *D. reticulatus* проводилось на основании материалов акарологических сборов со скота (1949–1985 гг.) и на флаг (1976–2013 гг.) в 23 административных районах области. Данные сборов дополнялись сведениями, полученными в 1998–2013 гг. при обращении населения по поводу присасывания клещей.

При помощи программы Google Earth определены координаты для каждой точки сбора клещей. Вся информация сведена в базу данных в ГИС пакете MapInfo Professional 11.5. На основе базы данных созданы слои ГИС: «места находок *D. reticulatus* в 1943–2002 гг.» и «места находок *D. reticulatus* в 2003–2013 гг.». В качестве картографической основы для анализа пространственного размещения клещей использовали деление области на зональные типы растительности [2, 12]. В результате построена карта, отражающая распространение клещей *D. reticulatus* на территории Тульской области.

Динамика численности лугового клеща отслеживалась на двух стационарах, расположенных на плакорных закустаренных лесолуговых участках центральной и восточной частей широколиственных лесов с 1976 по 2013 год. Единицей учета служило число клещей на 1 флаго-километр (экз./фл.-км). Клещей учитывали в период их весенней (апрель–май) и осенней (август–октябрь) активности. За сезон на каждом стационаре проходили по 8–15 учетных километров. Численность *D. reticulatus* в закустаренных лесолуговых участках в разных частях лесной и лесостепной зон определялась в период максимальной активности [11] в весенние сезоны 1990–1995 и 2012 гг. на стационарах и 6 пунктах многолетних наблюдений (ПМН). Разница во времени между учета-

ми на стационарах и ПМН составляла 0,5–3 сут.

Результаты и обсуждение

Луговой клещ *D. reticulatus* – типичный представитель акарофауны лесолуговых и пойменно-луговых стаций лиственных и смешанных лесов [10]. По долинам рек проникает в лесостепную и степную зону. Предпочитает луговые стации и кустарниковые заросли. В лесах населяет открытые прогреваемые участки – опушки леса, вырубки, луга.

На территории области распространение клеща также связано с растительностью луговых формаций, приуроченных к лесам, площадь которых исторически менялась. В прошлом леса занимали большую часть современной Тульской области. К концу XVIII века лесистость снизилась до 17 %, в настоящее время – до 14,1 % [8], составляя 3,6 тыс. км². Распределяются леса неравномерно. В северо-западных районах они занимают до 28 % площади и представлены хвойно-широколиственными лесами «таежного» варианта. Такие леса сформированы как хвойными (ель европейская, сосна лесная), так и лиственными породами. Основная часть лесных массивов (86,8 %) занята лиственными лесами вторичного происхождения, и только 13,2 % – хвойными [1, 4, 8]. Травяной покров смешанных, широколиственных и мелколиственных лесов на месте вырубленных широколиственных сформирован с участием видов дубравного широко-травья и луговых видов. На юго-востоке области лесистость снижается до 3–5 %. Здесь леса представлены остепненными дубравами, приуроченными к балочным понижениям и долинам рек, реже встречаются в виде отдельных островов на водоразделах. В составе травяного яруса таких дубрав высока доля лугово-степных видов. Сравнение лесных формаций по составу травяного яруса позволяет констатировать постепенную смену сообществ травянистых мезофитов, характерных для хвойно-широколиственных и широколиственных лесов, на мезоксерофиты и ксерофиты на юго-востоке. На юго-востоке области уже преобладает типичная луговая степь. Развитая речная сеть Тульской области также способствует формированию типичных мест обитания луговых клещей – обширных пойменных биотопов с луговой и кустарниковой растительностью.

Такое разнообразие биотопов создало благоприятные условия для равномерного, с высокой плотностью заселения территории клещом *D. reticulatus*, особенно в пределах лесной зоны. Имеющийся при этом тренд почвенно-климатических условий с северо-запада области на юг и юго-восток обеспечил оптимальные условия для существования клеща в приграничных с хвойно-широколиственными лесами территориях вдоль западной границы леса. Это подтверждается тем фактом, что в лесной зоне площадью около 9,8 тыс. км² зарегистрировано 810 точек нахождения клещей, в западной части лесостепной зоны площадью 2,7 тыс. км² – 176. Внесенные

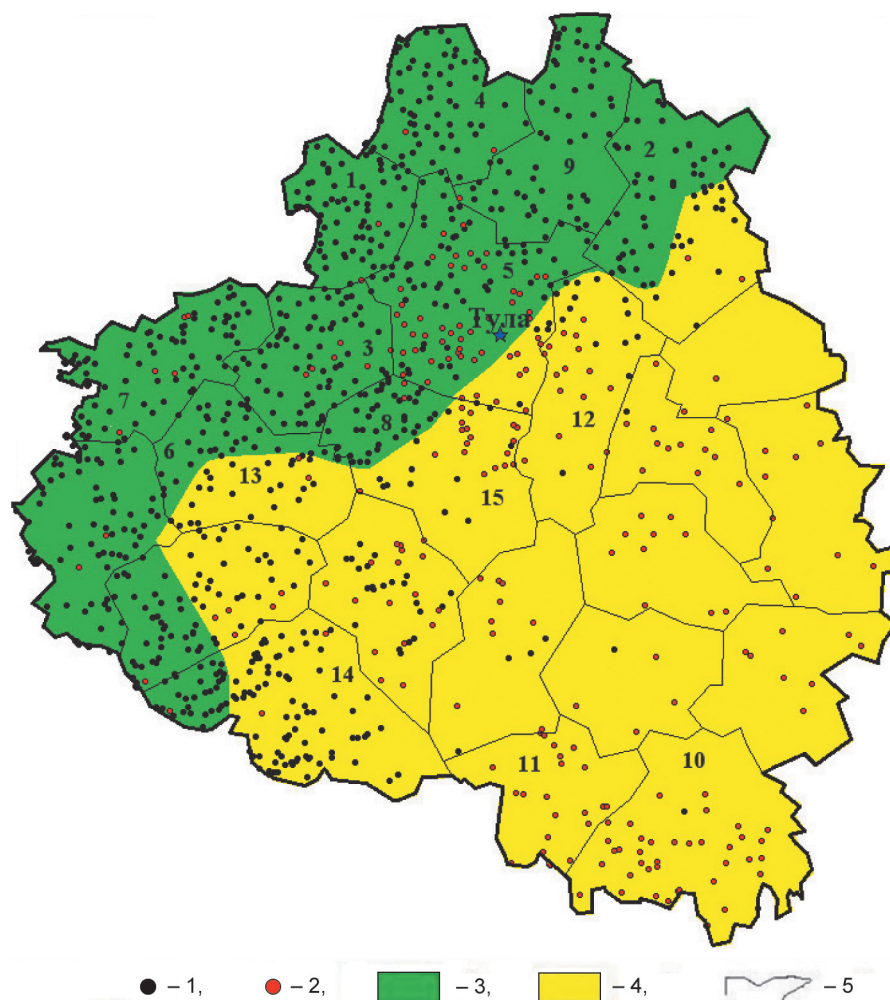
при изучении современного ареала лугового клеща новые точки находок еще больше подчеркнули равномерность распределения биотопов в типичных для него местах обитания (рисунок).

Смещение в последнее десятилетие границ распространения этого вида к югу выразилось в значительном увеличении количества новых точек находок клещей данного вида в восточной и юго-восточной части лесостепной зоны площадью 13,2 тыс. км², с единичных до 230. Появление новых мест обитания с достаточно высокой плотностью заселения *D. reticulatus* обусловлено формированием травянистых мезофитных сообществ на зарастающих залежах в отдельных частях Ленинского и Щёкинского районов, тяготеющих к лесной зоне области, а также в Киреевском, Богородицком, Кимовском, Плавском, Тёпло-Огарёвском и Ефремовском районах лесостепной зоны. При этом плотность заселения в этих районах практически одинакова (рисунок). В остальной части лесостепной зоны заселение клещами носит более разреженный характер. В целом биотопы клеща данного вида в этой зоне области приближены к окрестностям остепненных балочных и нагорных дубрав, лесопосадкам и закустаренным поймам рек. Исходя из полученных данных, видно, что благоприятные для обитания клещей биотопы приурочены к мезофитным травянистым сообществам луговых формаций, которые сформированы как среди лесной, так и лесостепной растительности.

Вся территория Тульской области энзоотична по туляремии. Здесь преобладают природные очаги луго-полевого типа [4, 7]. По данным эпизоотологического обследования 1942–2013 гг. выявлено 532 эпизоотийных участка этой инфекции, выделено 1157 культур *F. tularensis* (в лесной зоне 204 – выделено 418 культур, в лесостепной 328 – выделено 739 культур). Заселенность луговым клещом мест проявления туляремийной инфекции с высоким лоймопотенциалом в лесной зоне достигает 100 %, в лесостепной зоне – 67 %.

Для изучения природных очагов туляремии, помимо знания ареала и особенностей размещения резервуара инфекции, необходимы данные по многолетней динамике численности клещей, в том числе в пределах разных частей лесной и лесостепной зон, а также характера выделения культур возбудителя *F. tularensis* от них.

По результатам мониторинга численности *D. reticulatus* в течение 38 лет на двух стационарах – «элементарных» очагах туляремии – установлено, что колебания численности носят не стационарный, а полициклический характер [6]. Наиболее высокая численность лугового клеща отмечалась в 1980–1994 гг. (первый период) и 2007–2013 гг. (часть третьего периода), когда она держалась на уровне от 84 до 154 экз./фл.-км. Между этими периодами в 1995–2006 гг. наблюдалось длительное (12 лет) и глубокое снижение численности клещей до среднего уровня – 43 экз./фл.-км, т.е. примерно в 2–4 раза ниже, чем в два других



Распространение клещей *D. reticulatus* на территории Тульской области:

1 – места находок *D. reticulatus* в 1943–2002 гг.;
2 – места находок *D. reticulatus* в 2003–2013 гг.;
3 – лесная, 4 – лесостепная; 5 – границы административных районов и их номера (см. таблицу)

периода [6]. Учеты, проведенные в период подъема численности клещей (1990–1995, 2012 гг.), выявили отсутствие существенных различий в обилии клещей в закустаренных лесолуговых участках в разных частях лесной и лесостепной зоны. Среднее обилие клещей в эти годы в смешанных лесах на северо-западе лесной зоны составляло 137,0 экз./фл.-км (максимально 272,0), в широколиственных лесах центральной части этой зоны – 172,0 экз./фл.-км (максимально 245,0), в восточной части – 134,0 экз./фл.-км (максимально 228,0). В северо-восточной части области, представленной мелколиственными лесами на месте коренных широколиственных лесов, этот показатель составил 88,0 экз./фл.-км (максимально 117,0). В лесных массивах восточной части лесостепной зоны (Богородицкий район) в 2012 г. оно достигало 112 экз./фл.-км и было сопоставимо с обилием клещей в лесной зоне. Исключение на данный момент имеет территория луговых степей на крайнем юго-востоке, где встречаются единичные клещи.

В ходе наших наблюдений за активностью очагов туляремии луго-полевого типа в лесной зоне области с 1943 по 2013 год установлено, что первый период высокой активности элементарных очагов туляремии по всей зоне (1977–1995 гг.) совпал с периодом подъема численности клещей и их инфицированности. Отражением этого процесса явилось бо-

лее частое выделение на стационарах и по всей зоне в течение всего указанного периода культур возбудителя *F. tularensis* от *D. reticulatus* – 43 культуры (28 культур выделено от клещей данного вида, собранных на стационарах). В двух «элементарных» очагах подтверждено выделение возбудителя от клещей с интервалом в 34–36 лет. В периоды снижения активности очагов (1943–1974, 1996–2013 гг.) выделено 7 культур.

Таким образом, на территории Тульской области к настоящему времени произошло расширение ареала клеща *D. reticulatus* – резервуара возбудителя *F. tularensis* – за счет территорий лесостепной зоны, ранее практически свободных от них. Отсутствие существенных различий в обилии клещей в закустаренных лесолуговых участках лесной и лесостепной зоны подтверждает, что благоприятные условия, соответствующие экологическим требованиям вида, существуют на значительной территории области. Необходимо осуществлять регулярный мониторинг численности, инфицированности, пространственного размещения клещей *D. reticulatus*, результаты которого кладутся в основу анализа и прогноза состояния очагов туляремии луго-полевого типа, а также позволяют обосновывать содержание и объемы профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алюшин А.И. Растительность Тульского края. Тула; 1988. 144 с.
2. Волкова Е.М. Методическое пособие для лабораторно-практических работ по курсу «Биогеография». Часть 1. Ботаническая география. Тула; 2006. 94 с.
3. Кателина А.Ф. О распространении и биологии норового клеща *Ixodes trianguliceps* Vig. в Тульской области. *Зоол. журн.* 1960; XXXIX(11):1612–7.
4. Козлова Т.В., Дорофеев Э.М., Смольянинова О.Л., Попов В.П. Распространение, численность и эпидемиологическое значение клеща *Ixodes ricinus* на территории Тульской области. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 2:58–61.
5. Козлова Т.В., Шишкина Л.И., Смольянинова О.Л. Роль гаммазовых клещей в циркуляции возбудителя туляремии на территории Тульской области. *РЭТ инфо.* 2005; 2:21–4.
6. Коротков Ю.С., Козлова Т.В. Динамика численности клеща *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae) в лесолуговых станциях Тульской области. В кн.: Современные проблемы зоологии и паразитологии. Воронеж; 2015. С. 137–141.
7. Левачёва З.А., Лобковский А.Г., Тихоненко В.В., Белова М.А., Долотова М.П., Панина Т.В., Бобылкова Т.В., Корнеева С.А., Мясников Ю.А., Иванова А.А., Жуков В.И., Баранчиков В.Д., Минченко Т.В., Подъёмщикова Л.Г. Активизация природных очагов туляремии луго-полевого и степного типа на территории Тульской области в 1977–1978 гг. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1982; 3:36–40.
8. Овчинников Ю.И., Овчинников О.Ю. Физическая география Тульской области. Тула; 2000. 143с.
9. Олсуфьев Н.Г., Руднев Г.П. Туляремия. М., 1960. 459с.
10. Померанцев Б.И. Фауна СССР, паукообразные. Т. IV, вып. 2, Иксодовые клещи (Ixodidae). М.; 1950. 224 с.
11. Разумова И.В. Активность клещей *Dermacentor reticulatus* Fabr (Ixodidae) в природе. *Мед. паразитол. и паразитарн. бол.* 1998; 4:8–14.
12. Шереметьева И.С., Хорун Л.В., Щербаков А.В. Конспект флоры сосудистых растений Тульской области. Тула; 2008. 274 с.

References

1. Alyushin A.I. [Flora of the Tula Region]. Tula; 1988. 144 p.
2. Volkova E.M. [Methodological aids for laboratory-practical works

- on “Biogeography” course. Part I. Botanical Geography]. Tula; 2006. 94 p.
3. Katelina A.F. [Concerning dissemination and biology of the burrow tick, *Ixodes trianguliceps* Bir. in the Tula Region]. *Zool. Zh.* 1960; XXXIX(11):1612–7.
4. Kozlova T.V., Dorofeev E.M., Smol'yaninova O.L., Popov V.P. [Distribution, abundance, and epidemiological significance of *Ixodes ricinus* ticks in the territory of the Tula Region]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 2:58–61.
5. Kozlova T.V., Shishkina L.I., Smol'yaninova O.L. [The role of gamma-side ticks in tularemia agent circulation in the territory of the Tula Region]. *RAT-info.* 2005; 2:21–4.
6. Korotkov Yu.S., Kozlova T.V. [Dynamics of abundance rates of *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae) ticks in the forest-meadow stations of the Tula Region]. In: [Current Problems of Zoology and Parasitology]. Voronezh; 2015. P. 137–41.
7. Levacheva Z.A., Lobkovsky A.G., Tikhonenko V.V., Belova M.A., Dolotova M.P., Panina T.V., Bobylkova T.V., Korneeva S.A., Myasnikov Yu.A., Ivanova A.A., Zhukov V.I., Baranchikov V.D., Minchenko T.V., Pod'emshchikova L.G. [Activation of natural tularemia meadow-field and steppe type foci in the territory of the Tula Region in 1977–1978]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1982; 3:36–40.
8. Ovchinnikov Yu.I., Ovchinnikov O.Yu. [Physical Geography of the Tula Region]. Tula; 2000. 143 p.
9. Olsuf'ev N.G., Rudnev G.P. [Tularemia]. M.; 1960. 459 p.
10. Pomerantsev B.I. [Fauna of the USSR, Arachnids. Vol. IV, Issue 2, Ixodes Ticks (Ixodidae)]. M.; 1950. 224 p.
11. Razumova I.V. [Activity of *Dermacentor reticulatus* Fabr. (Ixodidae) ticks in natural environments]. *Med. Parazitol. Parazitarn. Bol.* 1998; 4:8–14.
12. Sheremet'eva I.S., Khorun L.V., Shcherbakov A.V. [Outline of Vascular Plants Flora of the Tula Region]. Tula; 2008. 274 p.

Authors:

- Kozlova T.V., Ignat'kova A.S., Dorofeev E.M. Center of Hygiene and Epidemiology in the Tula Region. 25, Mira St., Tula, 300045, Russian Federation. E-mail: ooi.fbuz@mail.ru, cgig@fbuz71.ru.
Popov V.P. Plague Control Center. 4, Musorgskogo St., Moscow, 127490, Russian Federation. E-mail: protivochym@nlm.ru.
Orlov D.S. M.V.Lomonosov Moscow State University. 1, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation. E-mail: orlovds@list.ru.

Об авторах:

- Козлова Т.В., Игнат'кова А.С., Дорофеев Э.М. Центр гигиены и эпидемиологии в Тульской области. Российская Федерация, 300045, г. Тула, ул. Мира, д. 25. E-mail: ooi.fbuz@mail.ru, cgig@fbuz71.ru.
Попов В.П. Противочумный центр. Российская Федерация, 127490, г. Москва, ул. Мусоргского, 4. E-mail: protivochym@nlm.ru.
Орлов Д.С. МГУ имени М.В.Ломоносова. Российская Федерация, 119991, г. Москва, Ленинские горы, 1. E-mail: orlovds@list.ru.

Поступила 21.09.16.

А.Н.Матросов¹, Л.В.Щучинов⁵, А.В.Денисов², А.И.Мищенко², Е.Н.Рождественский², А.А.Слудский¹,
А.С.Раздорский¹, Е.П.Михайлов², И.Н.Шарова¹, А.М.Поршаков¹, А.А.Кузнецов¹, Н.В.Попов¹,
Е.В.Чипанин³, В.М.Корзун³, Е.Г.Токмакова³, С.В.Балахонov³, С.А.Щербакова¹, А.А.Макин⁶,
Г.С.Архипов⁴, В.В.Кутырев¹

НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА ЧУМЫ В ГОРНО-АЛТАЙСКОМ ВЫСОКОГОРНОМ ПРИРОДНОМ ОЧАГЕ В 2016 г.

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; ²ФКУЗ «Алтайская противочумная станция», Горно-Алтайск, Российская Федерация; ³ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российская Федерация; ⁴ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Алтай», Горно-Алтайск, Российская Федерация; ⁵Управление Роспотребнадзора по Республике Алтай, Горно-Алтайск, Российская Федерация; ⁶БУЗ «Кош-Агачская Центральная районная больница» Кош-Агач, Республика Алтай, Российская Федерация

Цель работы. Обоснование проведения, оценка условий и анализ результатов мероприятий по неспецифической профилактике чумы на эпизоотической территории. **Материалы и методы.** Использовались архивные и оперативные материалы Алтайской ПЧС, Иркутского НИПЧИ, РосНИПЧИ «Микроб», ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Алтай» и Управления Роспотребнадзора по Республике Алтай, литературные источники. Пространственный анализ проведен с применением ГИС-технологий. **Результаты и выводы.** Согласованные и скоординированные действия учреждений Роспотребнадзора, медицинских и ветеринарных учреждений, органов исполнительной власти на местах позволили провести комплекс профилактических и противоэпидемических мероприятий по предотвращению распространения чумы на территории Республики Алтай в 2016 г. Показана необходимость расширения объема оперативных мероприятий и научных исследований в очаге с привлечением современного арсенала методов и средств.

Ключевые слова: природный очаг чумы, эпизоотологический мониторинг, профилактические и противоэпидемические мероприятия.

Корреспондирующий автор: Александр Николаевич Матросов, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

A.N.Matrosov¹, L.V.Shchuchinov⁵, A.V.Denisov², A.I.Mishchenko², E.N.Rozhdestvensky²,
A.A.Sludsky¹, A.S.Razdorsky¹, E.P.Mikhailov², I.N.Sharova¹, A.M.Porshakov¹, A.A.Kuznetsov¹,
N.V.Popov¹, E.V.Chiparin³, V.M.Korzun³, E.G.Tokmakova³, S.V.Balakhonov³, S.A.Shcherbakova¹,
A.A.Makin⁶, G.S.Arhipov⁴, V.V.Kutyrev¹

Non-Specific Prophylaxis of Plague in the Gorno-Altai High-Mountain Natural Focus in 2016

¹Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; ²Altai Plague Control Station, Gorno-Altai, Russian Federation; ³Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation; ⁴Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Altai, Gorno-Altai, Russian Federation; ⁵Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Altai, Gorno-Altai, Russian Federation; ⁶"Kosh-Agach Central Regional Hospital", Kosh-Agach, Republic of Altai, Russian Federation

Objective of the study is to substantiate performance, assess the conditions, and analyze the results of activities on non-specific plague prophylaxis in the epizootic territory. **Materials and methods.** Utilized were archival data and operational reports of Altai Plague Control Station, Irkutsk RAPI, RusRAPI "Microbe", Center of Hygiene and Epidemiology in the Republic of Altai, and Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Altai, as well as literature sources. Spatial analysis was carried out using GIS-technologies. **Results and conclusions.** Concerted and coordinated activities of the Rospotrebnadzor institutions, medical and veterinary institutions, local executive authorities have allowed for complex prophylactic and anti-epidemic measures on prevention of plague dissemination and transmission in the territory of the Republic of Altai in 2016. Demonstrated has been the necessity to expand the scope and scale of operations and scientific research in the focus, deploying advanced toolkit of methods and means.

Key words: natural plague focus, epizootiological monitoring, prophylactic and anti-epidemic measures.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Alexander N. Matrosov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Matrosov A.N., Shchuchinov L.V., Denisov A.V., Mishchenko A.I., Rozhdestvensky E.N., Sludsky A.A., Razdorsky A.S., Mikhailov E.P., Sharova I.N., Porshakov A.M., Kuznetsov A.A., Popov N.V., Chiparin E.V., Korzun V.M., Tokmakova E.G., Balakhonov S.V., Shcherbakova S.A., Makin A.A., Arhipov G.S., Kutyrev V.V. Non-Specific Prophylaxis of Plague in the Gorno-Altai High-Mountain Natural Focus in 2016. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 4:25–32. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-25-32

В начале XXI столетия на территории России наметилась тенденция роста эпизоотической активности природных очагов чумы Сибири, что привело к повышению их эпидемиологического потенциала [2, 14, 15]. При этом наибольший риск заболеваний людей существует в очагах сурочьего типа. Серый

сурок *Marmota baibacina* и тарбаган *M. sibirica* являются ценными пушными зверьками, служат объектами охотничьего промысла и могут употребляться местным населением в пищу. Их специфические блохи *Oropsylla silantiewi* – высокоактивные переносчики возбудителя чумы могут нападать на чело-

века [1, 6, 8,]. Высоки риски заболеваний бубонной формой чумы при разделке тушек сурков [17]. Во 2-й половине XX столетия ареалы и численность сурков в горных районах России значительно сократились, в связи с чем снизилось и их эпизоотологическое значение в природных очагах чумы. Повсеместно их стали рассматривать как второстепенных, а в ряде случаев даже случайных носителей возбудителя [4, 14, 18]. К настоящему времени отмечают расширение ареала и рост численности серого сурка, а также его блох в горах Центральной и Средней Азии [12, 16]. На этом фоне с 2014 г. на территории Горно-Алтайского природного очага чумы регистрируют единичные случаи заболеваний человека чумой [3, 4, 7]. Целью настоящего исследования явилось обоснование проведения, оценка условий и анализ результатов мероприятий по неспецифической профилактике чумы на эпизоотической территории.

Материалы и методы

При подготовке статьи использованы результаты выполнения «Комплексного плана мероприятий противочумных учреждений Роспотребнадзора по оздоровлению Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы в Кош-Агачском районе Республики Алтай в августе–декабре 2016 г.», утвержденного Руководителем ФС Роспотребнадзора 25.08.2016 г., архивные и оперативные материалы ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб», «Иркутский НИПЧИ», «Алтайская противочумная станция», ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Алтай», БУЗ Республики Алтай «Кош-Агачская центральная районная больница», Управления Роспотребнадзора по Республике Алтай, а также литературные источники. Организация и проведение профилактических мероприятий осуществлялись на основании современной концепции неспецифической профилактики чумы в ее природных очагах [10, 11]. Анализ проводили с помощью компьютерной программы «Интерактивная карта по управлению оздоровительными мероприятиями в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы». Применяли эпизоотологические, эпидемиологические и картографические методы исследований, компьютерные ГИС-технологии.

Результаты и обсуждение

Горно-Алтайский высокогорный природный очаг чумы расположен на территории Кош-Агачского района Республики Алтай и граничит с Монголией, Китаем и Казахстаном. Он является северной частью общего с Монголией Сайлюгемского природного очага, площадь которого в границах России составляет 11597 км². В группе сибирских очагов чумы Горно-Алтайский очаг до недавнего времени считался моногостальным, но поливекторным [6, 14]. В очаге долгие годы обнаруживался возбудитель чумы алтайского подвида – *Yersinia pestis altaica*, характеризую-

щийся слабой вирулентностью или авирулентностью для морских свинок и высокой – для белых мышей. Основным носителем считалась монгольская пищуха *Ochotona pallasi*, переносчиками – ее специфические блохи: *Paradoxopsyllus scorodumovi*, *Amphalius runatus*, *Ctenophyllus hirticrus*, *Rhadinopsylla dahurica* [4]. В 2012 г. впервые здесь был выделен высоковирулентный штамм основного подвида *Yersinia pestis pestis*, а с 2014 г. в поселениях серого сурка его стали обнаруживать регулярно. Широкое распространение возбудителя основного подвида на фоне увеличения численности сурка привело к эпидемическим осложнениям в регионе. На территории Кош-Агачского района Республики Алтай в 2014–2016 гг. регистрируются единичные заболевания человека бубонной формой чумы (3 случая), связанные с заражением местного населения при разделке сурков, добытых в процессе незаконного охотничьего промысла [5, 7, 16].

В связи с осложнениями обстановки по чуме на территории Горно-Алтайского очага в границах Кош-Агачского района Республики Алтай в соответствии с планом работы Алтайской противочумной станции на 2016 г., решениями СПЭК при Правительстве Республики Алтай (протоколы № 5 от 17.07. и № 7 от 29.07. 2016 г.), «Комплексным планом мероприятий противочумных учреждений Роспотребнадзора по оздоровлению Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы в Кош-Агачском районе Республики Алтай в августе–декабре 2016 г.», утвержденным Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 25 августа 2016 г., проведены профилактические работы по предотвращению распространения чумы.

При проведении эпизоотологического мониторинга в 2016 г. в соответствии с регламентом, учитывающим дифференциацию очага чумы по уровню эпидемиологической опасности, было обследовано 9806,2 км² (84,6 %) территории, где отобрано 264 полевых пробы для исследований по этой инфекции. Добыто и исследовано на чуму 1388 экз. носителей (грызунов, зайцеобразных, птиц) и 5364 экз. переносчиков возбудителя чумы (блох, вшей, клещей). На наличие грызунов и блох в 10 населенных пунктах обследовано 95,1 тыс. м². В результате исследований было выделено 67 культур и субкультур возбудителя чумы: 65 – *Y. pestis* ssp. *pestis* и 2 – *Y. pestis* ssp. *altaica*. Большая часть культур основного подвида изолирована от серого сурка и его эктопаразитов – 63 (97 %). Штаммы чумы основного подвида были выделены в 27 пунктах в границах 11 секторов. В связи со снижением численности монгольской пищухи и ее блох резко сократилось выявление штаммов чумы алтайского подвида. При серологическом исследовании на чуму 1374 проб грызунов и пищух было получено 61 (4,4 %) положительных результатов. При исследовании материала от мелких млекопитающих методом ПЦР на наличие ДНК возбудителя чумы основного подвида получено 67 положительных проб (66 от се-

рого сурка, 1 – от длиннохвостого суслика).

При планировании и обосновании противоэпидемических мероприятий в очаге использовали данные оперативного эпизоотологического обследования. По результатам наблюдений в 2016 г. численность серого сурка – носителя возбудителя чумы основного подвида в среднем составила 1,2 особи на 1 га. При этом в поселениях, где регистрировали эпизоотию чумы, плотность зверьков значительно ниже (0,5 ос/га), в то время как на неэпизоотической территории средний показатель составил 2,7 сурка на 1 га. Численность длиннохвостого суслика в его поселениях в среднем составила 4,5 ос/га, что соответствовало среднему многолетнему уровню. По данным весеннего учета отмечали снижение численности монгольской пищухи: она составила 1,7 жилых колоний на 1 га, что в 4 раза ниже среднего многолетнего показателя. Это было вызвано высоким уровнем снегового покрова зимой и аномально поздним стаиванием снега в горах весной. К осени, однако, в связи с благоприятными кормовыми условиями численность монгольской пищухи частично восстановилась. В среднем по очагу в августе в ее поселениях обитаемость колоний составила 50,2 %, плотность – 5,9 жилых нор на 1 га. Поселения даурской пищухи также пострадали: даже к осени средняя численность достигла лишь 1,3 кол/га.

В крупных населенных пунктах, располагающихся в полупустынной местности в Чуйской котловине, средняя численность синантропных грызунов в июле была низкой – 1,5 % попадания в орудия лова. На стоянках животноводов она составила лишь 0,9 %. Серая крыса в населенных пунктах не регистрируется. После проведения дератизационных мероприятий в поселках в августе было обследовано 183 объекта, накоплено 913 ловушко-ночей: средняя численность составила 0,3 %, причем заселенными грызунами отмечены лишь 3 (1,6 %)

домовладения. В августе при обследовании 15 стоянок животноводов (общей площадью 1500 м²), подвергшихся дератизации, грызунов не выявлено. В 5 пограничных пунктах общей площадью 500 м² (в помещениях и ближайших окрестностях), расположенных на скальниках, численность плоскочерепной полевки оказалась очень высокой – 31,7 % попадания в орудия лова. Высокая численность плоскочерепной полевки отмечалась и в природных биотопах. Оптимальными для ее обитания являются скальники, занимающие, однако, не более 1 % территории. Здесь в среднем численность составила 26,8 %, что несколько ниже многолетнего значения.

Численность эктопаразитов мелких млекопитающих, в том числе блох – основных переносчиков чумы, отмечалась на уровне средних многолетних значений. На сером сурке индексы обилия (ИО) в шерсти колебались от 0,89 в апреле до 3,6 в августе. ИО блох на монгольской пищухе были максимальными в апреле (7,9), постепенно снижались к августу (1,8) и увеличились в сентябре (4,1). Норовые ИО блох пищух были очень низкими.

С учетом перекрывающихся ареалов основных носителей чумы – монгольской пищухи и серого сурка (рис. 1), формируются пространственная структура очагов и ареалы основного и алтайского подвигов возбудителя чумы (рис. 2). По результатам многолетних наблюдений выявленная к настоящему времени область распространения возбудителя чумы алтайского подвида, рассчитанная формально-территориальным способом, составляет 30 секторов (2538,0 км²). Общая площадь ареала монгольской пищухи почти вдвое больше – 48 секторов (4060,8 км²). Ареал возбудителя основного подвида микроба чумы занимает 16 секторов (1353,6 км²), в то время как площадь ареала серого сурка составляет около 50 секторов (4230 км²).

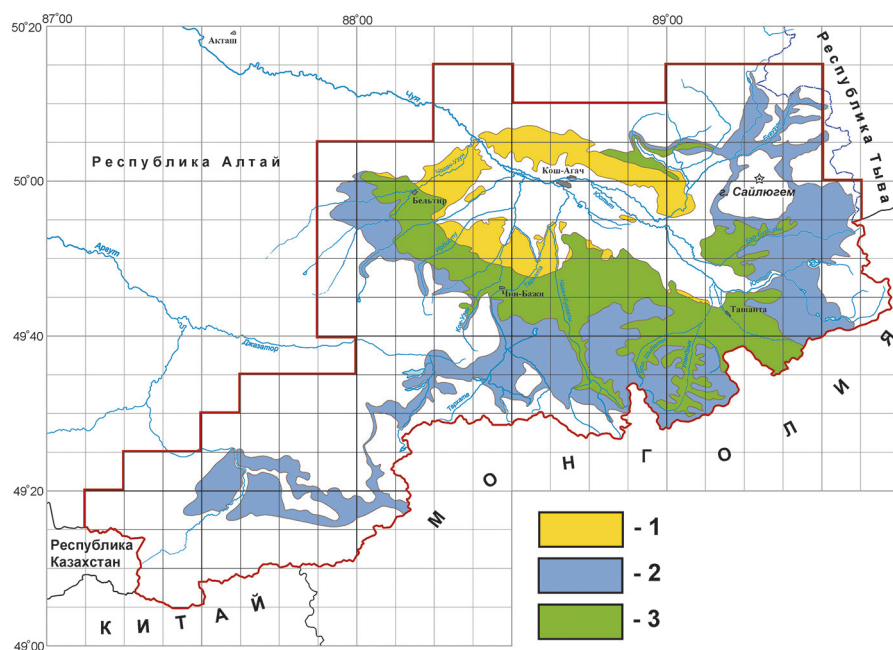


Рис. 1. Ареалы основных носителей чумы: серого сурка и монгольской пищухи в Горно-Алтайском высокогорном очаге:

Контуры ареалов: 1 – монгольской пищухи; 2 – серого сурка; 3 – перекрывающиеся ареалы монгольской пищухи и серого сурка

При проведении комплекса профилактических мероприятий в полной мере учитывались численность и распределение постоянного и временного населения, характер его пребывания на энзоотичных территориях, численность и размещение верблюдов и др. Общая численность населения Кош-Агачского района составляет 18765 человек. Распределение населения по территории неравномерное. Крупные поселки в основном располагаются на Чуйском тракте, стоянки животноводов – по долинам и руслам рек и ручьев.

Районный центр – село Кош-Агач, расположено на берегу р. Чуя. Расстояние от него до республиканского центра (Горно-Алтайск) – 470 км. На энзоотичной по чуме территории района в 10 сельских поселениях проживает 16088 жителей. На выпасах в границах эпизоотической территории ежегодно располагаются до 140 временных летних и зимних стоянок животноводов с общим количеством около 1100 человек.

Основное занятие населения – отгонное животноводство: овцеводство, разведение яков, коз, коров, лошадей и верблюдов. Свиной и домашней птицы в хозяйствах нет. В условиях сурового климата высокогорий травостой горных степей долго сохраняет сочность и высокие кормовые качества. В связи с небольшим снежным покровом или его отсутствием зимой скот содержится на круглогодичном пастбищном содержании. Животноводы в поисках пастбищ кочуют со скотом до 4 раз в год. Как правило, различают летние (временные) и зимние стоянки. Жилые и хозяйственные постройки животноводов представляют собой небольшие по площади строения из бревен, бруса или досок. Широко используются в качестве сезонных жилищ юрты. Жилые помещения оборудуются портативными отопительно-варочными печами, в качестве топлива используют высушенный навоз (кизьяк). Расстояние между стоянками достига-

ет 150 км, но, как правило, ограничивается десятками километров.

Общее число верблюдов, выпасающихся на территории района, составляет 409 голов. Они распределены по территории неравномерно. Большая их доля находится в северной части района: в селах Старый Бельтир (109 голов), Ортолык (85), Мухор-Тархата (133), Тобелер (21), Кокоря (24). Близость основных мест дислокации верблюдов к Тархатинскому эпизоотическому участку, на котором происходило заражение людей чумой (от 14 до 40 км), представляет эпидемиологическую опасность в связи с высокой восприимчивостью этих животных к чуме [9].

Характерной особенностью культуры и быта коренного населения считается охота на серого сурка и употребление в пищу мяса этих грызунов, выделка шкурок и заготовка жира сурка. Развитие эпизоотий чумы высоковирулентного подвида в его поселениях потребовало введения ограничительных мероприятий: промысловая и любительская охота были запрещены. Несмотря на это случаи браконьерского промысла имели место и привели к заболеваниям чумой.

В окрестностях сел Мухор-Тархата и Кош-Агач в долине р. Чуя в конце июля–начале августа большая часть населения занимается заготовками сена. Через всю территорию района проходит Чуйский тракт – автодорога федерального значения, по которому осуществляются грузопассажирские перевозки как внутри района, республики, так и между Россией и Монголией. За сутки через международный автомобильный пункт пропуска на границе проходит от 50 до 100 единиц транспортных средств.

Существующий на территории Кош-Агачского района национальный парк «Сайлюгемский» активно развивает экологический туризм. Кроме организованного туризма, район активно посещают «неорганизованные» туристы, в том числе иностранные. Многие из них направляются на плоскогорье Укок,

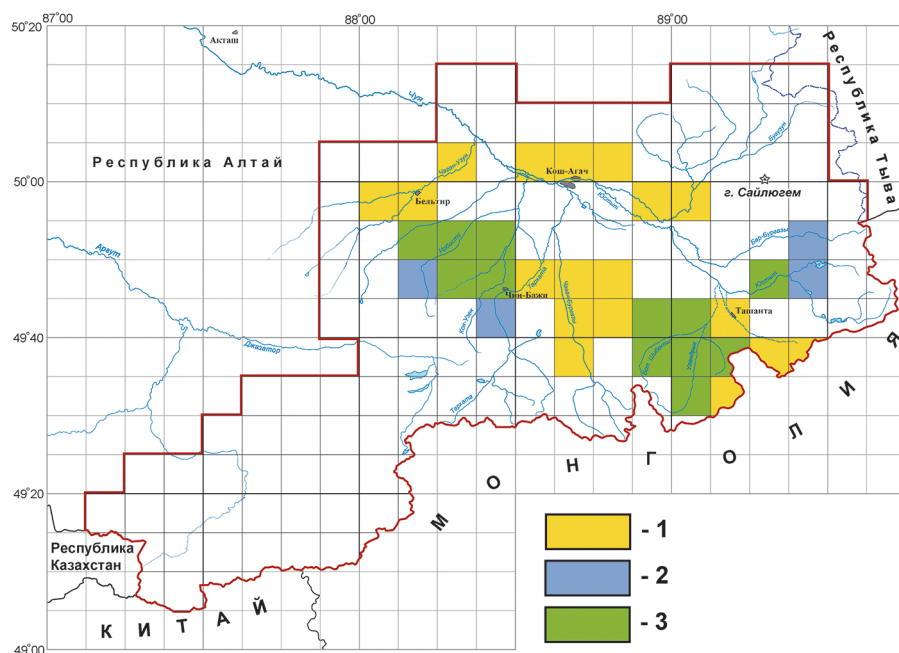


Рис. 2. Ареалы *Y. pestis* ssp. *pestis* и *Y. pestis* ssp. *altaica* на территории Горно-Алтайского природного очага:

Секторы: 1 – с выделением культур возбудителя чумы алтайского подвида; 2 – с выделением культур возбудителя чумы основного подвида; 3 – с выделением обоих подвигов возбудителя чумы

отличающееся уникальными природными особенностями (обилие рек, озер, богатый растительный и животный мир, наличие археологических памятников) и входящее в число потенциально опасных по чуме территорий.

Органы здравоохранения представлены в Кош-Агачском районе общей медицинской сетью, учреждениями Роспотребнадзора. В с. Кош-Агач располагаются районное отделение Управления Роспотребнадзора и филиал ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии по Республике Алтай». В с. Ташанта дислоцируется сезонный противоэпидемический отряд ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» и санитарно-карантинный пункт (СКП) пропуска на границе с Монголией.

В настоящее время основную эпидемиологическую опасность представляют постоянно существующие плотные поселения серого сурка, в которых циркулирует высоковирулентный возбудитель чумы *Y. pestis* ssp. *pestis*. Территория очага неоднородна в отношении активных эпизоотических проявлений: наибольшую опасность заражения людей представляют участки (секторы), в границах которых регистрируют устойчивые проявления чумы основного подвида. Особо следует выделять участки, где на протяжении 3 последних лет происходило заражение людей при охоте на сурка. В качестве важных критериев следует учитывать численность населения: животноводов, кочующих со скотом и оседлого населения крупных населенных пунктов, а также дислокацию временного населения: строителей, туристов, рыбаков, охотников, военнослужащих и др. Естественно, что вероятность эпидемических осложнений, в первую очередь заболеваний вспышечного характера, возрастает в местах концентрации людей там, где возможен контакт с носителями и переносчиками чумного микроба. Нельзя сбрасывать со счетов наличие, размещение и места выпаса

верблюдов.

С учетом перечисленных факторов проведена дифференциация территории очага по уровню эпидемической опасности (УЭО). При оценке критериев, положенных в основу анализа, использовали балльную оценку упомянутых показателей. Были выделены следующие градации УЭО (рис. 3):

Очень низкий (68 секторов – 4610,1 км² – 39,8 %). Преобладают высокогорные альпийские ландшафты без населения или с очень низкой его численностью, без поселений серого сурка, эпизоотии чумы не регистрируются, верблюды отсутствуют.

Низкий (45 секторов – 3510,6 км² – 30,3 %). Низкая численность серого сурка или отсутствие эпизоотий в его поселениях, низкая численность оседлого населения (наличие единичных стоянок животноводов), присутствие временного населения: туристов, охотников, пограничников и др. Верблюдов нет.

Средний (36 секторов – 2893,8 км² – 24,9 %). Высокая численность серого сурка и регистрация эпизоотий чумы хотя бы разового проявления, низкая численность постоянного населения (наличие стоянок животноводов), наличие верблюдов.

Высокий (7 секторов – 582,5 км² – 5,0 %). Высокая численность серого сурка, стойкие эпизоотические проявления, высокая численность постоянного населения в поселках, на стоянках животноводов, случаи заражения человека чумой при охоте, наличие верблюдов.

На основании решения республиканской СПЭК для снижения численности основного носителя чумы – серого сурка на территории Кош-Агачского района Республики Алтай была организована работа 4 специальных бригад по отстрелу сурка на эпизоотических по чуме участках. В течение месяца с 19 июля по 19 августа здесь было добыто и утилизировано в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами 787 экз. этого вида. Из этого числа 187

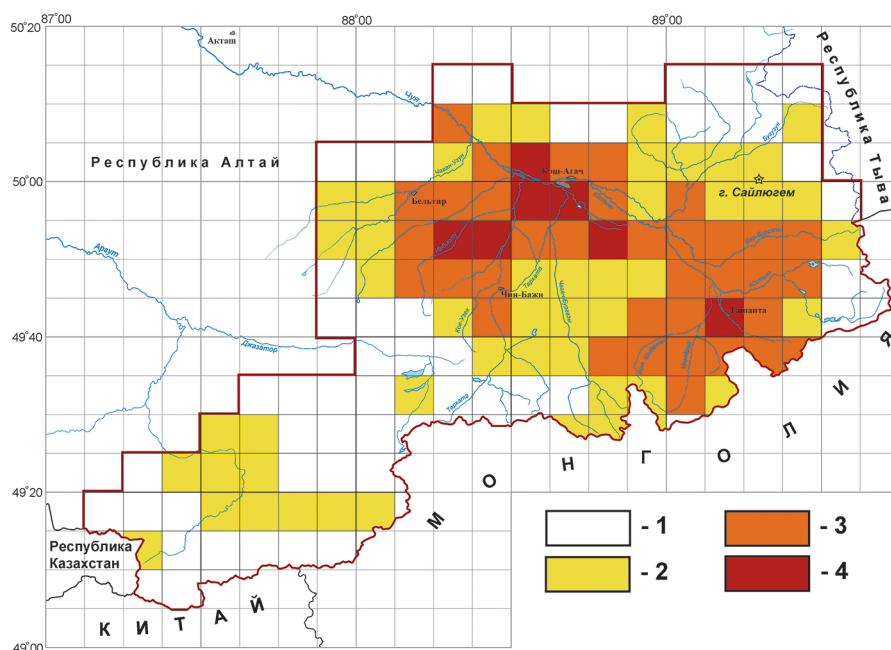


Рис 3. Дифференциация территории Горно-Алтайского высокогорного очага по уровню эпидемической опасности (УЭО):

Секторы с различным УЭО: 1 – очень низкий; 2 – низкий; 3 – средний; 4 – высокий

особей доставлено в лабораторию и исследовано на чуму в подразделениях ФКУЗ «Алтайская противочумная станция». Следует подчеркнуть, что отстрел сурков как метод механической дератизации малоэффективен: уничтожается не более 20–30 % особей в отдельном поселении.

По результатам эпизоотологического обследования в мае–августе 2016 г. бригадами ФКУЗ «Алтайская ПЧС» Роспотребнадзора на всех выявленных эпизоотических участках были проведены поселковая дезинсекция и дератизация стоянок животноводов, территорий погранзаставы и постов. Обработки химическими средствами проведены на 80 стоянках: на 36 зимних и 44 летних, а также на 6 пограничных постах и 1 заставе. Общая площадь полевой дезинсекции составила 30,4 км², поселковой дератизации – 105,3 тыс. м², поселковой дезинсекции – 75,2 тыс. м². Дезинсекция проводилась дустами на основе цианосодержащих пиретроидов. Эффективность полевой дезинсекции, проведенной на эпизоотических участках вокруг стоянок животноводов, в среднем составляла 86 %. Эффективность дезинсекции и дератизации на стоянках животноводов близка к 100 %. Дератизация проводилась с помощью родентицидных приманок на основе антикоагулянта бромадиолона (восковые брикеты, зерновые приманки), дезинсекция – препаратами на основе фосфорорганических средств и пиретроидов: дусты «Фенаксин», «Фуфанон-супер», «Абсолют», «Каприн-Ф», «Фас-дубль».

На территории Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы с февраля по июль была проведена вакцинация 409 верблюдов. Все животные были привиты против чумы живой сухой вакциной «Кэмел-ПРО Р.С.». В целях предотвращения заражения животных кровососущими эктопаразитами в феврале и июне верблюды были обработаны системным инсекто-акарицидом «Ивермек», в июле – поверхностно опрысканы фосфорорганическим препаратом «Диазинон-С». По мере выявления эпизоотических участков выпас животных здесь прекращался: все верблюды были отогнаны за их пределы. Ветеринарные специалисты постоянно контролировали физиологическое состояние верблюдов, вели разъяснительно-информационную работу с животноводами о мерах профилактики заболеваний чумой при уходе за животными.

В эпидемическом очаге по месту расположения больного силами профилактического отдела ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Алтай» проводились текущая и заключительная дезинфекция: влажная обработка 0,03 и 0,12 % растворами препарата «Део-хлор люкс», камерная обработка вещей. После обнаружения шкур сурков на полигонах твердых бытовых отходов (ТБО) на их территории в селах Кош-Агач, Бельтир, Мухор-Тархата, Ортолык, Чаган-Узун были проведены дезинфекция, дезинсекция и дератизация. В этих селах также проведена дезинфекция надворных туалетов,

выгребных ям, мусорных контейнеров. Всего продезинфицировано 7 контейнеров, 1013 выгребных ям, 9 полигонов ТБО, 960 дворов и 35 социально-значимых объектов общей площадью 199 тыс. м². Дезинфекцию проводили раствором гипохлорита кальция, дезинсекцию – пиретроидным препаратом «Цифокс», дератизацию – родентицидной приманкой на основе антикоагулянта бромадиолона. Общая площадь обработок на свалках ТБО составила 9,0 га. В июле в 4 населенных пунктах (Кош-Агач, Мухор-Тархата, Ортолык, Чаган-Узун) проведена поселковая дезинсекция и дератизация. Всего по эпидпоказаниям обработано 995 объектов (877 домовладений, 18 социальных объектов, 16 магазинов, 83 нежилых домов). Площадь дератизации в населенных пунктах составила 199 тыс. м², дезинсекции – 6,9 тыс. м². Эффективность обработок составила 100 %, что было подтверждено контрольными обследованиями. С 3 по 20 августа 2016 г. были повторно обследованы для определения эффективности дератизации села Кош-Агач, Мухор-Тархата, Ортолык и Чаган-Узун: охвачено 274 объекта площадью 36,7 тыс. м². На 960 ловушек была отловлена лишь 1 домовая мышь в с. Ортолык (0,1 %), что свидетельствовало о высокой эффективности дератизации.

На эпизоотических по чуме участках высокого риска для снижения интенсивности контактов населения с биоценозами Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы представителями администраций сельских поселений в Кош-Агачском районе осуществлялись регулярные выезды на стоянки животноводов. В июле–августе выездами охвачено 54 животноводческих пункта, откуда были эвакуированы члены семей животноводов, непосредственно не участвующие в хозяйственной деятельности, в количестве 82 чел. (из них 72 – дети). В эпидемическом очаге в с. Кош-Агач в июле силами 12 звеньев медработников проведены подворные обходы на улицах районного центра с целью обследования и бесед с населением: охвачено 6150 домов и 7220 жителей. Кроме этого, на дорогах в окрестностях сел Мухор-Тархата и Ортолык в западном направлении организованы передвижные посты ГИБДД, осуществляющие досмотр автомашин с целью выявления лиц, причастных к незаконной охоте на сурков.

На санитарно-карантинном пункте «Ташанта» осуществлялся контроль за лицами, въезжающими на территорию Республики Алтай из Монголии: проводилось медицинское освидетельствование граждан, термометрия тела (с помощью тепловизора), осуществлялись проверки грузов. По данным СКП, в 2016 г. с 1 июня по 31 августа в Российскую Федерацию из Монголии въехало 21386 человек на 5421 единице автотранспорта. С 18 июля по 31 августа из России в Монголию выехало 11227 человек на 2988 автомобилях.

На территории Кош-Агачского района Республики Алтай проводилась подготовка медицинских работников по вопросам диагностики,

лечения и профилактики чумы, проверки готовности медицинских учреждений к проведению первичных противоэпидемических мероприятий. Все выявленные недостатки и замечания устранялись. Проинструктировано по чуме в республике Алтай в 2016 г. 717 медицинских работников, 73 ветеринарных работника. Проведены 1 учение по чуме (ноябрь 2016 г., с. Ташанта), 11 семинаров по клинике чумы и профилактике заболеваний, 67 проверок медучреждений. Прочитано 27 лекций для населения. Проведены беседы, розданы листовки по профилактике чумы: охвачено информационно-разъяснительной работой 19364 человек. Во всех общественных местах Кош-Агачского района: в медицинских учреждениях, гостиницах, торговых центрах, магазинах, клубах и др. распространены информационные буклеты по профилактике чумы.

Проведенный комплекс организационных, противоэпидемических, санитарно-профилактических противочумных мероприятий в 2016 г. явился начальным этапом оздоровления Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы, конечной целью которого является предельно возможная минимизация риска первичных заражений человека чумой, а в случае их возникновения – оперативное проведение мероприятий по локализации и ликвидации эпидемического очага. Для дальнейшего снижения рисков заражения, предупреждения первичных заражений и антропонозного распространения чумы разработан «Комплексный план мероприятий учреждений Роспотребнадзора по оздоровлению Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы в Кош-Агачском районе Республики Алтай в 2017 г.», представленный в федеральную службу Роспотребнадзора.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адъясурэн З., Цэрэнноров Д., Отгонбаатар Д., Балахонов С.В., Иннокентьева Т.И., Агиймаа Ш., Косилко С.А. Клинико-эпидемиологические особенности чумы в Монголии. *Пробл. особо опасных инф.* 2010; 1(103):30–3.
2. Балахонов С.В., Корзун В.М., Вержуцкий Д.Б., Михайлов Е.П., Рождественский Е.Н., Денисов А.В. Первый случай выделения *Yersinia pestis* subsp. *pestis* в Алтайском горном природном очаге чумы. Сообщение 2. Вероятные пути и механизмы заноса возбудителя чумы основного подвида на территорию очага. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 2:5–10.
3. Балахонов С.В., Корзун В.М., Косилко С.А., Михайлов Е.П., Щучинов Л.В., Мищенко А.И., Зарубин И.В., Рождественский Е.Н., Денисов А.В. Актуальные аспекты обеспечения эпидемиологического благополучия по чуме населения Республики Алтай. *Эпидемиол. и вакцинопрофилактика.* 2016; 4(89):4–7.
4. Балахонов С.В., Корзун В.М., редакторы. Горно-Алтайский природный очаг чумы: Ретроспективный анализ, эпизоотологический мониторинг, современное состояние. Новосибирск: Наука-Центр; 2014. 272 с.
5. Балахонов С.В., Попова А.Ю., Мищенко А.И., Михайлов Е.П., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Денисов А.В., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Щучинов Л.В., Зарубин И.В., Семенова Ж.Е., Маденова Н.М., Дюсенбаев Д.К., Ярыгина М.Б., Чипанин Е.В., Косилко С.А., Носков А.К., Корзун В.М. Случай заболевания человека чумой в Кош-Агачском районе Республики Алтай в 2015 г. Сообщение 1. Клинико-эпидемиологические и эпизоотологические аспекты. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 1:55–60.

6. Голубинский Е.П., Жовтый И.Ф., Лемешева Л.Б. О чуме в Сибири. Иркутск: Изд-во Иркутского ун-та; 1987. 243 с.
7. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Щучинов Л.В., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Денисов А.В., Шарова И.Н., Попов Н.В., Кузнецов А.А. Заболевание человека чумой в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2014 г. Сообщение 1. Эпидемиологические и эпизоотологические особенности проявлений чумы в Горно-Алтайском высокогорном (Сайлюгемском) природном очаге чумы. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 4:9–16.
8. Кучерук В.В., Бибииков Д.И. Сурки как хранители чумы. В кн.: Сурки. Биocenотическое и практическое значение. М.: Наука, 1980. С. 111–164.
9. Лобанов В.Н. Чума у верблюдов и ее значение в эпидемиологии. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та; 1968. 128 с.
10. Матросов А.Н. Современная концепция неспецифической профилактики заболеваний в сочетанных природных очагах чумы и других инфекций на территории России. *Дез. дело.* 2014; 1:30–2.
11. Матросов А.Н., Кузнецов А.А., Князева Т.В., Вержуцкий Д.Б., Никитин А.А., Немченко Л.С., Григорьев М.П., Левченко Б.И., Бобенко О.А., Газиева А.Ю., Коротков В.Б. Современная концепция контроля численности носителей и переносчиков чумы на территории Российской Федерации. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 2(112):16–20.
12. Наурусбаев Е.О., Кульджатаев Д.М., Типикин А.С., Пашков В.Д., Тудахунов Б.Б. Размещение и численность серого сурка в средней части бассейна реки Каркара. *Карантинные и зоонозные инф в Казахстане.* Алматы, 2014; 1(29):68–70.
13. Никитин А.А., Марамович А.С., Косилко С.А., Иннокентьева Т.И., Базанова Л.П., Балахонов С.В., Воронова Г.А., Окунев Л.П. Эпизоотологическая характеристика природных очагов чумы Монголии в связи с разработкой мер защиты от завоза и распространения инфекции на территорию России. *Пробл. особо опасных инф.* 2007; 2(94):28–33.
14. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири. М.: Медицина; 2004. 192 с.
15. Попков А.Ф., Вержуцкий Д.Б., Корзун В.М., Иннокентьева Т.И., Чипанин Е.В., Вершинин Е.А., Немченко Л.С., Никитин А.А., Окунев Л.П., Базанова Л.П., Токмакова Е.Г., Воронова Г.А., Логачев В.И., Михайлов Е.П., Федоров С.В., Агапов В.А. Итоги популяционно-экологических исследований природной очаговости чумы в Сибири. *Пробл. особо опасных инф.* 2007; 2(94):33–6.
16. Попов Н.В., Безмертвый В.Е., Матросов А.Н., Князева Т.В., Кузнецов А.А., Федоров Ю.М., Попов В.П., Вержуцкий Д.Б., Корзун В.М., Чипанин Е.В., Дубянский В.М., Малецкая О.В., Григорьев М.П., Зенкевич Е.С., Балахонов С.В., Куличенко А.Н., Кутырев В.В. Эпизоотическая активность природных очагов чумы Российской Федерации в 2015 г. и прогноз на 2016 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 1:13–9.
17. Скородумов А.М. Чума в Сибири. Иркутск; 1937. 234 с.
18. Слудский А.А. Эпизоотология чумы (обзор исследований и гипотез). Деп. в ВИНТИ. № 231-B2014. 2014. 313 с. URL: <http://www.microbe.ru/deponir/> (дата обращения: 15.10.2016).

References

1. Ad'yasuren Z., Tserennorov D., Otgonbaatar D., Balakhonov S.V., Innokent'eva T.I., Agiymaa Sh., Kosilko S.A. [Clinical-epidemiological features of plague in Mongolia]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2010; 1(103):30–3.
2. Balakhonov S.V., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Mikhaylov E.P., Rozhdestvensky E.N., Denisov A.V. [The first case of *Yersinia pestis* subsp. *pestis* isolation in the territory of the Altai mountain natural plague focus. Communication 2. Probable ways and mechanisms of plague agent main sub-species importation into the territory of the focus]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 2:5–10.
3. Balakhonov S.V., Korzun V.M., Kosilko S.A., Mikhailov E.P., Shchuchinov L.V., Mishchenko A.I., Zarubin I.V., Rozhdestvensky E.N., Denisov A.V. [Actual aspects of epidemiological well-being support as regards plague for population in Altai Republic]. *Epidemiol. Vaksinooprofilakt.* 2016; 4(89):4–7.
4. Balakhonov S.V., Korzun V.M., editors. [Gorno-Altai Natural Plague Focus: Retrospective Analysis, Epizootiological Monitoring, and Current State]. Novosibirsk: "Nauka-Tsentra"; 2014. 272 p.
5. Balakhonov S.V., Popova A.Yu., Mishchenko A.I., Mikhailov E.P., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Denisov A.V., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Shchuchinov L.V., Zarubin I.V., Semenova Zh.E., Madenova N.M., Dyusenbaev D.K., Yarygina M.B., Chipanin E.V., Kosilko S.A., Noskov A.K., Korzun V.M. [A case of human infection with plague in the Kosh-Agach Region of the Republic of Altai in 2015. Communication 1. Clinical-epidemiological and epizootiological aspects]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 1:55–60.
6. Golubinsky E.P., Zhovty I.F., Lemesheva L.B. [Concerning Plague in Siberia]. Irkutsk: Publishing House of Irkutsk University; 1987. 243 p.
7. Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakschina

Г.Г.Онищенко¹, Э.А.Москвитина², А.С.Водопьянов², Е.В.Монахова², Р.В.Писанов², С.О.Водопьянов²,
О.С.Чемисова², В.Д.Кругликов², С.В.Титова²

РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЭПИДЕМИИ ХОЛЕРЫ В РЕСПУБЛИКЕ ДАГЕСТАН В 1994 г.

¹Российская академия наук, Москва, Российская Федерация; ²ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Цель исследования. Ретроспективная оценка эпидемических проявлений холеры в Республике Дагестан в 1994 г. с учетом VNTR-генотипирования и исследования особенностей генома выделенных *V. cholerae* O1 биовара El Tor. **Материалы и методы.** Использованы данные о распространении инфекции в различные периоды эпидемии в Республике Дагестан в 1994 г. Штаммы исследованы с использованием VNTR-анализа и полногеномного секвенирования. **Результаты и выводы.** Установлена гетерогенность популяции возбудителя по циркулирующим VNTR-генотипам. По данным полногеномного секвенирования выявлено наличие у *V. cholerae* O1 El Tor в профаге CTXφ аллели В-субъединицы *ctxB1*. Штаммы, выделенные на первом и последующих этапах развития эпидемии, оказались генетически близкородственными штаммам из Индии, Бангладеш и Непала. У части штаммов выявлен кластер генов множественной антибиотикорезистентности SXT^{ET}: *floR*, *strA*, *strB*, *sul2* – «индийского» типа – SXT-ICE-Ind, а также мобильные элементы ICE, содержащие детерминанты резистентности к антибиотикам тетрациклиновой группы – *tetA*. Филогенетическое родство дагестанских штаммов со штаммами из Азии указывает на происхождение штаммов, а также на имевшие место независимые завозы холеры на разных этапах эпидемии. Роль генетически измененных вариантов *V. cholerae* O1 El Tor с выявленными на молекулярно-генетическом уровне особенностями возбудителя как системообразующего фактора в возникновении и развитии эпидемии в Республике Дагестан была непосредственно связана с социальными условиями.

Ключевые слова: холера, завозы, миграция, *V. cholerae* O1 El Tor, VNTR-генотипирование, полногеномное секвенирование, мобильные элементы ICE.

Корреспондирующий автор: Эльза Афанасьевна Москвитина, e-mail: plague@aaanet.ru.

G.G.Onishchenko¹, E.A.Moskvitina², A.S.Vodop'janov², E.V.Monakhova², R.V.Pisanov²,
S.O.Vodop'janov², O.S.Chemisova², V.D.Kruglikov², S.V.Titova²

Retrospective Molecular-Epidemiological Analysis of Cholera Epidemic in the Republic of Dagestan in 1994

¹Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation; ²Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Objective of the study is the retrospective evaluation of epidemic cholera manifestations in the Republic of Dagestan in 1994, taking into account VNTR-typing and studies of genome peculiarities in the isolated *V. cholerae* O1, Biovar El Tor. **Materials and methods.** Utilized have been the data on the infection rates in different periods of the epidemic. The strains have been investigated using VNTR-analysis and whole genome sequencing. **Results and conclusions.** Heterogeneity of the agent population has been established on the basis of the circulating VNTR-genotypes. The whole-genome sequencing has revealed the presence of B-subunit allele *ctxB1* in CTXφ prophage of El Tor *V. cholerae* O1 strains. The strains isolated in the early and the following stages of epidemic development have been found to be closely related to strains from India, Bangladesh, and Nepal. Some strains possessed a cluster of multiple antibiotic resistance genes, SXT^{ET}: *floR*, *strA*, *strB*, *sul2* – of “Indian” type – SXT-ICE-Ind, as well as ICE mobile elements, containing determinants of resistance to antibiotics of tetracycline group – *tetA*. Phylogenetic relatedness of the Dagestan strains to the strains from Asia indicates to the origin of the strains, as well as to the independent cholera importations that took place at different stages of the epidemic. The role of genetically altered *V. cholerae* O1 El Tor variants with identified peculiarities on molecular-genetic level, as a system-forming factor in the emergence and development of epidemic in the Dagestan Republic, was directly linked to the social conditions.

Key words: cholera, importation, migration, *V. cholerae* O1 El Tor, VNTR-genotyping, whole-genome sequencing, ICE mobile elements.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Elza A. Moskvitina, e-mail: plague@aaanet.ru.

Citation: Onishchenko G.G., Moskvitina E.A., Vodop'janov A.S., Monakhova E.V., Pisanov R.V., Vodop'janov S.O., Chemisova O.S., Kruglikov V.D., Titova S.V. Retrospective Molecular-Epidemiological Analysis of Cholera Epidemic in the Republic of Dagestan in 1994. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 4:33–41. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-33-41

История всех пандемий холеры в России, в том числе 7-й, обусловлена заносами инфекции в основном из стран Азии. При этом многочисленные случаи заноса и распространения холеры свя-

заны с различными видами меж- и внутригосударственной миграции населения [13]. Это правомерно можно отнести к событиям по холере в Республике Дагестан в 1994 г. [6]. Особенности небывалой по

масштабам эпидемии холеры, достижения в области молекулярно-генетических исследований холерного вибриона к настоящему времени явились основанием для ретроспективного эпидемиологического анализа эпидемических проявлений холеры в Республике Дагестан с учетом изучения генетических аспектов возбудителя.

События по холере в регионе Карибского бассейна, в Гаити, вошедшие в историю современного пандемического распространения холеры, обусловлены геновариантом холерных вибрионов O1 биовара Эль Тор, близкородственных штаммам из Бангладеш 2002 г. (GIRS-101) и 2008 г. (M4). Установлено наличие в профаге CTXφ гена *ctxB^{Class}*, кодирующего В-субъединицу холерного токсина вибриона классического биовара, способного вызывать более тяжелое клиническое течение со смертельными исходами в первые часы после появления клинических признаков, присутствие в геноме гаитянских штаммов и холерных вибрионов из Южной Азии островов пандемичности VSP-I и VSP-II, обеспечивающих высокий уровень адаптации к условиям окружающей среды, их пандемический потенциал, а также присутствие SXT-генетического элемента, несущего гены антибиотикорезистентности [16, 29].

Это, в свою очередь, явилось стимулом и основанием для исследований штаммов холерных вибрионов, хранившихся в национальных коллекциях многих стран мира. Необходимо отметить, что сведения о генетически измененных (содержащих аллель *ctxB^{Class}*) вариантах *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, появившиеся впервые в 2002 г., к настоящему времени значительно расширились в плане изучения структуры генома, функций генов, филогеномики штаммов [18, 19, 20, 21, 24, 26, 28]. Генотипы штаммов *V. cholerae* O1, несущих классический аллель *ctxB-1*, обнаруженные в Индии, распространились в другие страны Азии и в Африку, а имеющие классический аллель *ctxB-7* – в страны Азии, Африки и на Американский континент. Это позволило сделать вывод, что штаммы *V. cholerae* O1 Эль Тор, имеющие классический аллель *ctxB*, распространяются в глобальном масштабе [31].

К настоящему времени установлено, что вспышки или импортируемые случаи холеры, обусловленные измененными вариантами *V. cholerae* O1 El Tor, имели место с 1991 г. в странах Азии: Индии, Бангладеш, Мьянме, Таиланде, Шри-Ланке, Малайзии, Вьетнаме, Китае, Гонконге, Японии, Кувейте, Непале, Узбекистане; Африки: Алжире, Марокко, Гвинее, Замбии, Занзибаре, Анголе, Мозамбике и других странах Восточного, Западного, Центрального и Южного регионов; Европы: Румынии, Украине и России [5, 11, 12, 14, 15, 17, 22, 27, 30].

Безусловный научный интерес представляет изучение выделенных в Республике Дагестан холерных вибрионов, их фенотипических и генотипических свойств с исследованием структуры генома и функ-

ций основных генов, ответственных за эпидемический и пандемический потенциал патогена. При анализе эпидемического процесса, учитывая продолжительность эпидемии во времени, большое значение для эпидемиологической диагностики имеет генотипирование штаммов, выделенных на разных этапах эпидемии.

Целью исследования явилась ретроспективная оценка эпидемических проявлений холеры в Республике Дагестан в 1994 г. с учетом VNTR-генотипирования и исследования особенностей генома выделенных *V. cholerae* O1 биовара El Tor.

Материалы и методы

Для эпидемиологического анализа использованы данные, собранные и систематизированные во время эпидемии холеры в 1994 г., в том числе опубликованные [6], о распространении инфекции в различные периоды эпидемии по административным районам и городам Республики Дагестан с учетом действующих путей и факторов передачи возбудителя инфекции, социальных условий, способствующих распространению холеры.

Из двухсот двух паспортов на штаммы *V. cholerae* серогруппы O1 биовара El Tor, выделенных от больных холерой (199 паспортов) и из объектов окружающей среды (3) на разных этапах эпидемии в Республике Дагестан (1994 г.), отобрано сорок семь штаммов, выделенных из клинического материала. В исследование взяты также один штамм *V. cholerae* серогруппы O1 биовара El Tor, выделенный из клинического материала от больного в Чеченской Республике, Гудермесском районе (1994 г.), и два штамма *V. cholerae* серогруппы O1 биовара El Tor, изолированные от больных во время вспышки холеры в Казани (Республика Татарстан, 2001 г.). Штаммы получены из Музея живых культур с Центром патогенных для человека вибрионов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, где хранились в лиофилизированном состоянии. Для культивирования бактерий применяли бульон и агар Мартена (pH 7,6–7,8). Подготовка образцов для масс-спектрометрии проводилась в соответствии с [4], анализ профиля референсных белков микробной клетки – с использованием программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0. Для амплификации гена *ctxB* профага CTXφ использовали коммерческий набор реагентов фирмы АмплиСенс (Москва). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и VNTR-анализ по пяти локусам переменных tandemных повторов VcA, VcB, VcC, VcD и VcG проводили по методике [2].

Полногеномное секвенирование штаммов выполнялось на платформе MiSeq (Illumina). Пробоподготовка проводилась согласно протоколу производителей. Сборку контигов осуществляли с помощью программ Velvet (входит в состав программного обеспечения MiSeq) и ContigExpress (в

составе Vector NTI Suite 11). Биоинформационный анализ проводили с помощью программ BLASTN 2.2.29 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), Vector NTI Suite 11 (www.informax.com), Contiguator v.2 (<http://contiguator.sourceforge.net>), с использованием ресурсов геномной базы данных NCBI. Построение дендрограмм на основе распределения единичных нуклеотидных замен и значимых для дискриминации генов проводили с использованием программ GeneExpert, GeneGraph, SeqAnalyzer, разработанных в Ростовском-на-Дону противочумном институте.

Кластерный анализ и построение дендрограмм осуществляли с использованием авторского программного обеспечения, встроенного в геоинформационную систему «Холера. Штаммы – VNTR» [3]. Для сравнения использованы полногеномные сиквенсы штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, представленные в базах NCBI GenBank. Номера доступа нуклеотидных последовательностей геномных островов, генов и их кластеров, полученных в рамках настоящего исследования, в GenBank: KT779270-KT779274 (коровая область профага CTX); KU601749, KU601750 (rtxA); KT970467 (остров патогенности VPI); KU601747, KU601748 (остров пандемичности VSP-II). Все работы, связанные со штаммами *V. cholerae*, проводили в соответствии с санитарными правилами [1].

Результаты и обсуждение

За период 7-й пандемии в России самая интенсивная и широкомасштабная эпидемия холеры имела место в Республике Дагестан в 1994 г., когда было зарегистрировано 2359 больных и вибрионосителей в 187 населенных пунктах 27 районов и 8 городах. Эпидемия была обусловлена *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор серовара Огава [6].

По фенотипическим и таксономическим признакам взятые в настоящее исследование 50 штаммов отнесены к биовару Эль Тор, O1 серогруппе, серовару Огава, были резистентны к холерным диагностическим Эль Тор и классическому фагам. Изменчивость по агглютинабельности отсутствовала. Штаммы не лизировали эритроциты барана, образовывали ацетилметилкарбинол из глюкозы в реакции Фогеса-Проскауэра. Все штаммы были отнесены к генетически измененным вариантам *V. cholerae* O1 биовара El Tor за счет наличия у них гена ctxB1, кодирующего В-субъединицу холерного токсина классического биовара.

Масс-спектрометрический анализ. В результате анализа белковых спектров штаммы *V. cholerae* с использованием программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0. разделились на три кластера, что свидетельствовало о гетерогенности популяции.

Эпидемиологический анализ и молекулярно-генетический VNTR-анализ *V. cholerae*. Следует отметить, что ранее при анализе этапов совершенствования системы эпидемиологического надзора за хо-

лерой в России, в частности, с учетом характеристики выделенных в 21 субъекте России 326 штаммов *V. cholerae* El Tor O1 и *V. cholerae* O139 серогрупп от больных холерой, вибрионосителей и из объектов окружающей среды (1990–2014 гг.), показано с использованием VNTR-генотипирования преобладание эпидемически значимых *V. cholerae* O1, содержащих гены холерного токсина ctxA и токсинорегулируемых пилей tcpA штаммов *V. cholerae* O1, ответственных за эпидемию 1994 г. в Республике Дагестан [9]. Проведенный VNTR-анализ 50 штаммов позволил выявить 22 генотипа, а кластерный анализ – сгруппировать их в 10 кластеров, обозначенных буквами латинского алфавита от «А» до «I». Два штамма, выделенные в Казани во время вспышки холеры в 2001 г., дискриминировались от остальных и составили отдельный кластер А, как и VNTR-генотипы штаммов холерных вибрионов из Дагестана, вошедших в кластер I (рис. 1).

При сопоставлении данных эпидемиологического анализа о возникновении трех независимых очагов, связанных с завозом холеры паломниками, с VNTR-генотипами штаммов установлено следующее. Первые, самостоятельно возникшие очаги в июне 1994 г. в с. Герга Каякентского района (штамм – № 16228-РД, генотип – C4) и г. Кизилюрте Кизилюртовского района (штаммы – № 6251a-РД и 6251b-РД, генотипы – C1 и C2) были обусловлены штаммами *V. cholerae* O1 из кластера С, но разными генотипами, доминирующими в течение эпидемии во времени (с июня по сентябрь) и по различным административным территориям, а также из кластера D (штаммы – № 16248-РД и 6250-РД, генотип – D2, с. Кикунь и с. Гергебиль Гергебильского района соответственно). В кластер С вошел штамм *V. cholerae* O1 № 17283-ЧР, генотипа – C2 от больного из Чеченской Республики, Гудермесского района. В этом очаге холера возникла хронологически вслед за регистра-

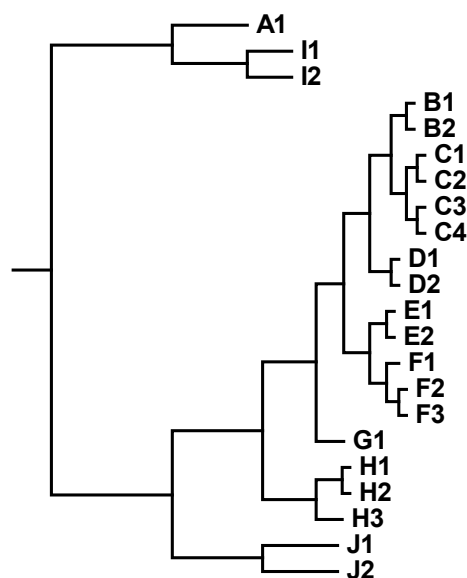


Рис. 1. Дендрограмма, построенная по результатам кластерного анализа на основе распределения аллелей VNTR-локусов

цией эпидосложнений в Хасавюртовском районе Дагестана [7]. Данные VNTR-генотипирования подтверждают имевшие место заносы холеры в Чеченскую Республику.

Значительное число штаммов из кластера F, выделенных в разные периоды эпидемии (август–октябрь), выявление ранее не встречавшихся генотипов из кластеров I1, I2 (июль) и B2 (сентябрь) в первом из возникших очагов (Каякентский район); геновариантов B1; J1, J2; H1-H3; E1-E2 (июль–сентябрь) – в других очагах свидетельствовало о гетерогенности популяции возбудителя по циркулирующим VNTR-генотипам, широком географическом распространении холеры в пределах республики с формированием множественных очагов.

Если рассматривать *V. cholerae* El Tor как системообразующий фактор в возникновении и развитии эпидемического процесса, то наряду с выявленными особенностями возбудителя на молекулярно-генетическом уровне необходимо отметить, что основную роль имели социальные факторы как косвенные регуляторы эпидемического процесса. Здесь мы имеем в виду значение межгосударственной миграции населения, в частности паломников, возвращающихся с Хаджа по пути следования через Иорданию-Сирию-Турцию-Иран-Азербайджан в июне–июле 1994 г., в завозе холеры, формировании первичных самостоятельных очагов и дальнейшем продвижении инфекции по путям внутренней миграции населения в регионе. Это было обусловлено социальными факторами, национальными традициями и обычаями населения, что сопровождалось активизацией механизма передачи возбудителя инфекции с реализацией преимущественно пищевого и контактного путей передачи при ритуальных обрядах [6].

Полногеномное секвенирование – GeneExpert и эпидемиологический анализ. С целью установления возможного происхождения штаммов, вызвавших эпидемические осложнения в Республике Дагестан, было проведено полногеномное секвенирование штаммов, которое предусматривало также выявление в их геноме особенностей, характерных для геновариантов холерных вибрионов, обладающих повышенным эпидемическим потенциалом. В исследование взяты штаммы из разных VNTR-кластеров: *V. cholerae* с генотипами C4 (№ 16228-РД), F3 (№ 17261-РД), I1 (№ 17296-РД) и A1 (штамм № 18329-К). Дополнительно включен в анализ штамм № 17290-РД, полногеномное секвенирование которого проведено ранее.

При изучении особенностей генома *V. cholerae* с помощью авторской программы SeqAnalyzer выявлено наличие генов *rtxC* (при отсутствии *cas3* *V. cholerae cholerae*) и *wbe*, определяющих принадлежность к биовару Эль Тор, серогруппе O1 соответственно. В полногеномных сиквенсах идентифицированы и охарактеризованы несколько генов и участков генома, наиболее значимых для определения эпидемического потенциала исследуемых

штаммов. В частности, были определены последовательности коровой области генома профагов CTXφ (гены *cep*, *orfU*, *ace*, *zot*, *ctxAB*), которые оказались идентичными у четырех дагестанских и одного казанского штамма. При этом ген *ctxB* относился к классическому типу B1, поскольку имел 2 нуклеотидных замены тимина на цитозин (Т/С) в позициях 115 и 203. Промоторная область *ctxAB*-оперона содержала 4 гептануклеотидных повтора TTTTGAT, что характерно для большинства штаммов биовара Эль Тор. Что касается гена *rstR*, то у всех штаммов выявлен аллель *rstR*^{El}. Однако при анализе полногеномных сиквенсов у штаммов № 16228-РД, 17261-РД и 17290-РД (в отличие от сиквенсов у штаммов № 17296-РД и 18329-К) в других контигах также обнаружен *rstR*^{Class}, что указывает на присутствие в геномах этих штаммов второго профага – CTXφ^{Class} либо RS1^{Class}. Таким образом, выявленные профаги CTX оказались «гибридными», что свидетельствовало об изменчивости генома профага CTX у возбудителя холеры, обусловившего эпидемические проявления инфекции в 1994 г. Такие генетически измененные штаммы *V. cholerae* считаются более вирулентными по сравнению с типичными холерными вибрионами биовара Эль Тор [16, 20].

Ген *rtxA*, кодирующий высокомолекулярный цитотоксин MARTX, не содержал null-мутации в позиции 13602, характерной для геновариантов, упоминаемых в работах J.Dolores, K.J.F.Sachell [18], P.B.Писанова и соавт. [10], т.е. его продукт сохранил, по-видимому, функциональное состояние. Штаммы содержали интактные острова патогенности VPI и пандемичности VSP-II, идентичные типовому штамму N16961.

Заслуживают внимания данные о присутствии в геноме исследуемых клинических штаммов Эль Тор генетического элемента SXT^{ET}. Выявлен кластер генов множественной антибиотикорезистентности у штаммов № 16228-РД, 17290-РД и 17296-РД: *floR* (устойчивость к хлорамфениколу), *strA* (устойчивость к аминогликозидам), *strB* (компонент устойчивости к стрептомицину), *sul2* (устойчивость к сульфаметоксазолу). Данный кластер генов (интегративный конъюгативный элемент «индийского» типа SXT-ICE-Ind) является типичным для эпидемических штаммов, выделенных в Бангладеш, Индии в 1990-е годы. Вместе с тем у штаммов № 17261-РД и 18329-К SXT-элемент отсутствовал, что с учетом данных о преимущественном выделении штаммов, лишенных SXT, из водных источников [21, 23] может подтверждать имевшую место реализацию соответствующего пути распространения возбудителя инфекции во время эпидемии холеры в Республике Дагестан [6] и вспышки в Казани, обусловленной идентичными клиническими штаммами и штаммами из объектов окружающей среды [8].

Особую значимость имеют данные об обнаружении/отсутствии у исследуемых штаммов мобильных генетических элементов ICE, в частности,

гена резистентности к антибиотикам тетрациклиновой группы – *tetA* (рис. 2). С помощью программы GeneGraph была построена дендрограмма и проведен анализ, позволивший установить наличие у штамма № 16228-РД гена *tetA^R* (мозамбикский тип – ICE-Moz). Это согласуется с данными по изоляции на разных этапах эпидемии устойчивых к антибиотикам штаммов холерных вибрионов от больных и явилось одной из возможных причин формирования вибриононосительства, в том числе реконвалесцентного [6]. Штаммы № 17261-РД и 17296-РД, выделенные на более поздних этапах эпидемии, были лишены гена *tetA^R* (индийский тип ICE-Ind), что свидетельствует о полиморфизме ICE-элемента, генетическом разнообразии изученных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор и, на наш взгляд, косвенно подтверждает имевшие место неоднократные завозы инфекции на этапах эпидемии с разными источниками и факторами передачи, отражающими, в том числе, различные экологические условия обитания возбудителя инфекции.

Таким образом, приведенные данные позволяют заключить, что все штаммы, вызвавшие эпидемические осложнения в Дагестане, по структуре основных факторов, связанных с патогенностью, относятся к геновари-

антам по наличию аллеля *ctxB1* в составе генома гибридного профага CTX и у трех штаммов – аллеля гена *rstR^{Class}*, который присутствовал вместе с аллелем *rstR^{El}*. Такие варианты появились в эндемичных по холере странах Азии в начале 1990-х годов и довольно быстро вытеснили «прототипные» вибрионы Эль Тор [25], что совпадает по времени с эпидемией.

С целью установления возможного происхождения штаммов, вызвавших эпидемические осложнения, проведен анализ полногеномных последовательностей их ДНК. По итогам анализа, с помощью программы GeneExpert была построена дендрограмма, отражающая генетическую близость между штаммами (рис. 3). При этом штаммы *Vibrio cholerae* № 16228-РД (VNTR-генотип C4) и № 17261-РД (VNTR-генотип F3) оказались генетически близкородственными штаммам из Бангладеш (№ AG-7404, Бангладеш-1991) и Мехико (№ CP1033, Мехико-2000). В то же время штаммы холерного вибриона № 17296 (VNTR-генотип II) и № 18329 (Казань, 2001, VNTR-генотип A1) по данным полногеномного секвенирования попали в отдельный кластер с непальскими *V. cholerae* (№ Nep-21106, Непал-2003) и № Nep-21113, Непал-2003). Штамм № 17290-РД также попал в отдельный кластер с ин-

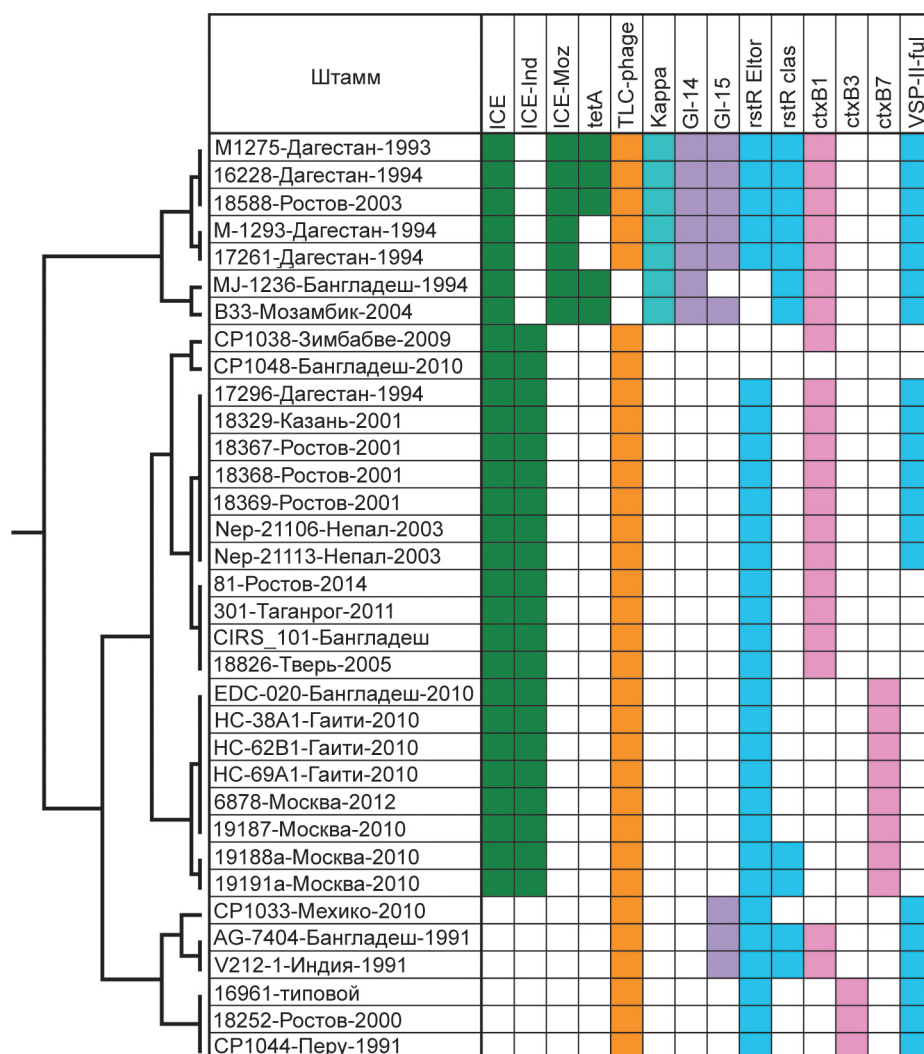


Рис. 2. Дендрограмма, построенная на основании распределения значимых для дискриминации генов *V. cholerae*:

ICE – интегративно-конъюгативный элемент (ICE-Ind – индийский тип, ICE-Moz – мозамбикский тип); *tetA* – ген резистентности к тетрациклину; TLC – профаг TLC, Kappa – фаг Kappa, GI-14 и GI-15 – геномные островки, *rstR*-Eltor и *rstR*-class – аллели гена *rstR*; *ctxB1*, *ctxB3*, *ctxB7* – аллели гена *ctxB*; VSP-II-full – полный остров персистенции VSP-II

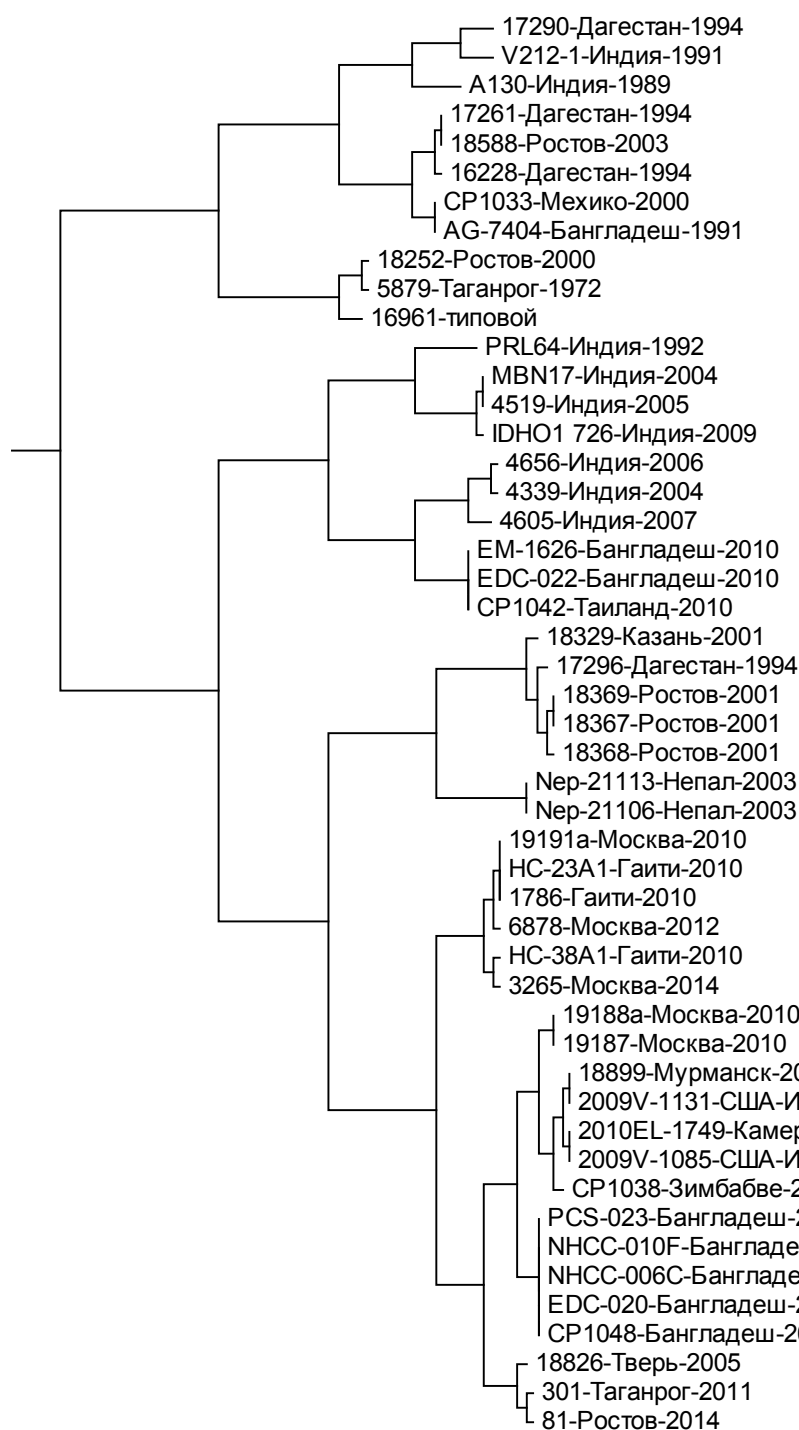


Рис. 3. Дендрограмма, построенная на основе анализа данных полногеномного секвенирования штаммов холерного вибриона

дийскими *V. cholerae* (V212-Индия, 1991).

Приведенные данные по происхождению штаммов, полученные на основании их полногеномного секвенирования, подтверждают самостоятельное возникновение первичных очагов холеры, обусловленное имевшими место завозами холеры – как межгосударственными, так и внутри Республики Дагестан – на разных этапах эпидемии: в Каякентский район – в июне (штамм № 16228-РД), в Унцукульский район – в июле (штамм № 17296-РД), в Шамилский район – в августе (штамм № 17290-РД). Несмотря на то, что штаммы *Vibrio cholerae* № 16228-РД и 17261-РД оказались генетически близкородственными штаммам

из Бангладеш и Мехико, они относились к разным VNTR-генотипам циркулирующих штаммов в условиях интенсивно протекающего эпидемического процесса во времени и пространстве.

При анализе некоторых эпидемиологических аспектов холеры, обусловленной генетически измененными вариантами *V. cholerae* O1 Эль Тор, в частности, действующих факторов передачи возбудителя инфекции, следует отметить, что в Дагестане в 58,0 % случаев распространение холеры происходило с реализацией контактно-бытового пути распространения, в 16,0 % – пищевого и 3,2 % – водного. В 22,8 % случаев пути и факторы передачи возбудителя ин-

фекции не установлены, что объяснялось широким распространением вибрионосителей (возможных источников инфекции) и трудностью их выявления. Указанные эпидемиологические особенности, наряду с имевшими место завозами, на различных этапах эпидемии обеспечили распространение инфекции во времени и пространстве. В отличие от этого, вспышка холеры водного происхождения в Казани также была обусловлена генетически измененными вариантами, но носила острый и локальный характер в силу территориальной привязки инфицированных и находившихся в одинаковых условиях по риску инфицирования к водному объекту, что способствовало локализации и ликвидации очага без распространения возбудителя инфекции. Это, на наш взгляд, еще раз подчеркивает, что генетически измененные варианты холерного вибриона, как и типичные холерные вибрионы, обусловившие 7-ю пандемию, играли не самостоятельную и определяющую роль в эпидемическом процессе, а в единстве с социальными факторами, в том числе традициями и обычаями населения.

Таким образом, ретроспективная оценка эпидемических проявлений холеры в 1994 г. в Республике Дагестан и молекулярно-генетический VNTR-анализ штаммов *V. cholera* O1 El Tor, выделенных на первых и последующих этапах эпидемии, свидетельствовали о гетерогенности популяции возбудителя по циркулирующим VNTR-генотипам в пределах республики и о выявлении идентичных VNTR-генотипов штаммов при имевшем место заносе холеры в Чеченскую Республику. Данные полногеномного секвенирования выделенных *V. cholerae* O1 El Tor позволили выявить в геноме штаммов особенности, характерные для геновариантов холерных вибрионов, содержащих в профаге CTXφ ген *ctxB^{Class}*, кодирующий В-субъединицу холерного токсина классического биовара, которые обладают повышенным эпидемическим потенциалом и в последние годы вытеснили типичных представителей *V. cholerae* El Tor. У части штаммов выявлен кластер генов множественной антибиотикорезистентности SXT^{ET}: *floR*, *strA*, *strB*, *sul2* – «индийского» типа – SXT-ICE-Ind, который является типичным для эпидемических штаммов, выделенных в Бангладеш и Индии в 1990-е годы. У одного из дагестанских и казанского штаммов SXT-элемент отсутствовал, что, с учетом преимущественного выделения не имеющих SXT холерных вибрионов из водных источников, может подтверждать имевшую место реализацию соответствующего пути распространения возбудителя инфекции во время эпидемии холеры в Республике Дагестан.

Ступенчатость филогенетического дерева позволила подтвердить связь со штаммами, обусловившими вспышки и эпидемии в странах Азии. По результатам полногеномного секвенирования штаммы *V. cholerae* O1 El Tor из Дагестана, выделенные на первом и последующих этапах развития эпидемии, оказались генетически близкородственными штам-

мам из Индии, Бангладеш и Непала. Это указывает на происхождение штаммов, а также на имевшие место независимые завозы холеры на разных этапах эпидемии. Филогенетическое родство дагестанских штаммов со штаммами из Азии также подтверждается наличием у исследуемых холерных вибрионов генетических мобильных элементов ICE, содержащих детерминанты резистентности к антибиотикам тетрациклиновой группы – *tetA*, что, в свою очередь, явилось одной из возможных причин широко распространенного вибрионосительства и формирования реконвалесцентного вибрионосительства у перенесших холеру.

Показано, что роль генетически измененных вариантов *V. cholerae* O1 El Tor с выявленными особенностями возбудителя на молекулярно-генетическом уровне как системообразующего фактора в возникновении и развитии эпидемического процесса в Республике Дагестан была непосредственно связана с социальными условиями, в частности, с меж- и внутригосударственной миграцией, а также с местными традициями населения, что обеспечило распространение инфекции во времени и пространстве, несмотря на комплекс проводимых противохолерных мероприятий. Используемые для сравнительного анализа штаммы, обусловившие вспышку холеры водного происхождения в Казани, также были генетически измененными вариантами, но водная вспышка носила острый и локальный характер без распространения возбудителя инфекции. Полученные данные имеют научное и прикладное значение для решения актуальных вопросов в рамках реализации основных современных направлений стратегии совершенствования эпидемиологического надзора за холерой в Российской Федерации, в том числе в плане оптимизации противохолерных мероприятий и обеспечения биологической безопасности населения нашей страны.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). СП 1.3.3118-13.
2. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин М.Б., Сучков И.Ю., Мишанькин Б.Н. Варибельные tandemные повторы, выявленные при компьютерном анализе генома *Vibrio cholerae*. *Биотехнология*. 2001; 6:85–8.
3. Водопьянов А.С. Холера. Штаммы–VNTR. Свидетельство о государственной регистрации базы данных. 2007620389 РФ.
4. Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I–II групп патогенности. МР 4.2.0089-14.
5. Миронова Л.В., Балахонов С.В., Урбанович Л.Я., Кожевникова А.С. Молекулярно-генетический анализ эпидемически опасных штаммов *Vibrio cholerae* El Tor, изолированных в Сибирском и Дальневосточном регионах России. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2012; 2:13–20.
6. Онищенко Г.Г., Беляев Е.Н., Москвитина Э.А., Резайкин В.И., Ломов Ю.М., Мединский К.М. Холера в Дагестане: прошлое и настоящее. Ростов/нД; 1995. 120 с.
7. Онищенко Г.Г., Ефременко В.И., Грижебовский Г.М. Противоэпидемическое обеспечение населения в условиях во-

оруженного конфликта в Чеченской Республике. Ставрополь: Ставрополье; 1996. 256 с.

8. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Мишанькин Б.Н., Мазрухо Б.Л., Подосинникова Л.С., Кудрякова Т.А., Москвитина Э.А., Водопьянов С.О., Рыжко И.В., Казакова Е.С., Шарова И.Н., Плотнокова Е.А., Давыдова Н.А., Абрамова Е.Г., Королев Ю.С., Шестиалтынова И.С., Шарифуллина Д.М., Куряева Н.Ю., Юмангулова Е.Ф., Чернышева А.В., Бугоркова Т.В., Русакова Т.Г., Масленникова А.Л., Милова М.В., Захарова Л.И., Билалов Т.Г., Шутько А.Г., Качкина Г.В. Характеристика холерных вибрионов, выделенных в Казани в 2001 году. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2002; 2:3–6.

9. Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Титова С.В., Адаменко О.Л., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О. Эпидемиологический надзор за холерой в России в период седьмой пандемии. *Вестник РАМН*. 2015; 70(2):249–56.

10. Писанов Р.В., Ежова М.И., Монахова Е.В., Черкасов А.В., Краснов Я.М., Водопьянов А.С., Кулышань Т.А., Ливанова Л.Ф., Портенко С.А., Абдрашитова А.С., Кругликов В.Д., Титова С.В. Особенности структуры генома токсигенного штамма *Vibrio cholerae* El Tor Инаба, выделенного в 2014 г. из открытого водоема в Ростове-на-Дону. *Пробл. особо опасных инф.* 2015; 2:63–7.

11. Савельев В.Н., Савельева И.В., Бабенышев Б.В., Куличенко А.Н. Эволюция возбудителя и клинико-эпидемиологические особенности современной холеры Эль-Тор. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2012; 5:31–5.

12. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Заднова С.П., Краснов Я.М., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Генетическая характеристика штаммов *Vibrio cholerae*, завезенных на территорию Российской Федерации в разные периоды 7 пандемий холеры. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2011; 3:3–10.

13. Черкасский Б.Л., Сергиев В.П., Ладный И.Д. Эпидемиологические аспекты международной миграции населения. М.: 1984. 208 с.

14. Bhuiyan N.A., Nusrin S., Ansaruzzaman M., Islam A., Sultana M., Alam M., Islam M.A., Cravioto A., Mukhopadhyay A.K., Nair G.B., Mwasna J.C., Endtz H.P. Genetic characterization of *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Zambia during 1996–2004 possessing the unique VSP-II region of El Tor variant. *Epidemiol. Infect.* 2012; 140(3):510–8. DOI: 10.1017/S0950268811000926.

15. Borkakoty B., Biswas D., Devi U., Yadav K., Mahanta J. Emergence of classical ctxB genotype 1 and tetracycline resistant strains of *Vibrio cholerae* O1 El Tor in Assam, India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2012; 106(6):382–6. DOI: 10.1016/j.trstmh.2012.03.005.

16. Chin C.S., Sorenson J., Harris J.B., Robins W.P., Charles R.C., Jean-Charles R.R., Bullard J., Webster D.R., Kasarskis A., Peluso P., Paxinos E.E., Yamaichi Y., Calderwood S.B., Mekalanos J.J., Schadt E.E., Waldor M.K. The Origin of the Haitian Cholera Outbreak Strain. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364(1):33–42. DOI: 10.1056/NEJMoal1012928.

17. Dixit S.M., Johura F.T., Manandhar S., Sadique A., Rajbhandari R.M., Mannan S.B., Rashid M.U., Islam S., Karmacharya D., Watanabe H., Sack R.B., Cravioto A., Alam M. Cholera outbreaks (2012) in three districts of Nepal reveal clonal transmission of multidrug resistant *Vibrio cholerae* O1. *BMC Infect. Dis.* 2014; 14(1):392. DOI: 10.1186/1471-2334-14-392.

18. Dolores J., Satchell K.J. Analysis of *Vibrio cholerae* genome sequences re-veals unique rtxA variants in environmental strains and an rtxA-null mutation in recent altered El-Tor isolates. *mBio*. 2013; 4(2):e00624. DOI: 10.1128/mBio.00624-12.

19. Goel A.K., Jain M., Kumar P., Bhaduria S., Kmbaj D.V., Singh L. A new variant of *Vibrio cholerae* O1 El Tor causing cholera in India. *J. Infect.* 2008; 57(3):280–1. DOI: 10.1016/j.jinf.2008.06.015.

20. Katz L.S., Petkau A., Beaulaurier J., Tyler S., Antonova E.S., Turnsek M.A., Guo Y., Wang S., Paxinos E.E., Orata F., Gladney L.M., Stroika S., Folster J.P., Rowe L., Freeman M.M., Knox N., Frace M., Boncy J., Graham M., Hammer B.K., Boucher Y., Bashir A., Hanage W.P., Van Domselaar G., Tarr C.L. Evolutionary dynamics of *Vibrio cholerae* O1 following a single-source introduction to Haiti. *mBio*. 2013; 4(4):e00398–13. DOI: 10.1128/mBio.00398-13.

21. Klinking D.C., Choi S.Y., Hasan N.A., Matias R.R., Tayag E., Geronimo J., Skowronski E., Rashed S.M., Kawashima K., Rosenzweig C.N., Gibbons H.S., Torres B.C., Liles V., Alfons A.C., Juan M.L., Natividad F.F., Cebula T.A., Colwell R.R. Hybrid *V. cholerae* El Tor lacking SXT identified as the cause of a cholera outbreak in the Philippines. *mBio*. 2015; 6(2):e00047-15. DOI: 10.1128/mBio.00047-15.

22. Kumar P., Mishra D.K., Deshmukh D.G., Jain M., Zade A.M., Ingole K.V., Goel A.K., Yadava P.K. *Vibrio cholerae* O1 Ogawa El Tor strains with the ctxB7 allele driving cholera outbreaks in south-western India in 2012. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 25:93–6. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.03.020.

23. Mutreja A., Kim D.W., Thomson N.R., Connor T.R., Lee J.H., Kariuki S., Croucher N.J., Choi S.Y., Harris S.R., Levens M., Niyogi S.K., Kim E.J., Ramamurthy T., Chun J., Wood J.L., Clemens J.D., Czerkinsky C., Nair G.B., Holmgren J., Parkhill J., Dougan

G. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature*. 2011; 477:462–5. DOI: 10.1038/nature10392.

24. Naha A., Pazhani G.P., Ganguly M., Ghosh S., Ramamurthy T., Nandy R.K., Nair G.B., Takeda Y., Mukhopadhyay A.K. Development and evaluation of a PCR assay for tracking the emergence and dissemination of Haitian variant ctxB in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated from Kolkata, India. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(5):1733–6. DOI: 10.1128/JCM.00387-12.

25. Na-Ubol M., Srimanote P., Chongsang-Nguan M., Indrawattana N., Sookrung N., Tapchaisri P., Yamazaki S., Bodhidatta L., Eampokalap B., Kurazono H., Hayashi H., Nair G.B., Takeda Y., Chaicumpa W. Hybrid & El Tor variant biotypes of *Vibrio cholerae* O1 in Thailand. *Indian J. Med. Res.* 2011; 133:387–94.

26. Pal B.B., Khuntia H.K., Samal S.K., Kar S.K., Patnaik B. Epidemics of severe cholera caused by El Tor *Vibrio cholerae* O1 Ogawa possessing the ctxB gene of the classical biotype in Orissa, India. *Int. J. Infect. Dis.* 2010; 14(5):e384–9. DOI: 10.1016/j.ijid.2009.06.020.

27. Ramamurthy T., Sharma N.C. Cholera outbreaks in India. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014; 379:49–85. DOI: 10.1007/82_2014_368.

28. Reimer A.R., Van Domselaar G., Stroika S., Walker M., Kent H., Tarr C., Talkington D., Rowe L., Olsen-Rasmussen M., Frace M., Sammons S., Dahourou G.A., Boncy J., Smith A.M., Mabon P., Petkau A., Graham M., Gilmour M.W., Gerner-Smidt P. Comparative genomics of *Vibrio cholerae* from Haiti, Asia, and Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(11):2113–21. DOI: 10.3201/eid1711.110794.

29. Robins W.P., Mekalanos J.J. Genomic science in understanding cholera outbreaks and evolution of *Vibrio cholerae* as a human pathogen. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014; 379:211–29. DOI: 10.1007/82_2014_366.

30. Spagnoletti M., Ceccarelli D., Colombo M.M. Rapid detection by multiplex PCR of Genomic Islands, prophages and Integrative Conjugative Elements in *V. cholerae* 7th pandemic variants. *J. Microbiol. Methods*. 2012; 88(1):98–102. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.10.017.

31. Talkington D., Bopp C., Tarr C., Parsons M.B., Dahourou G., Freeman M., Joyce K., Turnsek M., Garrett N., Humphrys M., Gomez G., Stroika S., Boncy J., Ochieng B., Oundo J., Klena J., Smith A., Keddy K., Gerner-Smidt P. Characterization of toxigenic *Vibrio cholerae* from Haiti, 2010–2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(11):2122–9. DOI: 10.3201/eid1711.110805.

References

- [Safety of works with microorganisms of the I–II groups of pathogenicity (hazard)]. SR 1.3.3118-13.
- Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Mishan'kin M.B., Suchkov I.Yu., Mishan'kin B.N. [Variable tandem repeats, detected by means of computer-based analysis of *Vibrio cholerae* genome]. *Biotechnologiya*. 2001; 6:85–8.
- Vodop'yanov A.S. [Cholera. VNTR-Strains]. Certificate of State Registration of a database. 2007620389 RF.
- [Application of the time-of-flight mass spectrometry with matrix-activated laser desorption/ionization (MALDI-ToF MS) for indication and identification of the agents of the I–II groups of pathogenicity]. MR 4.2.0089-14.
- Mironova L.V., Balakhonov S.V., Urbanovich L.Ya., Kozhevnikova A.S. [Molecular-genetic analysis of epidemically hazardous *Vibrio cholerae* El Tor strains, isolated in Siberian and Far Eastern regions of Russia]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2012; 2:13–20.
- Onishchenko G.G., Belyaev E.N., Moskvitina E.A., Rezaikin V.I., Lomov Yu.M., Medinsky K.M. [Cholera in Dagestan: Past and Present]. Rostov-on-Don: 1995. 120 p.
- Onishchenko G.G., Efremenko V.I., Grizhebovsky G.M. [Anti-epidemic provision of the population under military conflict in Chechen Republic]. Stavropol: 1996. 256 p.
- Onishchenko G.G., Lomov Yu.M., Mishan'kin B.N., Mazrukho B.L., Podosinnikova L.S., Kudryakova T.A., Moskvitina E.A., Vodop'yanov S.O., Ryzhko I.V., Kazakova E.S., Sharova I.N., Plotnikova E.A., Davydova N.A., Abramova E.G., Korolev Yu.S., Shestialtynova I.S., Sharifulina D.M., Kuryaeva N.Yu., Yumangulova E.F., Chernysheva A.V., Bugorkova T.V., Rusakova T.G., Maslenikova A.L., Milova M.V., Zakharova L.I., Bilalov T.G., Shut'ko A.G., Kachkina G.V. [Characteristics of cholera vibrios, isolated in Kazan in 2001]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2002; 2:3–6.
- Onishchenko G.G., Moskvitina E.A., Kругликов В.Д., Титова С.В., Адаменко О.Л., Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O. [Epidemiological surveillance over cholera in Russia during the seventh cholera pandemic]. *RAMS Bulletin*. 2015; 70(2):249–56.
- Pisanov R.V., Ezhova M.I., Monakhova E.V., Cherkasov A.V., Krasnov Ya.M., Vodop'yanov A.S., Kul'shan T.A., Livanova L.F., Portenko S.A., Abdrazhitova A.S., Kругликов В.Д., Титова С.В. [Peculiarities of genome structure of the toxigenic *Vibrio cholerae* El Tor Inaba strain, isolated from a surface water body in the territory of Rostov-on-Don in 2014]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2015; 2:63–7.
- Savel'ev V.N., Savel'eva I.V., Babenyshv B.V., Kulichenko A.N. [Evolution of the agent and clinical-epidemiological peculiarities of the present-day cholera El Tor]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2012; 3:3–10.
- Smirnova N.I., Goryaev A.A., Zаднова S.P., Krasnov Ya.M., Lozovsky Yu.V., Kutyrev V.V. [Genetic characteristics of *Vibrio cholerae* strains, imported in the Russian Federation in different periods of the seventh cholera pandemic]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2011; 3:3–10.

13. Cherkassky B.L., Sergiev V.P., Ladny I.D. [Epidemiological Aspects of International Population Migration]. M.; 1984. 208 p.
14. Bhuiyan N.A., Nusrin S., Ansaruzzaman M., Islam A., Sultana M., Alam M., Islam M.A., Cravioto A., Mukhopadhyay A.K., Nair G.B., Mwasna J.C., Endtz H.P. Genetic characterization of *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Zambia during 1996–2004 possessing the unique VSP-II region of El Tor variant. *Epidemiol. Infect.* 2012; 140(3):510–8. DOI: 10.1017/S0950268811000926.
15. Borkakoty B., Biswas D., Devi U., Yadav K., Mahanta J. Emergence of classical ctxB genotype 1 and tetracycline resistant strains of *Vibrio cholerae* O1 El Tor in Assam, India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2012; 106(6):382–6. DOI: 10.1016/j.trstmh.2012.03.005.
16. Chin C.S., Sorenson J., Harris J.B., Robins W.P., Charles R.C., Jean-Charles R.R., Bullard J., Webster D.R., Kasarskis A., Peluso P., Paxinos E.E., Yamaichi Y., Calderwood S.B., Mekalanos J.J., Schadt E.E., Waldor M.K. The origin of the Haitian cholera outbreak strain. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364(1):33–42. DOI: 10.1056/NEJMoa1012928.
17. Dixit S.M., Johura F.T., Manandhar S., Sadique A., Rajbhandari R.M., Mannan S.B., Rashid M.U., Islam S., Karmacharya D., Watanabe H., Sack R.B., Cravioto A., Alam M. Cholera outbreaks (2012) in three districts of Nepal reveal clonal transmission of multi-drug resistant *Vibrio cholerae* O1. *BMC Infect. Dis.* 2014; 14(1):392. DOI: 10.1186/1471-2334-14-392.
18. Dolores J., Satchell K.J. Analysis of *Vibrio cholerae* genome sequences re-reveals unique rtxA variants in environmental strains and an rtxA-null mutation in recent altered El-Tor isolates. *mBio*. 2013; 4(2):e00624. DOI: 10.1128/mBio.00624-12.
19. Goel A.K., Jain M., Kumar P., Bhaduria S., Kmbaj D.V., Singh L. A new variant of *Vibrio cholerae* O1 El Tor causing cholera in India. *J. Infect.* 2008; 57(3):280–1. DOI: 10.1016/j.jinf.2008.06.015.
20. Katz L.S., Petkau A., Beaulaurier J., Tyler S., Antonova E.S., Turnsek M.A., Guo Y., Wang S., Paxinos E.E., Orata F., Gladney L.M., Stroika S., Folster J.P., Rowe L., Freeman M.M., Knox N., Frace M., Boncy J., Graham M., Hammer B.K., Boucher Y., Bashir A., Hanage W.P., Van Domselaar G., Tarr C.L. Evolutionary dynamics of *Vibrio cholerae* O1 following a single-source introduction to Haiti. *mBio*. 2013; 4(4):e00398–13. DOI: 10.1128/mBio.00398-13.
21. Klinzing D.C., Choi S.Y., Hasan N.A., Matias R.R., Tayag E., Geronimo J., Skowronski E., Rashed S.M., Kawashima K., Rosenzweig C.N., Gibbons H.S., Torres B.C., Liles V., Alfon A.C., Juan M.L., Natividad F.F., Cebula T.A., Colwell R.R. Hybrid *V. cholerae* El Tor lacking SXT identified as the cause of a cholera outbreak in the Philippines. *mBio*. 2015; 6(2):e00047-15. DOI: 10.1128/mBio.00047-15.
22. Kumar P., Mishra D.K., Deshmukh D.G., Jain M., Zade A.M., Ingole K.V., Goel A.K., Yadava P.K. *Vibrio cholerae* O1 Ogawa El Tor strains with the ctxB7 allele driving cholera outbreaks in south-western India in 2012. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 25:93–6. DOI: 10.1016/j.meegid.2014.03.020.
23. Mutreja A., Kim D.W., Thomson N.R., Connor T.R., Lee J.H., Kariuki S., Croucher N.J., Choi S.Y., Harris S.R., Lebens M., Niyogi S.K., Kim E.J., Ramamurthy T., Chun J., Wood J.L., Clemens J.D., Czerkinsky C., Nair G.B., Holmgren J., Parkhill J., Dougan G. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature*. 2011; 477:462–5. DOI: 10.1038/nature10392.
24. Naha A., Pazhani G.P., Ganguly M., Ghosh S., Ramamurthy T., Nandy R.K., Nair G.B., Takeda Y., Mukhopadhyay A.K. Development and evaluation of a PCR assay for tracking the emergence and dissemination of Haitian variant ctxB in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated from Kolkata, India. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(5):1733–6. DOI: 10.1128/JCM.00387-12.
25. Na-Ubol M., Srimanote P., Chongsa-Nguan M., Indrawattana N., Sookrungr N., Tapchaisri P., Yamazaki S., Bodhidatta L., Eampokalap B., Kurazono H., Hayashi H., Nair G.B., Takeda Y., Chaicumpa W. Hybrid & El Tor variant biotypes of *Vibrio cholerae* O1 in Thailand. *Indian J. Med. Res.* 2011; 133:387–94.
26. Pal B.B., Khuntia H.K., Samal S.K., Kar S.K., Patnaik B. Epidemics of severe cholera cause by El Tor *Vibrio cholerae* O1 Ogawa possessing the ctxB gene of the classical biotype in Orissa, India. *Int. J. Infect. Dis.* 2010; 14(5):e384–9. DOI: 10.1016/j.ijid.2009.06.020.
27. Ramamurthy T., Sharma N.C. Cholera outbreaks in India. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014; 379:49–85. DOI: 10.1007/82_2014_368.
28. Reimer A.R., Van Domselaar G., Stroika S., Walker M., Kent H., Tarr C., Talkington D., Rowe L., Olsen-Rasmussen M., Frace M., Sammons S., Dahourou G.A., Boncy J., Smith A.M., Mabon P., Petkau A., Graham M., Gilmour M.W., Gerner-Smidt P. Comparative genomics of *Vibrio cholerae* from Haiti, Asia, and Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(11):2113–21. DOI: 10.3201/eid1711.110794.
29. Robins W.P., Mekalanos J.J. Genomic science in understanding cholera outbreaks and evolution of *Vibrio cholerae* as a human pathogen. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014; 379:211–29. DOI: 10.1007/82_2014_366.
30. Spagnoletti M., Ceccarelli D., Colombo M.M. Rapid detection by multiplex PCR of Genomic Islands, prophages and Integrative Conjugative Elements in *V. cholerae* 7th pandemic variants. *J. Microbiol. Methods*. 2012; 88(1):98–102. DOI: 10.1016/j.mimet.2011.10.017.
31. Talkington D., Bopp C., Tarr C., Parsons M.B., Dahourou G., Freeman M., Joyce K., Turnsek M., Garrett N., Humphrys M., Gomez G., Stroika S., Boncy J., Ochieng B., Oundo J., Klena J., Smith A., Keddy K., Gerner-Smidt P. Characterization of toxigenic *Vibrio cholerae* from Haiti, 2010–2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(11):2122–9. DOI: 10.3201/eid1711.110805.

Authors:

Onishchenko G.G. Russian Academy of Sciences. Moscow, Russian Federation.

Moskvitina E.A., Vodop'janov A.S., Monakhova E.V., Pisanov R.V., Vodop'janov S.O., Chemisova O.S., Kruglikov V.D., Titova S.V. 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:

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

Москвитина Э.А., Водопьянов А.С., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Чемисова О.С., Кругликов В.Д., Титова С.В. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.

Поступила 04.05.16.

А.Ю.Попова^{1,2}, Ю.В.Демина¹, Е.Б.Ежлова¹, А.Н.Куличенко³, А.Г.Рязанова³, В.В.Малеев⁴,
А.А.Плоскирева⁴, И.А.Дятлов⁵, В.С.Тимофеев⁵, Л.А.Нечепуренко⁶, В.В.Харьков⁷

ВСПЫШКА СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ В ЯМАЛО-НЕНЕЦКОМ АВТОНОМНОМ ОКРУГЕ В 2016 ГОДУ, ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ

¹Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Российская Федерация; ²Российская медицинская академия последилового образования, Москва, Российская Федерация; ³ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация; ⁴ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии», Москва, Российская Федерация; ⁵ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии, п. Оболensk, Российская Федерация; ⁶Управление Роспотребнадзора по Ямало-Ненецкому автономному округу, Салехард, Российская Федерация; ⁷ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ямало-Ненецком автономном округе», Салехард, Российская Федерация

В 2016 г. на территории Ямало-Ненецкого автономного округа возникла эпидемия сибирской язвы, при этом заболело 2650 северных оленей. В результате контакта с больными и павшими животными заболело 36 человек с одним летальным исходом. Проведенный в полном объеме комплекс противоэпидемических, противоэпизоотических и профилактических мероприятий, оперативная организация работы на региональном уровне позволили в максимально короткие сроки локализовать крупный очаг сибирской язвы. На основании опыта работы во время вспышки определены пути дальнейшего совершенствования эпидемиологического надзора и профилактики сибирской язвы в современных условиях.

Ключевые слова: сибирская язва, эпизоотия, северные олени, противоэпидемические мероприятия.

Корреспондирующий автор: Александр Николаевич Куличенко, e-mail: snipchi@mail.stv.ru.

A.Yu.Popova^{1,2}, Yu.V.Demina¹, E.B.Ezhlova¹, A.N.Kulichenko³, A.G.Ryazanova³, V.V.Maleev⁴,
A.A.Ploskireva⁴, I.A.Dyatlov⁵, V.S.Timofeev⁵, L.A.Nechepurenko⁶, V.V.Khar'kov⁷

Outbreak of Anthrax in the Yamalo-Nenets Autonomous District in 2016, Epidemiological Peculiarities

¹Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation; ²Russian Medical Academy for Post-Graduate Training, Moscow, Russian Federation; ³Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation; ⁴Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation; ⁵State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation; ⁶Rospotrebnadzor Administration in the Yamalo-Nenets Autonomous District, Salekhard, Russian Federation; ⁷Center of Hygiene and Epidemiology in the Yamalo-Nenets Autonomous District, Salekhard, Russian Federation

In 2016, in the territory of Yamalo-Nenets Autonomous District an outbreak of anthrax took place, 2650 reindeers were infected. As a consequence of contacts with affected and fallen animals, 36 cases of human infection occurred, of which one was fatal. Performed full-extent complex of anti-epidemic, anti-epizootic, and preventive measures, prompt organization of operations at the regional level allowed for localization of large-scale anthrax focus within the minimum possible time. Based on the lessons learned, identified were the ways to further enhancement of epidemiological surveillance and prophylaxis of anthrax under current conditions.

Key words: anthrax, epizooty, reindeers, anti-epidemic measures.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Alexander N. Kulichenko, e-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Citation: Popova A.Yu., Demina Yu.V., Ezhlova E.B., Kulichenko A.N., Ryazanova A.G., Maleev V.V., Ploskireva A.A., Dyatlov I.A., Timofeev V.S., Nechipurenko L.A., Khar'kov V.V. Outbreak of Anthrax in the Yamalo-Nenets Autonomous District in 2016, Epidemiological Peculiarities. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 4:42–46. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-42-46

Сибирская язва – особо опасная бактериальная зоонозная инфекция, способная благодаря длительному сохранению в почве спор *Bacillus anthracis* сохранять угрозу возвращения и повторных вспышек на пораженных территориях в течение многих десятилетий. Основным источником инфекции для человека является больное животное или его труп, факторами передачи – продукты животноводства, почва и другие объекты окружающей среды.

На территории Российской Федерации насчитывается свыше 35 тыс. стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов (СНП), в которых учте-

но около 8 тыс. сибиреязвенных скотомогильников. При этом существует высокая вероятность наличия значительного количества неучтенных сибиреязвенных захоронений [2].

За последние 20 лет, в период с 1996 по 2015 год, в Российской Федерации по сравнению с предыдущим двадцатилетним периодом (1976–1995 гг.), число случаев заболеваний сибирской язвой у людей сократилось в 3,3 раза – всего заболело 299 человек. Болезнь регистрировалась в 34 субъектах 6 федеральных округов.

В Российской Федерации в 2016 г. осложнилась

обстановки по сибирской язве, связанная с крупнейшей эпизоотией среди северных оленей в Ямало-Ненецком автономном округе (ЯНАО) и повлекшая за собой эпидемические осложнения.

Заполярная территория Западной Сибири в прошлом была крайне неблагополучной по сибирской язве. Имеются сведения о крупных эпизоотиях сибирской язвы в Малоземельской и Большеземельской тундре начиная с 1760 г. В ЯНАО выявлено до 60 СНП общей площадью свыше 2 млн га, где в период с 1898 по 1941 год зарегистрировано 68 эпизоотий, в которых пало около 1 млн оленей. Случаи заболевания людей документально зарегистрированы в 1931 и 1941 гг. Эпизоотии сибирской язвы, как правило, возникали в теплое время года, начинаясь с единичных случаев в связи с заражением животных при контакте с контаминированной возбудителем почвой, а дальнейшее развитие процесса с вовлечением большого количества животных было обусловлено трансмиссивным механизмом передачи возбудителя. Массовые падежи оленей приводили к постоянному обсеменению почвы возбудителем сибирской язвы, попадавшим в нее с трупами павших животных. Вместе с тем последняя известная эпизоотия сибирской язвы на Ямале зарегистрирована 75 лет назад – в 1941 г. Коренное улучшение эпизоотической ситуации явилось следствием того, что в 40-е годы на Ямале вакцинопрофилактикой было охвачено все поголовье животных. В последующие годы случаев сибирской язвы не зарегистрировано, попытки выделить возбудитель инфекции из почвы оказались безрезультатными [3]. В 2007 г. вакцинация северных оленей против сибирской язвы была прекращена.

В июне–июле 2016 г. в ЯНАО отмечалась температурная аномалия, когда дневная температура достигала 29–34 °С, что способствовало увеличению глубины сезонного таяния многолетней мерзлоты и перемещению спор сибиреязвенного микроба из глубинных слоев к поверхности почвы с межмерзлотными водами. Увеличение численности кровососущих насекомых, а также негативное воздействие жары на иммунную систему оленей на фоне прекращения вакцинации, очевидно, стали причиной массового заболевания сибирской язвой северных оленей.

25 июля 2016 г. в Управление Роспотребнадзора по ЯНАО поступила информация из службы ветеринарии ЯНАО о получении из ГАУ «Тюменская областная ветеринарная лаборатория» предварительной информации по выявлению возбудителя сибирской язвы в патологическом материале от павших в районе озера Ярато северных оленей, принадлежащих частным оленеводческим хозяйствам Ямальского района.

Предположительно первый случай гибели оленей от сибирской язвы имел место 7 июля 2016 г. в стаде оленевода-частника в районе о. Письёто, устье р. Неросавейяха (рис. 1). В дальнейшем падеж увеличился: с 17 по 19 июля в стаде пало 200 голов северного оленя и 4 собаки [1].

Всего по данным Россельхознадзора, в период эпизоотии на Ямале в 2016 г. (16 июля – 3 августа) сибирской язвой заболело 2650 оленей, из которых 2350 голов пало, а 300 подверглись вынужденному убою. Эпизоотии зафиксированы в Ямальском районе округа (о. Письёто, о. Большое Ядванто, о. Малое Ядванто, о. Тэтато, пос. Новый Порт). В Тазовском районе (Пякяхинское нефтегазоконденсатное месторождение) в начале августа от сибирской язвы пал 1 олень. Зона эпизоотии составила около 45–60 км, угрожаемая территория – 110×150 км, общее поголовье оленей угрожаемой зоны – 94853 головы. Численность населения непосредственно в зоне эпизоотии составляла 236 человек (в том числе 103 ребенка), в Новопортовском эпизоотическом очаге – 91 человек (включая 32 ребенка), в угрожаемой зоне находилось еще 539 человек (в том числе 217 детей).

В период с 25 июля по 2 августа в Ямальском районе ЯНАО было зарегистрировано 36 случаев заболевания людей сибирской язвой из числа 97 госпитализированных. Диагноз был подтвержден лабораторными методами у 27 пациентов, у 9 человек диагноз установлен на основании клинической картины, данных эпидемиологического анамнеза (контакт различного рода с заболевшими животными, продуктами животноводства), выделением культуры возбудителя сибирской язвы из материала от источника инфекции (олень). Первые заболевшие считали себя больными с 18 июля. Госпитализация 98 % больных проведена в процессе их активного выявления в рамках проводимых противоэпидемических мероприятий в период с 25 июля по 1 августа. В первые дни время между заболеванием и госпитализацией составляло 7 сут, далее этот временной промежуток сокращался и к 1 августа составил менее 1 дня. Средний срок поступления в стационар от момента появления первых симптомов был $(2,1 \pm 0,4)$ дня.

Особенностью вспышки было вовлечение в инфекционный процесс большого количества детей до



Рис. 1. Места проявления вспышки (эпизоотии) сибирской язвы в 2016 году:

1 – оз. Большое Ядванто; 2 – оз. Малое Ядванто; 3 – оз. Тэтато; 4 – оз. Письёто; 5 – оз. Ярато; 6 – с-з «Ярсалинский»; 7 – пос. Новый Порт; 8 – Пякяхинское нефтегазоконденсатное месторождение

18 лет (50 %), в том числе 28 % детей до 14 лет.

В клинической структуре преобладала кожная форма инфекции, составившая 58,3 % (21 человек), которая развилась в связи с непосредственным контактом с больными животными и тушами павших оленей. У 30,6 % пациентов (11 человек) отмечена достаточно редкая орофарингеальная форма сибирской язвы, развитие которой наблюдалось после употребления крови и сырого мяса вынужденно прирезанного агонирующего оленя. У одного больного кишечная форма сибирской язвы с развитием вторичного сибиреязвенного сепсиса после употребления крови больного животного привела к летальному исходу. В 3 случаях форма сибирской язвы расценена как неуточненная (8,3 %).

Анализ тяжести течения заболевания в зависимости от клинической формы показал, что для кожной формы наиболее характерна была средняя степень тяжести, при орофарингеальной форме одинаково часто регистрировалось среднетяжелое и тяжелое течение, при этом легких форм не установлено. У пациента с диагностированной интестинальной формой сибирской язвы была установлена тяжелая форма заболевания, а у пациентов с неуточненной формой – легкая и среднетяжелая формы (рис. 2).

Эпидемиологическое расследование началось немедленно (25 июля) после поступления информации в Управление Роспотребнадзора по ЯНАО о получении из ГАУ «Тюменская областная ветеринарная лаборатория» предварительной информации о выявлении возбудителя сибирской язвы в патологическом материале от павших северных оленей, принадлежащих частным оленеводческим хозяйствам, в Ямальском районе округа. Эпидемиологическое расследование проводилось с участием специалистов ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора (Референс-центра по мониторингу за возбудителем сибирской язвы), ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора. За период работы было отобрано

более 1040 проб различного материала, включая клинические образцы, материал от животных, насекомых, пробы из объектов окружающей среды (почвы, воды, придонного ила, смывы с оборудования и инвентаря и пр.), в том числе в целях контроля качества дезинфекции. Проведено свыше 2500 лабораторных исследований с использованием классических микробиологических и современных молекулярно-генетических методов.

С первых дней с целью оперативного обеспечения диагностических и мониторинговых исследований на наличие возбудителей особо опасных инфекций на базе ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в ЯНАО» была развернута работа специализированной противоэпидемической бригады (СПЭБ) ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора. При исследовании клинического материала методом ПЦР у 25 человек обнаружена ДНК *Bacillus anthracis*, из них у 3 выделена культура возбудителя сибирской язвы. Еще у двух пациентов диагноз был подтвержден при использовании дополнительных методов исследования (обнаружение противосибиреязвенных антител в сыворотках крови непрямым методом флуоресцирующих антител, проба *in vitro* с сибиреязвенным аллергеном). Культура *B. anthracis* также была выделена из материала от павшего оленя. Получены положительные результаты при исследовании двух проб зольных остатков после сжигания павших оленей: в одной из проб обнаружен возбудитель сибирской язвы, в другой – ДНК *B. anthracis*. В результате проведенного лабораторного анализа установлено, что все выделенные штаммы обладают идентичным комплексом биологических свойств, характерных для типичных вирулентных штаммов возбудителя сибирской язвы, высокой вирулентностью (LD_{50} – 23 споры). Данные молекулярно-генетических исследований всех выделенных во время вспышки штаммов с использованием *canSNP*-, *MLVA31*-генотипирования, полногеномного секвенирования свидетельствовали о их идентичности.

В результате эпидемиологического расследования установлено, что случаи заболевания людей сибирской язвой непосредственно связаны с несвоевременно выявленной и поздно локализованной эпизоотией среди оленей, которая продолжалась около 3 недель до получения информации Роспотребнадзором от ветеринарной службы. С учетом массового падежа оленей в сложившихся условиях очевидна реализация инфекции среди животных трансмиссивным путем (слепни и другие кровососущие насекомые).

Анализ предполагаемых путей передачи возбудителя инфекции у пациентов показал, что для данной эпидемической вспышки наиболее вероятными путями передачи инфекции среди людей можно считать контактный, при котором развивались преимущественно кожные формы заболевания, и пищевой, для которого характерными были гастроинтестинальная и орофарингеальная формы.

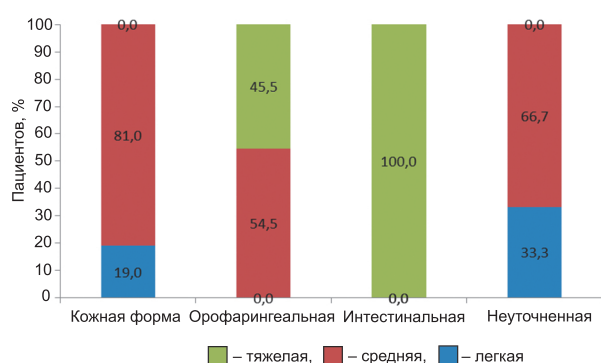


Рис. 2. Структура форм тяжести для различных клинических форм сибирской язвы, % пациентов

Контактный путь передачи инфекции был в основном представлен общением с больными и/или павшими животными (олени). Пациенты указывали на разделку туш животных, выделку шкур, уход за животными, у одного пациента было ранение рогом оленя нижней конечности. Пищевой путь передачи инфекции включал указания в эпидемиологическом анамнезе на употребление в пищу сырого мяса и крови или контакт слизистых оболочек с больными/павшими животными (двое подростков с тяжелой орофарингеальной формой указали на контакт с тушей погибшего животного, из которого зубами вытягивались сосиски с целью приготовления нитей для шитья). Дифференцированный анализ предполагаемых путей передачи инфекции в зависимости от клинической формы инфекции показал, что для кожных форм доминирующим путем передачи инфекции был контактный, для орофарингеальной формы – пищевой, у больного с интестинальной формой сибирской язвы также был установлен пищевой путь передачи инфекции.

Таким образом, факторами, способствующими формированию очага, были: отсутствие настороженности в регионе в отношении сибирской язвы, недооценка данных эпизоотологических наблюдений прошлых лет; системное отсутствие иммунизации сельскохозяйственных животных на территории ЯНАО с 2007 г.; несвоевременная оценка ситуации и позднее реагирование на эпизоотию.

С целью локализации и ликвидации очага был проведен полный комплекс противоэпидемических мероприятий, предусмотренных санитарным законодательством Российской Федерации. Распоряжением губернатора ЯНАО на территории выпаса северных оленей, принадлежащих частным оленеводческим хозяйствам в районе о. Письёте в Ямальском районе, введен режим карантина с установлением территориальных границ на 90 сут и утвержден План мероприятий по предупреждению распространения и ликвидации сибирской язвы, куда вошел перечень мероприятий, представленных Роспотребнадзором и службой ветеринарии. Организована работа Комиссии по предупреждению и ликвидации чрезвычайных ситуаций и обеспечению пожарной безопасности в ЯНАО (КЧС) в оперативном режиме в межведомственном формате под председательством губернатора ЯНАО. С целью уточнения границ эпизоотии администрацией Ямальского района ЯНАО был организован ежедневный облет зараженных территорий с постепенным расширением периметра наблюдений и нанесением на карту координат чумных стоянок с зафиксированным падежом оленей.

Организована вакцинация животных, в результате которой привито 454851 голова оленей. В рамках проводимых мероприятий по экстренной химио-профилактике охвачено 946 человек, в том числе 214 детей. Против сибирской язвы вакцинировано 14277 человек. В целях разъяснительной работы с населением проводилось информирование через СМИ,

подготовлены и направлены в районы 5000 экз. памяток о профилактике сибирской язвы.

При методической поддержке Роспотребнадзора силами и средствами администрации Ямальского района и подразделений МЧС РФ развернуты санитарные пропускники и пункты временного размещения населения, выведенного из очага.

Утилизация трупов павших животных проводилась силами войск радиационной, химической и биологической защиты Минобороны России, санитарно-противоэпидемическое обеспечение осуществлялось Главным военно-медицинским управлением Минобороны России. Посредством сжигания с использованием огнесмеси, нефтепродуктов и резинотехнических изделий с последующей дезинфекцией было утилизировано 2572 павших оленя, 10 собак и 4 чума на территории 100×110 км.

Силами сотрудников Роспотребнадзора проведена дератизация объектов общей площадью свыше 103000 м², дезинфекционная обработка более 240 бортов воздушных судов, более 7000 м² автотранспортных средств, посадочных площадок, ПВР населения, санитарных пропускников, свыше 950 предметов быта, вывезенных из очага. Были приняты дополнительные меры по обеззараживанию стоков инфекционного отделения Окружной больницы Салехарда с осуществлением в оперативном режиме контроля качества дезинфекции и исследования сточных вод.

Специалистами ветеринарной службы и Роспотребнадзора были приняты меры по выявлению продукции животноводства, заготовленной в период с мая 2016 г. в Ямальском районе ЯНАО. Проведено 11 проверок организаций, осуществляющих убой оленей, заготовку, первичную переработку и хранение пантов, а также реализацию продукции из оленины. Материалы проверок были переданы в правоохранительные органы.

Управлением Роспотребнадзора по ЯНАО было издано 25 документов, в том числе 24 постановления Главного государственного санитарного врача по ЯНАО, регламентирующих организацию комплекса противоэпидемических мер во всех районах ЯНАО, проработано межведомственное оперативное взаимодействие, подготовлены инструкции по дезинфекции, графики вывода людей из зараженной зоны, проведены занятия с медицинским персоналом, летным составом, сотрудниками МЧС РФ, организована вакцинация населения и сотрудников нефтегазовых месторождений, разъяснительная работа с населением. Комплекс противоэпидемических мероприятий, предусмотренных санитарным законодательством, был проведен в полном объеме. В ликвидации вспышки было задействовано около 1000 человек, 17 воздушных судов и 167 единиц автотранспорта.

Оперативная организация межведомственной работы на региональном уровне позволила в максимально короткие сроки (в течение одного инкубационного периода) локализовать самый крупный очаг

сибирской язвы за последние 30 лет.

Вместе с тем при работе в очагах сибирской язвы выявлена необходимость уточнения (дополнения) существующей нормативно-методической базы, в первую очередь по организации профилактических мероприятий, определению критериев постановки диагноза сибирской язвы, перечню исследуемого клинического материала и т.д. Необходимы дополнения в нормативные документы в части организации медицинской помощи больным, в том числе при массовом поступлении больных в медицинские организации. При этом в качестве основных направлений следует выделить:

- усиление мер по профилактике сибирской язвы, в том числе по организации полного охвата поголовья сельскохозяйственных животных при иммунизации, учету и обустройству сибирезавезенных скотомогильников;

- совершенствование системы эпидемиологического надзора за сибирской язвой с учетом современных особенностей, внесение соответствующих изменений в нормативную правовую базу;

- разработку порядка оказания медицинской помощи и клинических рекомендаций по диагностике и лечению сибирской язвы у детей и взрослых в зависимости от клинической формы заболевания;

- продолжение работы по совершенствованию диагностических систем и иммунобиологических лекарственных средств, в том числе в рамках проводимой Федеральных целевых программ;

- разработку стандартов лечения и планов организации работы отделений ЛПО при поступлении больных особо опасной инфекцией;

- обеспечение проведения эффективных дезинфекционных мероприятий и утилизации туш сжиганием в местах падежа, вынужденного убоя больных сибирской язвой животных;

- формирование эпидемических резервов на уровне регионов, включающих вакцины, химиопрепараты, средства лабораторной диагностики, дезинфекции.

Кроме того, работа в очаге сибирской язвы в ЯНАО показала важность развития межведомственного взаимодействия, в том числе координации оперативного реагирования в очагах опасных инфекций различного происхождения на уровне руководства страны.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых

интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Селянинов Ю.О., Егорова И.Ю., Колбасов Д.В., Листищенко А.А. Сибирская язва на Ямале. Причины возникновения и проблемы диагностики. *Ветеринария*. 2016; 10:3–7.
2. Черкасский Б.Л., редактор. Кадастр стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов Российской Федерации. Справочник. М.: ИнтерСЭН; 2005. 829 с.
3. Черкасский Б.Л. Путешествие эпидемиолога во времени и пространстве. Воронеж: ФГУП ИПФ «Воронеж»; 2003. 637 с.

References

1. Selyaninov Yu.O., Egorova I.Yu., Kolbasov D.V., Listishenko A.A. [Anthrax in Yamal. Causes of emergence and problems of diagnostics]. *Veterinariya*. 2016; 10:3–7.
2. Cherkassky B.L., editor. [Cadastre of Stationary Potentially Hazardous as regards Anthrax Areas of the Russian Federation: Reference Book]. M.: "InterSAN"; 2005. 829 p.
3. Cherkassky B.L. [Epidemiologist's Journey through Time and Space]. Voronezh: Federal State Unitary Enterprise, Publications and Printing Firm "Voronezh"; 2003. 637 p.

Authors:

Popova A.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. Russian Medical Academy for Post-Graduate Training; 2/1, Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russian Federation.

Demina Yu.V., Ezhlova E.B. 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.

Kulichenko A.N., Ryazanova A.G. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Maleev V.V., Ploskireva A.A. Central Research Institute of Epidemiology. Moscow, Russian Federation.

Dyatlov I.A., Timofeev V.S. State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk, Moscow Region, 142279, Russian Federation. E-mail: info@obolensk.org.

Nechepurenko L.A. Rospotrebnadzor Administration in the Yamalo-Nenets Autonomous District. Salekhard, Russian Federation.

Khar'kov V.V. Center of Hygiene and Epidemiology in the Yamalo-Nenets Autonomous District. Salekhard, Russian Federation.

Об авторах:

Попова А.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. Российская медицинская академия последиplomного образования; Российская Федерация, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1.

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

Куличенко А.Н., Рязанова А.Г. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Малеев В.В., Плоскирева А.А. Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии. Российская Федерация, Москва.

Дятлов И.А., Тимофеев В.С. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. Российская Федерация, 142279, Московская обл., п. Оболensk. E-mail: info@obolensk.org.

Нечепуренко Л.А. Управление Роспотребнадзора по Ямало-Ненецкому автономному округу. Российская Федерация, Салехард.

Харьков В.В. Центр гигиены и эпидемиологии в Ямало-Ненецком автономном округе. Российская Федерация, Салехард.

Поступила 01.12.16.

А.Ф.Шамсутдинов^{1,2}, Ю.А.Тюрин^{1,4,5}, М.А.Патяшина^{3,4}, Л.О.Борисова³, В.А.Трифонов^{1,3}, В.А.Бойко¹,
И.Д.Решетникова¹, Г.Ш.Исаева¹, Е.Г.Васильева¹

ПРИРОДНАЯ ОЧАГОВЫСТЬ ИКСОДОВОГО КЛЕЩЕВОГО БОРРЕЛИОЗА, ГРАНУЛОЦИТАРНОГО АНАПЛАЗМОЗА И МОНОЦИТАРНОГО ЭРЛИХИОЗА ЧЕЛОВЕКА В РЕСПУБЛИКЕ ТАТАРСТАН

¹ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии»; ²ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; ³Управление Роспотребнадзора по Республике Татарстан; ⁴ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия»; ⁵ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», Казань, Российская Федерация

Цель работы. Изучение природной очаговости иксодового клещевого боррелиоза, гранулоцитарного анаплазмоза, моноцитарного эрлихиоза человека в Республике Татарстан. **Материалы и методы.** Использованы данные исследования клещей за период 2010–2015 гг. Исследованы сыворотки крови жителей (доноров) Казани и муниципальных районов Республики Татарстан, полученные в Республиканской станции переливания крови, на наличие специфических антител к возбудителям боррелиоза, анаплазмоза и эрлихиоза методом иммуноферментного анализа. **Результаты и выводы.** Впервые получены данные о спонтанном носительстве иксодовыми клещами возбудителей эрлихиозов. Полученная информация указывает на активную циркуляцию боррелий, эрлихий и анаплазм в ландшафтах региона и необходимость расширения исследований «новых» для республики нозологических форм природно-очаговых инфекций.

Ключевые слова: иксодовый клещевой боррелиоз, моноцитарный эрлихиоз человека, гранулоцитарный анаплазмоз человека.

Корреспондирующий автор: Луиза Олеговна Борисова, e-mail: Borisova.LO@tatar.ru.

A.F.Shamsutdinov^{1,2}, Yu.A.Tyurin^{1,4,5}, M.A.Patyashina^{3,4}, L.O.Borisova³, V.A.Trifonov^{1,3}, V.A.Boiko¹,
I.D.Reshetnikova¹, G.Sh.Isaeva¹, E.G.Vasil'eva¹

Natural Focality of Lyme Borreliosis, Granulocytic Anaplasmosis, and Monocytic Ehrlichiosis in Humans in the Republic of Tatarstan

¹Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Kazan, Russian Federation; ²Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russian Federation; ³Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Tatarstan, Kazan, Russian Federation; ⁴Kazan State Medical Academy, Kazan, Russian Federation; ⁵Kazan State Medical University, Kazan, Russian Federation

Objective of the study is to investigate natural focality of Ixodidae tick borreliosis, granulocytic anaplasmosis, monocytic ehrlichiosis in humans in the Republic of Tatarstan. **Materials and methods.** Utilized were the data from tick studies conducted between 2010–2015. Applying immune-enzymatic analysis, investigated were the blood sera from residents (donors) of Kazan and municipal districts of the Republic of Tatarstan for the presence of specific antibodies to borreliosis, ehrlichiosis, and anaplasmosis pathogens. **Results and conclusions.** For the first time ever, the data on spontaneous carriage of Ehrlichiosis pathogens in Ixodidae ticks have been obtained. The information received is an indicative of the active circulation of Borrelia, Ehrlichia and Anaplasma in the territory of the region and of necessity to expand the research on the “novel” for the Republic nosological forms of natural-focal infections.

Keywords: Ixodidae tick borreliosis, human monocytic ehrlichiosis, human granulocytic anaplasmosis.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Luiza O. Borisova, e-mail: Borisova.LO@tatar.ru.

Citation: Shamsutdinov A.F., Tyurin Yu.A., Patyashina M.A., Borisova L.O., Trifonov V.A., Boiko V.A., Reshetnikova I.D., Isaeva G.Sh., Vasil'eva E.G. Natural Focality of Lyme Borreliosis, Granulocytic Anaplasmosis, and Monocytic Ehrlichiosis in Humans in the Republic of Tatarstan. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 4:47–50. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-47-50

Переносчиками возбудителей ряда природно-очаговых болезней, среди которых наиболее изученными в Поволжье являются вирусный клещевой энцефалит (ВКЭ) и иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ), значатся клещи *Ixodes ricinus*, *Ixodes persulcatus*, *Dermacentor reticulatus*. Вместе с тем наличие единого механизма передачи и общих переносчиков определяют возможность циркуляции здесь и других инфекций, передаваемых клещами, например, моноцитарного эрлихиоза (МЭЧ) и гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ).

Наблюдения за состоянием популяций раз-

личных видов иксодовых клещей в разных физико-географических районах Республики Татарстан, начиная с 50-х годов XX столетия, позволили проследить изменения их пространственной структуры и оценить современное эпизоотологическое значение.

В Предкамье происходило расселение клещей *I. ricinus*. В середине XX века в лесах южного и юго-западного Предкамья выявлена зона симпатрии экологически близких видов клещей *I. persulcatus* и *I. ricinus* (полоса шириной около 20–40 км на левом берегу Волги). Повсеместно доминировали независимые популяции *I. ricinus*, а малочисленные наход-

ки псевдопопуляций *I. persulcatus* были зарегистрированы в пригородных лесах Казани (пос. Боровое Матюшино и Катущка), в Раифском, Зеленодольском и Лаишевском районах республики. В последующем (1976–2012 гг.) зона симпатрии сместилась в среднем на 70 км в северо-восточном направлении, а прежнюю зону симпатрии заняла популяция *I. ricinus* [1]. Отмечены факты вытеснения таежного клеща *I. persulcatus* конкурирующим видом *I. ricinus* [3]. В настоящее время в Предкамье клещи *I. ricinus* распространены в районах: Зеленодольский, Высокогорский, Пестречинский, Лаишевский, Рыбно-Слободской, Арский, Тюлячинский, Сабинский, Мамадышский. На территории последних пяти административных районов и отмечено совместное обитание указанных видов. Зона Предволжья повсеместно заселена клещами *I. ricinus*. В Закамье этот вид встречается на отдельных участках. Клещи *I. persulcatus* в пределах республики распространены в Предкамье, где, кроме участка симпатрии, они населяют его северные и северо-восточные районы, а также ими целиком занята зона низменного и Высокого Закамья. Значительные изменения произошли в территориальном размещении вида *D. reticulatus*, который изначально был широко распространен в лесах Закамского физико-географического региона республики. В настоящее время *D. reticulatus*, кроме Закамья, встречается на территории Предволжья и почти на всей территории Прикамья, за исключением северо-восточных районов, расположенных в борреальной ландшафтной зоне. В природных очагах опасных инфекционных болезней на территории Республики Татарстан в 2014 г. этот вид значительно доминировал в сборах [2].

Основными переносчиками в пригородах Казани являются виды *I. ricinus* и *D. reticulatus*. Они могут участвовать в переносе возбудителей различных болезней человека и домашних животных: акариазы, болезнь Лайма, энцефалит, эрлихиоз, анаплазмоз, чесотка, сыпной и возвратный клещевой тиф, туляремия и др. Из инфекций, передаваемых клещами, в Республике Татарстан ведущее место занимает клещевой боррелиоз [2]. В республике клещевой боррелиоз официально регистрируется с 1992 г., выявлено 1520 случаев заболеваний ИКБ, что выше показателя заболеваемости населения клещевым энцефалитом в 6–7 раз. Эндемичной по ИКБ является вся территория республики. Показатели заболеваемости ИКБ (на 100 тыс. населения) составили: 2010 г. – 1,65 (63 случая); 2011 г. – 1,35 (52); 2012 г. – 1,06 (41); 2013 г. – 0,85 (33); 2014 г. – 0,85 (33); 2015 г. – 1,76 (67). Что касается эрлихиоза и анаплазмоза, то они являются сравнительно новыми инфекциями в исследуемом регионе. В краевой патологии обследованного региона официально диагностируется только заболевание Лайм-боррелиозом.

Целью исследования было выявление циркуляции возбудителей указанных заболеваний на территории республики.

Материал и методы

За период 2010–2015 гг. в вегетационный период с мая по сентябрь в лиственных лесах пригородной зоны Казани было собрано 604 взрослых особи клещей *I. ricinus* (194 особи) и *D. reticulatus* (410 особей). Клещей собирали на «волокушу».

Для выделения геномной ДНК из клещей использованы коммерческие наборы реагентов компании ООО «Омникс» (Россия).

Все образцы были исследованы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на спонтанную зараженность патогенными геномодами *Borrelia*, *E. chaffeensis* и *A. phagocytophilum* с использованием коммерческих тест-систем: «E. chaffeensis – ПЦР – ЭФ», «A. phagocytophilum – ПЦР – ЭФ», «Borrelia – ПЦР – ЭФ» ООО «НПФ «Эпитоп»» (Россия).

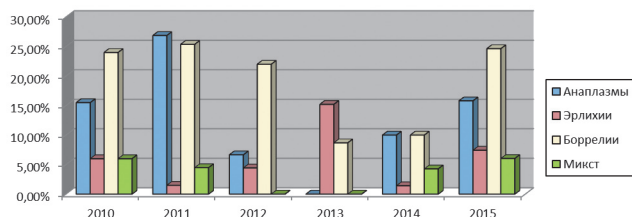
Амплификация проведена с помощью программируемого термостата «Терцик» ЗАО «НПФ ДНК-Технология» (Россия). Анализ ампликонов проведен методом горизонтального электрофореза в 2 % агарозном геле с использованием для визуализации интеркалирующего красителя этидиум бромида и маркеров FastRuler Low Range DNA Ladder. Визуализация и фотосъемка гелей проведены с использованием транслюминатора Vilber Lourmat (Франция) и гель-документирующей системы Gel Doc XR+System (Bio-Rad, США).

Были также исследованы 869 сывороток крови жителей (доноров) Казани и муниципальных районов республики, полученных в Республиканской станции переливания крови (Казань), на наличие специфических антител к возбудителям боррелиоза, анаплазмоза и эрлихиоза методом иммуноферментного анализа.

Результаты и обсуждение

Из 604 экземпляров исследованных клещей, полученных в результате сезонного сбора за период с 2010 по 2015 год в Зеленодольском, Арском и Лаишевском районах и поселках городского типа (Крутушка, Петровский, Майский, Мирный), зараженность тем или иным возбудителем установлена у 191 особи, что составляет 31,6 % от всех обследованных особей: *I. ricinus* – 80 особей (13,2 %) и *D. reticulatus* – 111 (18,4 %). Наибольшее число клещей было заражено геномодами *Borrelia* – 115 особей (19,0 % от общего количества обследованных клещей), *A. phagocytophilum* – 72 (11,9 %) и меньшая по численности группа, зараженная *E. chaffeensis* составляла 33 особи (5,5 %). Также у 25 клещей (13,1 % от числа зараженных особей) выявлено микст-инфицирование двумя или тремя патогенами (рисунок).

При анализе данных по другим районам Республики Татарстан установлено, что инфицированность патогенными геномодами *Borrelia* клещей *I. ricinus* в 2013 г. составила 33 особи, в



Доля зараженных клещей от количества исследованных (в %)

2014 г. – 33, в 2015 г. – 67 и в 2016 г. – 22. Всего за указанный период исследования выявлено 155 зараженных особей клещей *I. ricinus*. Распределение инфицированных клещей по муниципальным образованиям Республики Татарстан следующее: Казань – 95 особей (61,3 %), Высокогорский район – 2 (1,3 %), Нижнекамский район – 5 (3,2 %), Лениногорский – 10 (6,5 %), Заинский – 22 (14,2 %), Набережные Челны – 6 (3,9 %), Агрызский район – 7 (4,5 %), Азнакаевский, Муслимовский, Бавлинский, Актанышский, Тетюшский, Аксубаевский, Лаишевский, Дрожжановский – по одной особи (0,64 %).

В результате серологического исследования выявлены показатели популяционного иммунитета к возбудителям изучаемых природно-очаговых инфекций для ИКБ с высокими титрами антител по уровню IgG – 31 проба (3,6 %), а по уровню IgM с высокими титрами антител были 2 пробы (0,2 %).

При тестировании 450 сывороток крови здоровых доноров на специфические АТ (IgG) к антигенам *E. chaffeensis* и *A. phagocytophilum* установлено, что антитела к антигенам *A. phagocytophilum* выявлены в 18 (4,0 %) случаях, к антигенам *E. chaffeensis* в 6 (1,3 %). Показано, что в основном популяционный иммунитет формируется при низких показателях уровней специфических антител. Выявленные единичные значения высоких титров по ИКБ, вероятно, связаны с активным инфекционным процессом или предшествующей встречей с возбудителем природно-очаговых инфекций. В одной пробе выявлены антитела класса IgG к *A. phagocytophilum*.

Таким образом, впервые установлено спонтанное носительство иксодовыми клещами *I. ricinus* и *D. reticulatus* возбудителей эрлихиозов *E. chaffeensis* и *A. phagocytophilum* в природных очагах зоонозных инфекций на территории Республики Татарстан. У 13 % зараженных клещей (от числа исследованных) отмечены мистинфекции с двумя и тремя патогенами (включая боррелии). Широкое распространение по территории республики переносчиков *I. ricinus* и *D. reticulatus* при периодическом повышении их численности создает предпосылки для осложнения эпидемиологической ситуации в будущем. В сыворотке крови 450 доноров обнаружены антитела класса IgG к антигенам *A. phagocytophilum* и *E. chaffeensis*.

Полученные данные об энзоотичности территории Республики Татарстан по эрлихиозам свидетельствуют, с одной стороны, об активной циркуля-

ции боррелий, эрлихий и анаплазм в ландшафтах региона, а с другой – о существенном недостатке информации по клинко-эпидемиологическому и иммунологическому их проявлению. Это подчеркивает важность комплексного подхода в оценке роли эрлихиозов в краевой инфекционной патологии Татарстана.

Изложенные факты указывают на правомерность расширения исследований «новых» для республики нозологических форм природно-очаговых инфекций, на необходимость усиления эпидемиологического надзора на территории природной очаговости клещевого боррелиоза, гранулоцитарного анаплазмоза и моноцитарного эрлихиоза человека в Республике Татарстан. Особая роль отводится клиницистам, так как для постановки объективного диагноза и соответствующего лечения пациентов с клещевыми инфекциями (в том числе при микст-инфицировании) необходимо применение современных серологических и ПЦР-диагностических тестов на эрлихиоз и анаплазмоз.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алемасова С.В., Бойко В.А., Борознов Н.И. Изменение населения иксодовых клещей (Ixodidae) в связи с антропогенной трансформацией ландшафтов на границе лесной и лесостепной зон Среднего Поволжья. *Казанский мед. журн.* 2001; 82:57–60.
2. Князева Т.В., Пяташина М.А., Зиятдинов В.Б., Хакимзянова М.В., Садреева Л.Ф., Гайнуллин А.А., Сайфуллина Г.Ш., Янтыкова Ю.Н., Губаева Д.Р., Матросов А.Н., Кузнецов А.А., Попов Н.В. Современное состояние природных очагов опасных инфекционных болезней на территории Республики Татарстан. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 2:53–8.
3. Шафигуллина С.М. Устойчивость и разнообразие луговых энтомокомплексов на островах Куйбышевского водохранилища. *Энтомол. обозрение.* 2001; 80(1):593–602.
4. Walter D.E., Proctor H.C. Mites in soil; an interactive key to mites and other soil microarthropods. ABRIS Identification Series. CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria. 2001.

References

1. Alemasova S.V., Boiko V.A., Boroznov N.I. [Changes of Ixodidae tick populations, caused by anthropogenic landscape transformation at the edge of the forest and forest-steppe zones of Middle Volga]. *Kazan. Med. Zh.* 2001; 82:57–60.
2. Knyazeva T.V., Pyatashina M.A., Ziatdinov V.B., Khakimzyanova M.V., Sadreeva L.F., Gainullin A.A., Saifullina G.Sh., Yantkova Yu.N., Gubaeva D.R., Matrosov A.N., Kuznetsov A.A., Popov N.V. [Current state of natural foci of dangerous infectious diseases in the territory of the Russian Federation]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 2:53–8.
3. Shafigullina S.M. [Stability and diversity of entomological complexes in the grassland (meadow) isles of the Kuibyshev Reservoir]. *Entomol. Obozren.* 2001; 80(1):593–602.
4. Walter D.E., Proctor H.C. Mites in soil; an interactive key to mites and other soil microarthropods. ABRIS Identification Series. CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria. 2001.

Authors:

Shamsutdinov A.F. Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology; 67, B.Krasnaya St., Kazan, 420015, Russian Federation. Kazan (Volga Region) Federal University; 18, Kremlevskaya St., Kazan, 420008, Russian Federation.

Tyurin Yu.A. Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology; 67, B.Krasnaya St., Kazan, 420015, Russian Federation. Kazan State Medical Academy; 36, Butlerova St., Kazan, 420012, Russian Federation. Kazan State Medical University; 49, Butlerova St., Kazan, 420012, Russian Federation.

Pyatashina M.A. Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Tatarstan; 30, B.Krasnaya St., Kazan, 420111, Russian Federation. Kazan State Medical Academy; 36, Butlerova St., Kazan, 420012, Russian Federation.

Borisova L.O. Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Tatarstan. 30, B.Krasnaya St., Kazan, 420111, Russian Federation.

Trifonov V.A. Research Institute of Epidemiology and Microbiology; 67, B.Krasnaya St., Kazan, 420015, Russian Federation. Rospotrebnadzor Administration in the Republic of Tatarstan; 30, B.Krasnaya St., Kazan, 420111, Russian Federation.

Boiko V.A., Reshetnikova I.D., Isaeva G.Sh., Vasil'eva E.G. Kazan Research Institute of Epidemiology and Microbiology. 67, B.Krasnaya St., Kazan, 420015, Russian Federation.

Об авторах:

Шамсутдинов А.Ф. Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии; Российская Федерация, 420015, г. Казань, ул. Б.Красная, д. 67. Казанский (Приволжский) федеральный университет. Российская Федерация, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18.

Тюрин Ю.А. Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии; Российская Федерация, 420015, г. Казань, ул. Б. Красная, д. 67. Казанская государственная медицинская академия;

Российская Федерация, 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 36. Казанский государственный медицинский университет; Российская Федерация, 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 49.

Патянина М.А. Управление Роспотребнадзора по Республике Татарстан; Российская Федерация, 420111, г. Казань, ул. Б.Красная, д. 30. Казанская государственная медицинская академия; Российская Федерация, 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 36.

Борисова Л.О. Управление Роспотребнадзора по Республике Татарстан. Российская Федерация, 420111, г. Казань, ул. Б. Красная, д. 30. E-mail: Borisova.LO@tatar.ru

Трифонов В.А. Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии; Российская Федерация, 420015, г. Казань, ул. Б. Красная, д. 67. Управление Роспотребнадзора по Республике Татарстан; Российская Федерация, 420111, г. Казань, ул. Б.Красная, д. 30.

Бойко В.А., Решетникова И.Д., Исаева Г.Ш., Васильева Е.Г. Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии. Российская Федерация, 420015, г. Казань, ул. Б.Красная, д. 67.

Поступила 09.11.16.

С.В.Балахонov¹, М.Б.Ярыгина¹, Е.Н.Рождественский², Г.Х.Базарова², С.А.Витязева¹, А.С.Остяк¹,
Е.П.Михайлов², А.И.Мищенко², А.В.Денисов², С.А.Косилко¹, В.М.Корзун¹

СЛУЧАЙ ЗАБОЛЕВАНИЯ ЧЕЛОВЕКА ЧУМОЙ В КОШ-АГАЧСКОМ РАЙОНЕ РЕСПУБЛИКИ АЛТАЙ В 2015 г. СООБЩЕНИЕ 2. МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИЗОЛИРОВАННЫХ ШТАММОВ

¹ ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российская Федерация; ² ФКУЗ «Алтайская противочумная станция», Горно-Алтайск, Российская Федерация

Цель работы. Комплексное фено- и генотипическое изучение штаммов *Y. pestis* И-3595 и *Y. pestis* И-3596, изолированных от сурков, послуживших источником заражения человека в 2015 г. **Материалы и методы.** С помощью современных методов проведено углубленное микробиологическое, молекулярно-генетическое и масс-спектрометрическое изучение штаммов *Yersinia pestis* ssp. *pestis*, которые были изолированы от двух серых сурков, послуживших источником инфицирования человека в Горно-Алтайском высокогорном очаге в 2015 г. **Результаты и выводы.** Установлено, что изученные штаммы чумного микроба принадлежат к основному подвиду. Результаты плазмидного скрининга, мультилокусного VNTR- и масс-спектрометрического анализов показали, что эти штаммы близки к варианту возбудителя чумы, обнаруженному в очаге в 2012 и 2014 гг. и циркулирующему на территории Северо-Западной Монголии и в Тувинском природном очаге.

Ключевые слова: Горно-Алтайский высокогорный природный очаг чумы, *Yersinia pestis*, плазмидный скрининг, мультилокусный VNTR-анализ, масс-спектрометрический анализ.

Корреспондирующий автор: Сергей Владимирович Балахонov, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

S.V.Balakhonov¹, M.B.Yarygina¹, E.N.Rozhdestvensky², G.Kh.Bazarova², S.A.Vityazeva¹, A.S.Ostyak¹,
E.P.Mikhailov², A.I.Mishchenko², A.V.Denisov², S.A.Kosilko¹, V.M.Korzun¹

A Case of Human Plague in Kosh-Agach Region of the Republic of Altai in 2015. Communication 2. Microbiological and Molecular-Genetic Characteristics of the Isolated Strains

¹Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation; ²Altai Plague Control Station, Gorno-Altai, Russian Federation

Objective of the study was a complex pheno- and genotypic investigation of *Yersinia pestis* I-3595 and *Y. pestis* I-3596 strains, isolated from marmots that were the source of human infection in 2015. **Materials and methods.** A comprehensive microbiological, molecular-genetic and mass-spectrometric studying of *Y. pestis* ssp. *pestis* strains, isolated from two grey marmots that became a cause of the plague case in Gorno-Altai high-mountain focus in 2015, was performed using up-to-date methods. **Results and conclusions.** It was established that the studied *Y. pestis* strains belonged to the main subspecies. Results of plasmid screening, multilocus VNTR- and mass-spectrometric analyses showed that those strains were closely related to *Y. pestis* variant detected in the focus in 2012 and in 2014, and circulating in Northwest Mongolia and Tuva natural focus.

Key words: Gorno-Altai high-mountain natural plague focus, *Yersinia pestis*, plasmid screening, multilocus VNTR-analysis, mass-spectrometric assay.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Sergey V. Balakhonov, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Citation: Balakhonov S.V., Yarygina M.B., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Vityazeva S.A., Ostyak A.S., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., Kosilko S.A., Korzun V.M. A Case of Human Plague in Kosh-Agach Region of the Republic of Altai in 2015. Communication 2. Microbiological and Molecular-Genetic Characteristics of the Isolated Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 4:51–55. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-51-55

В августе 2015 г. в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы, расположенном в Кош-Агачском районе Республики Алтай, зарегистрирован второй со времени обнаружения очага случай заражения чумой человека [6]. Первое заболевание этой опасной инфекционной болезнью произошло здесь в 2014 г. [8]. При этом от больного был выделен штамм *Yersinia pestis*, который подробно изучен и отнесен к античному биовару основного подвида

[9]. В отличие от первого случая изолировать возбудитель чумы от заболевшего в 2015 г. не удалось. Однако было установлено, что источником заражения послужили серые сурки, добытые заболевшим, а инфицирование произошло при снятии шкурок. От двух этих грызунов были изолированы штаммы чумного микроба [6].

Цель настоящей работы – комплексное фено- и генотипическое изучение штаммов *Y. pestis* И-3595

и *Y. pestis* И-3596, изолированных от сурков, послуживших источником заражения человека в 2015 г.

Материалы и методы

Работа выполнена на штаммах *Y. pestis* И-3595 и И-3596. В сравнительных молекулярно-генетических экспериментах использовали 46 штаммов чумного микроба, изолированных в природных очагах чумы Сибири, Монголии и Кавказа. В молекулярно-генетических исследованиях в качестве контроля использовали вакцинный штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ. Фенотипическую идентификацию изолятов выполняли с применением традиционных микробиологических исследований [10].

Для определения вирулентности штаммов *Y. pestis* И-3595 и И-3596 использовали беспородных, но стандартных по условиям содержания и массе лабораторных животных – белых мышей (18–19 г) и морских свинок (220–250 г), которых заражали подкожно в правую заднюю лапу. Для белых мышей использовали 5 доз от 20 до 200 тыс. м.к. в 0,5 мл, для морских свинок – 3 дозы от 100 до 10 тыс. м.к. в 1,0 мл. Эксперименты на животных проводили в соответствии с «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986 г.), согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1987 г.), Федеральному закону о защите животных от жестокого обращения от 01.01.1997 г. и приказа МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. Расчет LD₅₀ выполняли по Ашмарину [1].

Экстракцию ДНК проводили при помощи набора реагентов «Рибо-сорб». Для обнаружения ДНК чумного микроба материал исследовали методом ПЦР в режиме реального времени тест-системой «АмплиСенс® *Yersinia pestis* - FL». Для экспресс-идентификации использовали иммунохроматографический тест для серодиагностики чумы «ИХТ – F1 серодиагностика чумы» (производства ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск). Тест обеспечивает выявление микробных клеток *Y. pestis* и капсульного антигена (Ф1).

Молекулярно-генетические исследования – скрининг плазмид штаммов чумного микроба, мультилокусное VNTR-типирование и масс-спектрометрический анализ – проводили, как было описано нами ранее [4].

Результаты и обсуждение

В лабораторию Алтайской противочумной станции 15 августа 2015 г. в 03 ч 40 мин поступил клинический материал (моча, кровь, мокрота, пунктат bubo), полученный от больного М., и две тушки серых сурков, изъятых из холодильника в доме заболевшего. Эти сурки были добыты на участке Середина Елангаша (Тархатинский мезоочаг). Проведение ра-

бот осуществляли в соответствии с действующими нормативно-методическими документами, регламентирующими проведение лабораторной диагностики чумы. В результате комплексного диагностического бактериологического и молекулярно-генетического исследования клинического материала от больного М. положительных результатов на чуму не получено.

При исследовании нативного материала от двух тушек сурков (суспензия мышечной ткани) методами экспресс-диагностики в течение первых суток было установлено, что данные грызуны заражены чумой. При проведении микроскопии обнаружены биполярно окрашенные грамотрециательные овоидные палочки. В мазках, окрашенных люминесцентной сывороткой, выявлены единичные микробные клетки *Y. pestis* со свечением на 4+. При анализе методом ПЦР в обеих тушках грызунов обнаружена ДНК чумного микроба. Методом ПЦР с экспериментальным набором праймеров ур2769ms06 и ур3057ms09 Иркутского НИПЧИ для дифференциации основного и алтайского подвидов чумного микроба установлена принадлежность к *Y. pestis subsp. pestis*. Исследование проб из бульона с посевом нативного материала тушек сурков методом ИХА дало положительные результаты на чуму.

Белые мыши, зараженные суспензией мышечной ткани тушек сурков, пали через 36 ч от момента заражения, были произведены посевы материала от них на питательные среды. Через двое суток на плотных питательных средах наблюдали типичные колонии чумного микроба, выделены чистые культуры возбудителя. Проведенная идентификация культур позволила предварительно отнести их к *Y. pestis subsp. pestis*.

Штаммам, выделенным от сурков, присвоены номера *Y. pestis* И-3595 и И-3596. В результате проведения микробиологической идентификации этих штаммов установлено, что они обладали следующими характеристиками: на агаре Хоттингера колонии в виде R-формы, бугристые, возвышающиеся в центре, с плоским прозрачным фестончатым краем, в бульоне Хоттингера агглютинативный рост, характерный для чумного микроба; не подвижные; лизировались чумным и псевдотуберкулезным фагами; в течение первых суток ферментировали глицерин, арабинозу, мальтозу и не ферментировали (до 10 сут наблюдения) рамнозу, не обладали уреазной активностью; восстанавливали нитраты в нитриты; сорбировали гемин на среде Джексона-Берроуза; продуцировали капсульный антиген, обладали зависимостью роста от ионов Ca²⁺ при температуре 37 °C; фибринолизин-пептицин I-плазмокоагулазной активностью; были стрептомицинчувствительны. По потребностям в аминокислотах нуждались в лейцине, метионине, цистеине, фенилаланине. По изученным микробиологическим характеристикам штаммы *Y. pestis* И-3595 и И-3596 относятся к основному подвиду чумного микроба.

При исследовании вирулентности установле-

но, что штаммы *Y. pestis* И-3595 и И-3596 являются высоковирулентными для лабораторных животных обоих видов. LD₅₀ для белых мышей составила 25 и 11 м.к. соответственно, для морских свинок в обоих случаях – 32 м.к. Патологоанатомические изменения у павших животных типичны для септической формы чумы. Их гибель наступила вследствие развития специфического инфекционного процесса, что подтверждено выделением чистой культуры *Y. pestis* от всех павших животных.

Анализ плазмидного профиля штаммов *Y. pestis* И-3595 и И-3596 показал наличие у них четырех плазмид – pYP, pTP33, pYV, pYT (рис. 1). Подобные результаты получены и для других штаммов чумного микроба основного подвида, изолированных от серого сурка в 2015 г. в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы: И-3594 (участок Вершина Бар-Бургаз, Талдуайский мезоочаг), И-3607 и И-3609 (участок Середина Ирбисту, Тархатинский мезоочаг). Штамм *Y. pestis* 42 алтайского подвида, выделенный от монгольской пищухи в Курайском мезоочаге обладал типичным для возбудителя чумы набором из трех плазмид (pYP, pYV, pYT) (рис. 1). Дополнительная плазида pTP33 характерна для штаммов, изолируемых в Тувинском природном очаге чумы [3] и некоторых очагах Монгольского Алтая [2, 11]. Аналогичный плазмидовар был обнаружен и у штаммов *Y. pestis* 1454, *Y. pestis* 517 (И-3591), *Y. pestis* 1530 (И-3592), выделенных в 2012 и в 2014 гг. в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге [5, 8].

VNTR-анализ проведен по 25 варибельным локусам: yp0120ms01, yp1290ms04, yp1935ms05, yp2769ms06, yp2916ms07, yp3057ms09, yp0559ms15, yp1814ms20, yp1895ms21, yp4042ms35, yp4425ms38, yp0581ms40, yp0718ms41, yp1018ms44, yp1108ms45, yp1335ms46, yp2058ms51, yp2612ms54, yp3060ms56,

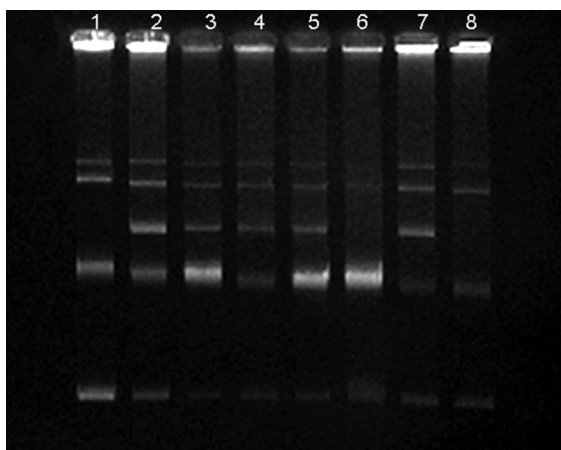


Рис. 1. Результаты плазмидного анализа штаммов *Y. pestis*, выделенных в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2015 г.:

1, 6 – *Y. pestis* EV (pYP, pYV, pYT); 2 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3607 (pYP, pTP33, pYV, pYT); 3 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3594 (pYP, pTP33, pYV, pYT); 4 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3595 (pYP, pTP33, pYV, pYT); 5 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3596 (pYP, pTP33, pYV, pYT); 7 – *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3609 (pYP, pTP33, pYV, pYT); 8 – *Y. pestis* subsp. *altaica* 42 (pYP, pYV, pYT)

yp4280ms62, yp1118ms69, yp1580ms70, yp1925ms71, yp3236ms73, yp3245ms74. Полученные VNTR-профили исследованных штаммов импортировались в базу данных BioNumerics, содержащую спектры штаммов *Y. pestis*, выделенных в разных природных очагах. Результаты сравнительного анализа представлены на рис. 2.

Проведенное исследование показало, что штаммы *Y. pestis* И-3595 и И-3596 имеют полностью идентичные VNTR-профили. Также они оказались тождественными с другими штаммами основного подвида (И-3607, И-3608, И-3609), выделенными в очаге в 2015 г. на участке Середина Ирбисту, и обнаруживают высокое сходство со штаммами, изолированными в 2012 и 2014 гг. При этом минимальные различия между штаммами *Y. pestis* И-3595, И-3596 и штаммами *Y. pestis* 1454 (изолирован в 2012 г. на участке Большие Сары-Гобо, Уландрыкский мезоочаг), *Y. pestis* 517 (И-3591) и *Y. pestis* 1530 (И-3592) (2014 г., участок Сербисту, Тархатинский мезоочаг) проявляются по локусу *yp4280ms62*, а между первыми и *Y. pestis* 517, *Y. pestis* 1530 и по локусу *yp2769ms06*. Все штаммы основного подвида из Горного Алтая попали в одну группу со штаммами, полученными в конце 1980-х годов на территории природного очага чумы Хуух-Сэрх-Мунх-Хаирхан, расположенного в Северо-Западной Монголии в отрогах хребта Монгольский Алтай (Дэлуун-сомон, Баян-Ульгийский аймак Монголии), что свидетельствует об их близком филогенетическом родстве. В меньшей степени обнаруживается подобие этой группы изолятов со штаммами из Тувинского природного очага чумы.

В качестве дополнительного инструмента углубленного изучения штаммов применялся сравнительный анализ их белковых спектров со спектрами штаммов, относящихся к основному и алтайскому подвидам, выделенных на территории Тувинского, Горно-Алтайского природных очагов чумы и природных очагов Монголии. Исследуемые штаммы *Y. pestis* И-3595 и И-3596 при сравнении с референсными спектрами чумного микроба обновленной базы Biotyper 3.0 однозначно идентифицировались как *Y. pestis*.

Таким образом, штаммы чумного микроба, изолированные от серых сурков, послуживших источником заражения чумой человека в Кош-Агачском районе Республики Алтай в 2015 г., относятся к основному подвиду возбудителя чумы с характерными культурально-морфологическими, биохимическими свойствами, набором основных детерминант вирулентности и обладают высокой универсальной вирулентностью для лабораторных животных. Они характеризуются высокой степенью близости по комплексу фенотипических и молекулярно-генетических показателей со штаммами *Y. pestis* subsp. *pestis*, выделенными в Горно-Алтайском природном очаге чумы в 2012 и 2014 гг. от диких зверьков и человека.

На основании проведенного исследования и

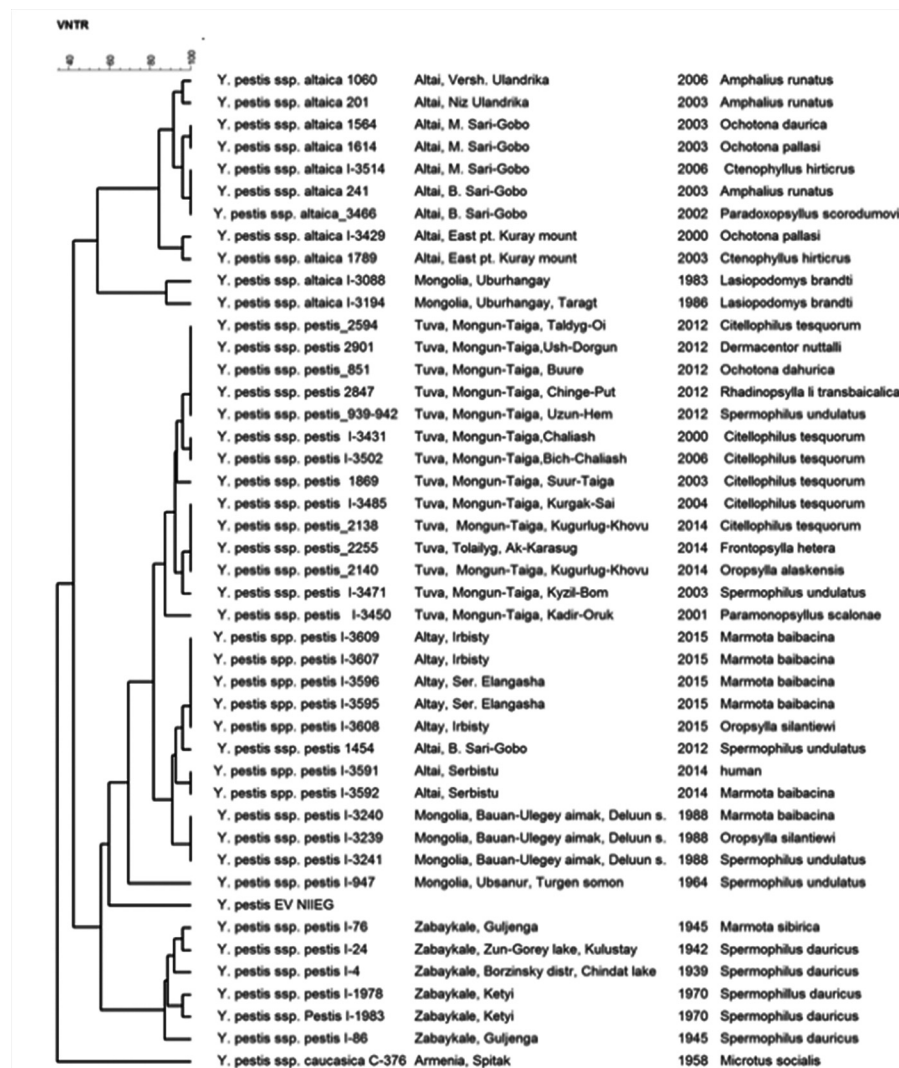


Рис. 2. Дендрограмма по результатам VNTR-анализа, иллюстрирующая степень родства штаммов *Y. pestis* И-3595 и И-3596 с геновариантами, изолированными на территориях некоторых природных очагов чумы

данных, полученных в последние годы [4, 5, 6, 8, 9], можно заключить, что спорадические случаи заболеваний людей чумой в Кош-Агачском районе Республики Алтай и обнаружение возбудителя чумы основного подвида в поселениях носителей возбудителя инфекции на разных территориях Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы представляют собой следствие единого процесса. Он заключается в интродукции *Y. pestis* subsp. *pestis* в поселения серого сурка в Юго-Восточном Алтае из Северо-Западной Монголии и существенным повышением эпидемического потенциала Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы. Это событие, по нашему мнению, произошло относительно недавно [7], но его последствия требуют углубленного изучения. Весьма важным аспектом в этом плане является изучение и оценка современной эпизоотической ситуации на сопредельной с Горным Алтаем энзоотичной по чуме территории Монголии. Необходимо отметить, что последние достоверные данные об эпизоотической ситуации на этой территории относятся к 1990 г. Обследовательские работы в сопредельных районах Монголии крайне важны для минимизации риска трансграничного завоза чумы в

субъекты Российской Федерации, а также необходимы для обеспечения эпидемиологического благополучия по чуме населения Республики Алтай.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: МЕДГИЗ; 1962. 179 с.
2. Балахонов С.В., Цэнджав С., Эрдэнэбат А. Новые плазмидовары штаммов возбудителя чумы, изолированных в Монголии. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 1991; 11:27–9.
3. Балахонов С.В., Балахонов С.В., Вержуцкий Д.Б., Иннокентьева Т.И. Эпидемиологическая оценка современного состояния природных очагов чумы в Сибири. *Эпидемиол. и вакцинопрофилактика.* 2010; 2:34–7.
4. Балахонов С.В., Афанасьев М.В., Шестопалов М.Ю., Остак А.С., Витязева С.А., Корзун В.М., Вержуцкий Д.Б., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Денисов А.В., Ивженко Н.И., Рождественский Е.Н., Висков Е.Н., Фомина Л.А. Первый случай выделения *Yersinia pestis* subsp. *pestis* в Алтайском горном природном очаге чумы. Сообщение 1. Микробиологическая характеристика, молекулярно-генетическая и масс-спектрометрическая идентификация изолята. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 1:60–5.
5. Балахонов С.В., Корзун В.М., Вержуцкий Д.Б., Михайлов Е.П., Рождественский Е.Н., Денисов А.В. Первый случай выделения *Yersinia pestis* subsp. *pestis* в Алтайском горном природном очаге чумы. Сообщение 2. Вероятные пути и механизмы заноса возбудителя чумы основного подвида на территорию очага.

Пробл. особо опасных инф. 2013; 2:5–10.

6. Балахонов С.В., Попова А.Ю., Мищенко А.И., Михайлов Е.П., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Денисов А.В., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Щучинов Л.В., Зарубин И.В., Семёнова Ж.Е., Маденова Н.М., Дюсенбаев Д.К., Ярыгина М.Б., Чипанин Е.В., Косилко С.А., Носков А.К., Корзун В.М. Случай заболевания человека чумой в Кош-Агачском районе Республики Алтай в 2015 г. Сообщение 1. Клинико-эпидемиологические и эпизоотологические аспекты. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 1:55–60.

7. Корзун В.М., Балахонов С.В., Чипанин Е.В., Денисов А.В., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Ярыгина М.Б., Рождественский Е.Н., Фомина Л.А. Формирование, развитие и функционирование природного очага чумы в Горном Алтае. *Мед. паразитол. и паразитарн. бол.* 2016; 1:17–25.

8. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Щучинов Л.В., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Денисов А.В., Шарова И.Н., Попов Н.В., Кузнецов А.А. Заболевание человека чумой в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2014 г. Сообщение 1. Эпидемиологические и эпизоотологические особенности проявления чумы в Горно-Алтайском высокогорном (Сайлюгемском) природном очаге чумы. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 4:9–16.

9. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Шарова И.Н., Мищенко А.И., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Михайлов Е.П., Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Куклева Л.М., Черкасов А.В., Оглодин Е.Г., Куклев В.Е., Одинок Г.Н., Щербак С.А., Балахонов С.В., Афанасьев М.В., Витязева С.А., Шестопалов М.Ю., Климов В.Т. Заболевание человека чумой в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге в 2014 г. Сообщение 2. Особенности лабораторной диагностики и молекулярно-генетическая характеристика выделенных штаммов. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 4:43–51.

10. Мищенко Г.Г., Кутырев В.В. Лабораторная диагностика особо опасных инфекционных болезней: Практическое руководство. М.: Издательство «Медицина», издательство «Шико»; 2009. 272 с.

11. Erdenebat A., Batbold J., Dashnyam B. Plasmid content and distribution of *Y. pestis* isolated in Mongolia. *Scientific Journal. Center for Infectious Diseases With Natural Foci*, 2001; 9:87–91.

References

1. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Studies]. L.: MEDGIZ; 1962. 179 p.
2. Balakhonov S.V., Tsendzhav S., Erdenebat A. [New plasmidovars of plague agent strains, isolated in Mongolia]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 1991; 11:27–9.
3. Balakhonov S.V., Verzhutsky D.B., Innokent'eva T.I. [Epidemiological assessment of the current state of natural plague foci in Siberia]. *Epidemiol. Vaktsinoprofilakt.* 2010; 2:34–7.
4. Balakhonov S.V., Afanas'ev M.V., Shestopalov M.Yu., Ostyak A.S., Vityazeva S.A., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., Ivzhenko N.I., Rozhdestvensky E.N., Viskov E.N., Fomina L.A. [The first case of *Yersinia pestis* subsp. *pestis* isolation in the territory of Altai mountain natural plague focus. Communication 1. Microbiological characteristics, molecular-genetic and mass-spectrometric identification of the isolate]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 1:60–5.
5. Balakhonov S.V., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Mikhaylov E.P.,

Rozhdestvensky E.N., Denisov A.V. [The first case of *Yersinia pestis* subsp. *pestis* isolation in the territory of the Altai mountain natural plague focus. Communication 2. Probable ways and mechanisms of plague agent main sub-species importation into the territory of the focus]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 2:5–10.

6. Balakhonov S.V., Popova A.Yu., Mishchenko A.I., Mikhailov E.P., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Denisov A.V., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Shchuchinov L.V., Zarubin I.V., Semenova Zh.E., Madenova N.M., Dyusenbaev D.K., Yarygina M.B., Chipanin E.V., Kosilko S.A., Noskov A.K., Korzun V.M. [A case of human infection with plague in the Kosh-Agach Region of the Republic of Altai in 2015. Communication 1. Clinical-epidemiological and epizootological aspects]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 1:55–60.

7. Korzun V.M., Balakhonov S.V., Chipanin E.V., Denisov A.V., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Yarygina M.B., Rozhdestvensky E.N., Fomina L.A. [Formation, development and functioning of natural plague focus in Gorny Altai]. *Med. Parazitol. Parazitarn. Bol.* 2016; 1:17–25.

8. Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakskina N.D., Shchuchinov L.V., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Denisov A.V., Sharova I.N., Popov N.V., Kuznetsov A.A. [Infection of an individual with plague in the Gorno-Altai high-mountain natural focus in 2014. Communication 1. Epidemiological and epizootological peculiarities of plague manifestations in the Gorno-Altai high-mountain (Sailyugemsky) natural plague focus]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 4:9–16.

9. Kutyrev V.V., Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakskina N.D., Sharova I.N., Mishchenko A.I., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Mikhailov E.P., Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Kuleva L.M., Cherkasov A.V., Oglodin E.G., Kuklev V.E., Odnokov G.N., Shcherbakova S.A., Balakhonov S.V., Afanas'ev M.V., Vityazeva S.A., Shestopalov M.Yu., Klimov V.T. [Infection of an individual with plague in the Gorno-Altai high-mountain natural focus in 2014. Communication 2. Peculiarities of laboratory diagnostics and molecular-genetic characterization of the isolated strains]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 4:43–51.

10. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V. [Laboratory Diagnostics of Particularly Dangerous Infectious Diseases: Practice Guidelines]. M.: "Meditsina", "Shiko"; 2009. 272 p.

11. Erdenebat A., Batbold J., Dashnyam B. Plasmid content and distribution of *Y. pestis* isolated in Mongolia. *Scientific Journal. Center for Infectious Diseases With Natural Foci*, 2001; 9:87–91.

Authors:

Balakhonov S.V., Yarygina M.B., Vityazeva S.A., Ostyak A.S., Kosilko S.A., Korzun V.M. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V. Altai Plague Control Station. 2, Zavodskaya St., Gorno-Altai, 649002, Russian Federation. E-mail: chuma@mail.gorny.ru.

Об авторах:

Балахонов С.В., Ярыгина М.Б., Витязева С.А., Остяк А.С., Косилко С.А., Корзун В.М. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Денисов А.В. Алтайская противочумная станция. Российская Федерация, 649002, Горно-Алтайск, ул. Заводская, 2. E-mail: chuma@mail.gorny.ru.

Поступила 28.04.16.

Л.В.Лемасова, Г.А.Ткаченко, С.С.Савченко, О.С.Бондарева, В.А.Антонов

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ *BURKHOLDERIA MALLEI* И *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

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

Цель. Разработать мультиплексную тест-систему для выявления и дифференциации возбудителей сапа и мелиоидоза методом ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени, обладающую высокой чувствительностью и специфичностью. **Материалы и методы.** В работе использовано 104 штамма микроорганизмов, из них: 56 штаммов *B. pseudomallei*, 14 – *B. mallei* и 34 – гетерологичных видов микроорганизмов. Для определения аналитической чувствительности реакции амплификации исследовали серии 10-кратных разведений бактериальных взвесей *B. pseudomallei* и *B. mallei* в концентрации от $1 \cdot 10^9$ м.к./мл до $1 \cdot 10^2$ м.к./мл. **Результаты и выводы.** Сконструирована мультиплексная ПЦР тест-система, которая включает две пары праймеров и флуоресцентно-меченные зонды, обеспечивающие одновременное обнаружение и дифференциацию двух близкородственных видов патогенных буркхолдерий. В качестве ДНК-мишеней выбраны видоспецифичный для возбудителя сапа *B. mallei* фрагмент гена *fliP*, который кодирует белок биосинтеза флагеллина, а для *B. pseudomallei* видоспецифичный участок гена, кодирующий белок gp68. Проверка при исследовании штаммов патогенных буркхолдерий, близкородственных и гетерологичных микроорганизмов показала 100 % специфичность разработанной амплификационной тест-системы. Аналитическая чувствительность сконструированной мультиплексной ПЦР тест-системы для выявления возбудителя сапа составила $1 \cdot 10^3$ м.к./мл, а для возбудителя мелиоидоза – $1 \cdot 10^4$ м.к./мл.

Ключевые слова: сап, мелиоидоз, тест-система, ПЦР в режиме реального времени, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*.

Корреспондирующий автор: Людмила Викторовна Лемасова, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

L.V.Lemasova, G.A.Tkachenko, S.S.Savchenko, O.S.Bondareva, V.A.Antonov

Development of Real-Time Multiplex PCR Assay for the Detection and Differentiation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation

Objective of the study was to develop a real-time multiplex PCR assay for the detection and differentiation of *B. mallei* and *B. pseudomallei*, characterized by high sensitivity and specificity. **Materials and Methods.** The primers and probes were designed to detect the species-specific sequence of the *fliP* gene of *B. mallei* and gp68 gene of *B. pseudomallei*, respectively. Species specificity was tested with a panel of 56 *B. pseudomallei* strains, 14 *B. mallei* strains and 34 strains of closely or distantly related species. To define the analytical sensitivity of the assay, the serially diluted bacterial suspension at concentrations of 10^9 – 10^2 cells /ml was used. **Conclusions.** The multiplex PCR assay with two primer pairs and fluorescently-labeled probes, allowing for simultaneous detection and differentiation between *B. mallei* and *B. pseudomallei* was designed. Species-specific for glanders agent, *B. mallei*, fragment of *fliP* gene, which encodes protein of flagellin biosynthesis, and species-specific gene region of *B. pseudomallei*, encoding gp68 protein, were identified as DNA targets. Testing of *Burkholderia* and non-*Burkholderia* bacterial species revealed 100 % specificity of the amplification assay. The minimum detection limit of the designed multiplex PCR test-system was $1 \cdot 10^3$ cells/ml for *B. mallei*, and $1 \cdot 10^4$ cells/ml for *B. pseudomallei*.

Keywords: glanders, melioidosis, PCR assay, real-time PCR, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Lyudmila V. Lemasova, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Citation: Lemasova L.V., Tkachenko G.A., Savchenko S.S., Bondareva O.S., Antonov V.A. Development of Real-Time Multiplex PCR Assay for the Detection and Differentiation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 4:56–59. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-56-59

Burkholderia mallei и *Burkholderia pseudomallei* имеют важное медицинское значение, так как являются возбудителями тяжелых заболеваний человека и животных – сапа и мелиоидоза. Возбудитель мелиоидоза распространен в субтропических регионах мира, таких как Юго-Восточная Азия и Северная Австралия. В последние годы случаи заболевания регистрируются в Южном Китае, Тайване, Гонконге, Южной Индии и Бразилии [1, 2, 3, 4, 5, 11, 12]. Для

сапа эндемичными регионами являются Африка, Азия, Ближний Восток, Центральная и Южная Америка [9]. Заболеваемость сапом среди людей носит в основном спорадический характер, но существуют группы риска – ветеринары, зоологи, в частности иппологи, а также работники клинических лабораторий.

Развитие туризма, высокая миграционная активность населения, завоз экзотических животных увели-

чивает риск поражения людей опасными биологическими агентами, в том числе *B. mallei* и *B. pseudomallei*. Данные микроорганизмы относятся ко второй группе патогенности и являются потенциальными агентами биотерроризма, что диктует необходимость использования ускоренных методов идентификации и дифференциации возбудителей сапа и мелиоидоза.

Зарубежными авторами предложено несколько генов-мишеней для амплификации возбудителей сапа и мелиоидоза: 16S рРНК [10], 23S рРНК, спейсерные области 16-23S рРНК, гены системы III типа секреции (TTS1) [6, 10], флагеллярный ген [7] кластер генов LPS, кодирующий капсульный липополисахарид [8].

В Российской Федерации в настоящее время также существуют ПЦР тест-системы, направленные на выявление ДНК патогенных буркхольдерий: набор реагентов для выявления ДНК возбудителей сапа (*Burkholderia mallei*) и мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией «Амплиген Burk» [1] и набор реагентов для выявления патогенных буркхольдерий (*B. mallei* и *B. pseudomallei*) методом полимеразной цепной реакции «23S-Eph» [1]. Вышеуказанные наборы отличаются способом детекции, но не позволяют дифференцировать патогенные буркхольдерии.

Многими авторами проводятся исследования по поиску видоспецифичных ДНК-мишеней, присутствующих у возбудителя сапа, но отсутствующих у *B. pseudomallei*. Трудность создания высокоспецифичной амплификационной тест-системы для дифференциации ДНК патогенных буркхольдерий обусловлена значительным генетическим сходством *B. mallei* и *B. pseudomallei*.

Цель настоящего исследования состояла в разработке мультиплексной тест-системы для выявления и дифференциации возбудителей сапа и мелиоидоза методом ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени, обладающей высокой чувствительностью и специфичностью.

Материалы и методы

В работе использовано 104 штамма микроорганизмов, из них 14 штаммов *B. mallei*, 56 – *B. pseudomallei*, 34 – гетерологичных микроорганизмов: 5 – *Burkholderia thailandensis*, 15 – *Burkholderia cepacia*, 4 – *Pseudomonas putida*, 1 – *Pseudomonas testosteroni*, 1 – *Pseudomonas fluorescens*, 1 – *Pseudomonas aeruginosa*, 1 – *Yersinia pestis* EV, 3 – *Francisella tularensis*, 1 – *Bacillus anthracis*, 1 – *Escherichia coli*, 1 – *Staphylococcus aureus*, которые предоставлены коллекционным центром ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт».

Работу с бактериями проводили в соответствии с положениями санитарных правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)», СП 1.3.2322-08

«Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» и методическими указаниями МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности».

Культуры *B. pseudomallei*, *B. mallei* и гетерологичных видов микроорганизмов высевали на агар Хоттингера с 5 % глицерином и инкубировали в течение 24–48 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Готовили взвеси каждого штамма в концентрации, соответствующей 10 МЕ по отраслевому стандартному образцу мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича (ОСО 42-28-59-85П), эквивалентной $1 \cdot 10^9$ м.к./мл, и разводили 0,9 % раствором натрия хлорида таким образом, чтобы концентрация возбудителей сапа и мелиоидоза составляли $1 \cdot 10^2$, $1 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^4$ м.к./мл. Суспензии гетерологичных микроорганизмов разводили до концентрации $1 \cdot 10^7$ м.к./мл.

Количество живых клеток в приготовленных разведениях проверяли методом высева по 0,1 мл микробной взвеси каждого тест-штамма из пробы, содержащей $1 \cdot 10^4$ и $1 \cdot 10^3$ м.к./мл на чашки с агаром Хоттингера с 5 % глицерином. Через 24–48 ч инкубации в термостате при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ подсчитывали количество колоний, выросших на поверхности агара.

Тестируемые микробные взвеси, содержащие по $1 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^2$ м.к./мл *B. pseudomallei* и *B. mallei* и по $1 \cdot 10^7$ м.к./мл гетерологичных микроорганизмов, обеззараживали согласно требованиям СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)». По 1 мл тестируемых взвесей переносили в микроцентрифужные пробирки типа «Eppendorf» объемом 1,5 мл и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 10 мин, надосадочную жидкость отбирали, а осадок ресуспендировали в 100 мкл бидистиллированной воды. Затем к 100 мкл суспензии добавляли лизирующий раствор, приготовленный на основе 6 М гуанидинизотионата натрия, в объеме, указанном в инструкции к набору для выделения ДНК, и инкубировали 15 мин при 65°C .

Выделение ДНК из чистых культур *B. mallei* и *B. pseudomallei* осуществляли с помощью набора «АмплиПрайм РИБО-преп» (ООО «НекстБио», Москва). Работу проводили в соответствии с инструкцией к указанному набору.

Амплификацию продолжительностью 45 циклов проводили на приборе «Rotor-Gene 6000» («Corbett Research», Австралия) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени в микроцентрифужных пробирках (0,2 мл) в объеме 25 мкл с использованием «горячего старта» путем добавления термостабильной TaqF-полимеразы, которая активируется после прогревания при высокой температуре.

Дизайн праймеров и зондов к ДНК-мишеням

осуществляли с использованием программного обеспечения Gene Runner 3.0 и Oligo 4.0. Праймеры и олигонуклеотидные зонды синтезированы фирмой ЗАО «Синтол» (Москва).

Результаты и обсуждение

Конструирование тест-системы включало поиск наиболее специфичных, консервативных последовательностей возбудителя сапа и возбудителя мелиоидоза, представленных в зарубежной и отечественной литературе, а также депонированных в базе NCBI. В результате работы были подобраны две пары специфичных праймеров. Одна пара праймеров, обозначенных *Bm-ISfl-f/Bm-ISfl-r*, комплементарных фрагменту гена *fliP* (*flagellar biosynthetic protein*), обеспечивает амплификацию фрагмента ДНК возбудителя сапа. Праймеры *Bps-gp68-f/Bps-gp68-r*, комплементарные участку гена, кодирующего белок gp68 *B. pseudomallei* из региона *RimL* (ацетилтрансферазы, включающие N-ацетилазы рибосомальных белков), обеспечивают амплификацию фрагмента ДНК только возбудителя мелиоидоза.

Для обнаружения ампликона *B. mallei* сконструирован специфичный зонд *Bm-ISfl-Pr*; меченный флуорофором FAM, характерное свечение которого детектируется на канале Green, и гасителем флуоресценции BHQ1. Зонд *gp68-Pr*; специфичный для *B. pseudomallei*, мечен с 5'-конца флуорофором TAMRA, характерное свечение которого детектируется на канале Yellow, и с 3'-конца гасителем флуоресценции BHQ2. Концевые последовательности каждого из зондов являются комплементарными и образуют «шпильку» по принципу «молекулярного маяка».

Предварительную оценку специфичности праймеров и зондов проводили с помощью программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). На момент проведения компьютерного анализа гомологии ДНК сконструированных олигонуклеотидов и ДНК гетерологичных (по отношению к *B. mallei* и *B. pseudomallei*) микроорганизмов не выявлено.

При подборе оптимальных условий проведения ПЦР в мультиплексном формате определяли следующие параметры реакции: состав реакционной смеси – концентрацию праймеров, зондов, TaqF-полимеразы, ионов Mg^{2+} , программу амплификации – температуру отжига праймеров, продолжительность каждого шага амплификации, количество циклов, длительность предварительной денатурации. После оптимизации условий мультиплексной ПЦР, обеспечивалось стабильное нарастание уровня флуоресценции по каналам детекции (Green, Yellow), не приводящее к искажению сигнала по другим каналам.

В результате выполненных экспериментов подобран оптимальный состав реакционной смеси для постановки мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. В состав реакционной смеси входили ПЦР-буфер, 0,2 мМ каждого дНТФ и TaqF-полимераза (ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии», Москва), 2,5 мМ

$MgCl_2$ (Thermo Fisher Scientific), 5 пмоль каждого зонда и по 10 пмоль праймеров. После окончания реакции приступали к анализу результатов. Были установлены значения пороговой линии: для каналов специфической детекции Green – 0,05, Yellow – 0,03. На основании проведенных исследований определена максимальная величина порогового цикла (Ct), при котором результат реакции считается положительным: < 33 для канала Green, < 33 для канала Yellow. Учет результатов осуществляли по каждому каналу отдельно.

Проведена оценка специфичности сконструированной тест-системы на чистых препаратах ДНК *B. pseudomallei*, *B. mallei* и гетерологичных микроорганизмах. При проведении ПЦР с разработанной тест-системой отмечалось нарастание уровня флуоресценции по каналу FAM/Green с ДНК всех исследованных штаммов сапного микроба; флуоресценция по каналу JOE/Yellow регистрировалась у всех штаммов *B. pseudomallei*. С ДНК всех исследованных гетерологичных микроорганизмов получены отрицательные результаты мультиплексной ПЦР в концентрации $1 \cdot 10^7$ м.к./мл и ниже.

Для определения аналитической чувствительности реакции амплификации исследовали серию 10-кратных разведений культур *B. pseudomallei* 100 и *B. mallei* 10230 в концентрации от $1 \cdot 10^9$ м.к./мл до $1 \cdot 10^2$ м.к./мл. В результате работы выявлено, что чувствительность составила для возбудителя сапа $1 \cdot 10^3$ м.к./мл (рис. 1) и для возбудителя мелиоидоза $1 \cdot 10^4$ (рис. 2).

Таким образом, в ходе работы сконструирована мультиплексная ПЦР тест-система, которая включает две пары праймеров и флуоресцентно-меченные зонды, обеспечивающие одновременное обнаружение и дифференциацию возбудителей сапа и мелиоидоза. В качестве ДНК-мишеней выбраны видоспецифичный для возбудителя сапа *B. mallei* фрагмент гена *fliP*, который кодирует белок биосинтеза флагеллина, а для *B. pseudomallei* видоспецифичный участок гена, кодирующий белок gp68. Проверка на штам-

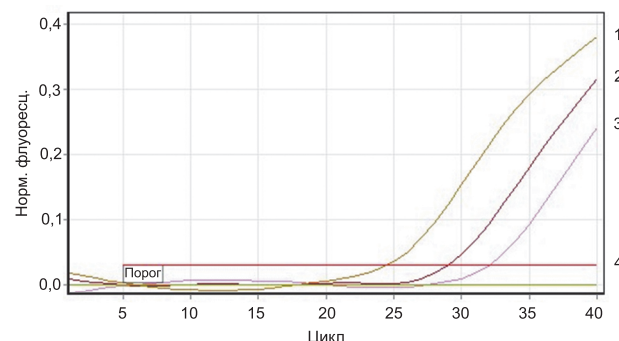


Рис. 1. Кривые накопления флуоресценции по каналу FAM/Green при определении чувствительности реакции мультиплексной ПЦР с ДНК возбудителя сапа:

1 – *B. mallei* 10230 в концентрации $1 \cdot 10^5$ м.к./мл; 2 – *B. mallei* 10230 в концентрации $1 \cdot 10^4$ м.к./мл; 3 – *B. mallei* 10230 в концентрации $1 \cdot 10^3$ м.к./мл; 4 – отрицательный контроль и кривые накопления флуоресценции проб *B. mallei* в концентрации меньше $1 \cdot 10^2$ м.к./мл, не пересекающие пороговую линию

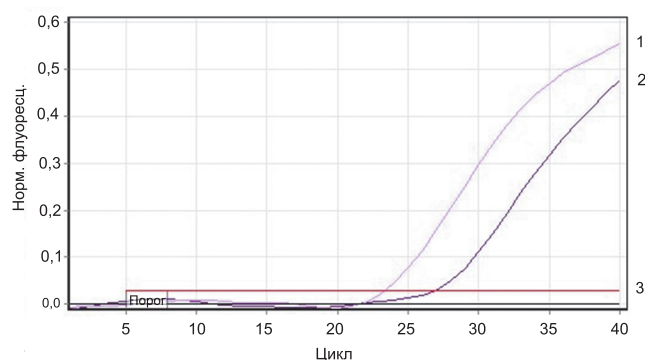


Рис. 2. Кривые накопления флуоресценции по каналу JOE/Yellow при определении чувствительности реакции мультиплексной ПЦР с ДНК возбудителя мелиоидоза:

1 – *B. pseudomallei* 100 в концентрации $1 \cdot 10^5$ м.к./мл; 2 – *B. pseudomallei* 100 в концентрации $1 \cdot 10^4$ м.к./мл; 3 – отрицательный контроль и кривые накопления флуоресценции проб *B. pseudomallei* в концентрации меньше $1 \cdot 10^3$ м.к./мл, не пересекающие пороговую линию

мах патогенных буркхольдерий, близкородственных и гетерологичных микроорганизмов показала 100 % специфичность разработанной тест-системы. При амплификации ДНК патогенных буркхольдерий определена аналитическая чувствительность сконструированной мультиплексной тест-системы, которая составила для возбудителя сапа – $1 \cdot 10^3$ м.к./мл, а для возбудителя мелиоидоза – $1 \cdot 10^4$ м.к./мл.

Разработанная мультиплексная тест-система в режиме реального времени позволяет обнаруживать *B. mallei* и *B. pseudomallei* и дифференцировать патогенные буркхольдерии с высокой чувствительностью и специфичностью. Данная тест-система может быть использована как в клинических лабораториях для установления этиологии заболевания, так и в работе специализированных противоэпидемических формирований.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Прохвятилова Е.В., Антонов В.А., Викторов Д.В., Илюхин В.И., Храпова Н.П., Ткаченко Г.А., Захарова И.Б., Плеханова Н.Г., Новицкая И.В., Кулаков М.Я., Замарина Т.В., Корсакова И.И., Савченко С.С., Бондарева О.С., Батурин А.А., Лемасова Л.В., Тетерятникова Н.Н., Белицкая Л.И. Оценка эффективности применения наборов реагентов для обнаружения возбудителя мелиоидоза при проведении внутреннего контроля качества лабораторных исследований в референс-центре по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза. *Дальневосточный журн. инф. патологии*. 2014; 25(25):128–32.
2. Brilhante R.S., Bandeira T.J., Cordeiro R.A., Grangeiro T.B., Lima R.A., Ribeiro J.F., Castelo-Branco D.S., Rodrigues J.L., Coelho I.C., Magalhães F.G., Rocha M.F., Sidrim J.J. Clinical-epidemiological features of 13 cases of melioidosis in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(10):3349–52. DOI: 10.1128/JCM.01577-12.
3. Currie B.J., Dance D.A., Cheng A.C. The global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis: an update. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 102 Suppl 1:S1–4. DOI: 10.1016/S0035-9203(08)70002-6.
4. Chen Y.S., Lin H.H., Mu J.J., Chiang C.S., Chen C.H., Buu L.M., Lin Y.E., Chen Y.L. Distribution of melioidosis cases and viable *Burkholderia pseudomallei* in soil: evidence for emerging melioidosis in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1432–4. DOI:

10.1128/JCM.01720-09 48.

5. Jamkhandi D.M., Alex R., George K. Melioidosis: a report of two cases. *Natl. Med. J. India*. 2014; 27(4):202–3.

6. Rainbow L., Hart C.A., Winstanley G. Distribution of type III secretion gene clusters in *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis* and *B. mallei*. *J. Med. Microbiol.* 2002; 51(5):374–84.

7. Sonthayanon P., Krasao P., Wuthiekanun V., Panyim S., Tungpradabkul S. A simple method to detect and differentiate *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis* using specific flagellin gene primers. *Mol. Cell. Probes*. 2002; 16(3):217–22.

8. Tomaso H., Pitt T.L., Landt O., Dahouk S.A., Scholz H.C., Reisinger E.C., Sprague L.D., Rathmann I., Neubauer H. Rapid presumptive identification of *Burkholderia pseudomallei* with real-time PCR assays using fluorescent hybridization probes. *Mol. Cell. Probes*. 2005; 19(1):9–20.

9. Whitlock G.C., Estes D.M., Torres A.G. Glanders: off to the races with *Burkholderia mallei*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2007; 277(2):115–22.

10. Winstanley C., Hart C. A. Presence of type III secretion genes in *Burkholderia pseudomallei* correlates with Ara^r phenotypes. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(2):883–5.

11. Varma-Basil M., E-Hajj H., Marras S.A., Hazbón M.H., Mann J.M., Connell N.D., Kramer F.R., Alland D. Molecular beacons for multiplex detection of four bacterial bioterrorism agents. *Clin. Chem.* 2004; 50(6):1060–2.

12. Yang S. Melioidosis research in China. *Acta Trop.* 2000; 77(2):157–65.

References

1. Prokhvatilova E.V., Antonov V.A., Viktorov D.V., Ilyukhin V.I., Khrapova N.P., Tkachenko G.A., Zakharova I.B., Plekhanova N.G., Novitskaya I.V., Kulakov M.Ya., Zamarina T.V., Korsakova I.I., Savchenko S.S., Bondareva O.S., Baturin A.A., Lemasova L.V., Teteryatnikova N.N., Belitskaya L.I. [Assessment of efficiency of applying the reagent panel for the detection of melioidosis agent for the purposes of internal quality control of laboratory tests at the Reference Center for monitoring over glanders and melioidosis agents]. *Dal'nevostochn. Zh. Infek. Patol.* 2014; 25(25):128–32.
2. Brilhante R.S., Bandeira T.J., Cordeiro R.A., Grangeiro T.B., Lima R.A., Ribeiro J.F., Castelo-Branco D.S., Rodrigues J.L., Coelho I.C., Magalhães F.G., Rocha M.F., Sidrim J.J. Clinical-epidemiological features of 13 cases of melioidosis in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(10):3349–52. DOI: 10.1128/JCM.01577-12.
3. Currie B.J., Dance D.A., Cheng A.C. The global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis: an update. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008; 102 Suppl 1:S1–4. DOI: 10.1016/S0035-9203(08)70002-6.
4. Chen Y.S., Lin H.H., Mu J.J., Chiang C.S., Chen C.H., Buu L.M., Lin Y.E., Chen Y.L. Distribution of melioidosis cases and viable *Burkholderia pseudomallei* in soil: evidence for emerging melioidosis in Taiwan. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(4):1432–4. DOI: 10.1128/JCM.01720-09 48.
5. Jamkhandi D.M., Alex R., George K. Melioidosis: a report of two cases. *Natl. Med. J. India*. 2014; 27(4):202–3.
6. Rainbow L., Hart C.A., Winstanley G. Distribution of type III secretion gene clusters in *Burkholderia pseudomallei*, *B. thailandensis* and *B. mallei*. *J. Med. Microbiol.* 2002; 51(5):374–84.
7. Sonthayanon P., Krasao P., Wuthiekanun V., Panyim S., Tungpradabkul S. A simple method to detect and differentiate *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis* using specific flagellin gene primers. *Mol. Cell. Probes*. 2002; 16(3):217–22.
8. Tomaso H., Pitt T.L., Landt O., Dahouk S.A., Scholz H.C., Reisinger E.C., Sprague L.D., Rathmann I., Neubauer H. Rapid presumptive identification of *Burkholderia pseudomallei* with real-time PCR assays using fluorescent hybridization probes. *Mol. Cell. Probes*. 2005; 19(1):9–20.
9. Whitlock G.C., Estes D.M., Torres A.G. Glanders: off to the races with *Burkholderia mallei*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2007; 277(2):115–22.
10. Winstanley C., Hart C. A. Presence of type III secretion genes in *Burkholderia pseudomallei* correlates with Ara^r phenotypes. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(2):883–5.
11. Varma-Basil M., E-Hajj H., Marras S.A., Hazbón M.H., Mann J.M., Connell N.D., Kramer F.R., Alland D. Molecular beacons for multiplex detection of four bacterial bioterrorism agents. *Clin. Chem.* 2004; 50(6):1060–2.
12. Yang S. Melioidosis research in China. *Acta Trop.* 2000; 77(2):157–65.

Authors:

Lemasova L.V., Tkachenko G.A., Savchenko S.S., Bondareva O.S., Antonov V.A. Volgograd Research Anti-Plague Institute, 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Об авторах:

Лемасова Л.В., Ткаченко Г.А., Савченко С.С., Бондарева О.С., Антонов В.А. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Поступила 28.07.16.

Р.А.Максютов

КОМПЛЕКСНЫЙ ПОДХОД К ВИДОСПЕЦИФИЧНОЙ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСА ОСПЫ КОРОВ

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». п. Кольцово, Российская Федерация

Цель. Разработка и апробация метода видоспецифичной детекции вируса оспы коров (ВОК). **Материалы и методы.** В работе использованы олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченные зонды для родоспецифичной детекции ортопоксвирусов (ОПВ) и видоспецифичной детекции вирусов оспы коров и экстромелии (ВЭ). Пары флуоресцентных красителей и соответствующих тушителей флуоресценции вводили в зонды в соответствии с их специфичностью: ОПВ-специфичный зонд содержал пару FAM/BHQ1, ВОК-специфичный зонд – JOE/BHQ1, ВЭ-специфичный зонд – Cy5/BHQ3. Для определения чувствительности и специфичности метода видоспецифичной детекции вируса оспы коров исследованы образцы 68 различных штаммов ортопоксвирусов. **Результаты и выводы.** Реализован комплексный подход к видоспецифичной детекции вируса оспы коров за счет использования мультиплексного варианта ПЦР в реальном времени для одновременной мультилокусной детекции на основе трех независимых генов-мишеней вируса оспы коров, родоспецифичной детекции для исключения ложноотрицательных результатов и дополнительных олигонуклеотидных праймеров и зонда, обеспечивающих специфичную детекцию вируса экстромелии, с целью исключения ложноположительных результатов.

Ключевые слова: ортопоксвирусы, вирус оспы коров, вирус экстромелии, ПЦР в реальном времени.

Корреспондирующий автор: Ринат Амирович Максютов, e-mail: maksyutov_ra@vector.nsc.ru.

R.A.Maksyutov

Complex Approach to Species-Specific Detection of Cowpox Virus

State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Kol'tsovo, Russian Federation

Objective of the study is to develop and validate the method for species-specific detection of cowpox virus (CPV). **Materials and methods.** Utilized were oligonucleotide primers and fluorescence-labeled probes for genus-specific detection of orthopoxviruses (OPV) and species-specific detection of cowpox and ectromelia viruses (EV). Pairs of fluorescent dyes and corresponding fluorescence extinguishers were embodied into probes in accordance with their specificity: OPV-specific probe contained FAM/BHQ1 pair, CPV-specific probe – JOE/BHQ1, and EV-specific – Cy5/BHQ3. For evaluation of sensitivity and specificity of the method for species-specific detection of CPV, investigated were samples of 68 different strains of orthopoxviruses. **Results and conclusions.** Implemented was complex approach to species-specific detection of CPV using multiplex real-time PCR variant for simultaneous multilocus detection on the basis of three independent target genes of CPV, to genus-specific detection for the exclusion of false-negative results, and additional oligonucleotide primers and probes, providing for specific detection of EV, aimed at the exclusion of false-positive results.

Key words: orthopoxviruses, cowpox virus, ectromelia virus, real-time PCR.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Rinat A. Maksyutov, e-mail: maksyutov_ra@vector.nsc.ru.

Citation: Maksyutov R.A. Complex Approach to Species-Specific Detection of Cowpox Virus. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 4:60–63. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-60-63

Оспа коров – зоонозная инфекция, вызываемая вирусом оспы коров (ВОК), естественным хозяином которого является широкий круг представителей отряда грызунов [12]. Как правило, оспа коров вызывает доброкачественные местные повреждения [2], в редких случаях может приводить к генерализации инфекции [1] и смертельным случаям [15]. ВОК относится к роду *Orthopoxvirus* (ОПВ) семейства *Poxviridae* наравне с другими патогенными для человека вирусами натуральной оспы (ВНО), оспы обезьян (ВОО) и осповакцины (ВОВ).

В 1980 г., учитывая наличие тяжелых поствакцинальных осложнений при использовании классической живой вакцины и подтверждение ликвидации натуральной оспы, вакцинацию против данной инфекции Всемирная Организация Здравоохранения

(ВОЗ) рекомендовала в дальнейшем не проводить. Последующее прекращение вакцинации против оспы создало опасную ситуацию, когда человеческая популяция с каждым годом становится все более беззащитной не только перед возможным инфицированием ВНО в результате теракта или возникновения вируса в природе, но и перед заражением другими близкородственными ортопоксвирусами, такими как ВОО или ВОК. Необычно многочисленные вспышки ортопоксвирусных инфекций среди людей стали в последние годы регистрировать в различных географических регионах, вызываемых ВОК [4, 6, 7, 10], ВОВ [14] и ВОО [11]. Поэтому не вызывает сомнений актуальность разработки современных экспресс-методов детекции патогенных для человека ортопоксвирусов.

Ранее были разработаны методы на основе ПЦР в реальном времени для детекции ВОК [5] и одно-временной детекции и дифференциации всех патогенных для человека ортопоксвирусов (ВНО, ВОО, ВОК и ВОВ) [13]. В обоих методах мишенью для детекции ВОК являлся район OPT D11L ВОК. В 2011 г. D.S.Caroll *et al.* обнаружили протяженные делеции в OPT D11L двух штаммов вируса оспы коров – Austria_1999 (HQ407377) и Norway_1994_MAN (HQ420899) [3]. Проведенный теоретический анализ показал, что ДНК данных штаммов не должна детектироваться разработанными методами, использующими OPT D11L в качестве мишени для ВОК. И действительно, при экспериментальной проверке ДНК 47 штаммов ВОК, в которую также входили штаммы Austria_1999 и Norway_1994_MAN, только 39 из 47 штаммов смогли быть успешно детектированы разработанным методом [8]. При этом наличие ортопоксвирусной ДНК во всех 47 образцах было доказано с помощью разработанной родоспецифичной методики на основе ПЦР в реальном времени. В результате углубленного изучения района OPT D8L-D11L была выбрана новая комбинация праймеров и гибридизационного зонда, нацеленная на ВОК-специфичный район D8L. Последующий анализ показал специфическую детекцию 46 из 47 ДНК штаммов, включая Austria_1999 и Norway_1994_MAN [8].

По современным данным, вирус оспы коров в силу своей гетерогенности является не одним видом, а представляет собой обобщенное название нескольких (до пяти) независимых видов [3, 4], что всегда будет сохранять вероятность появления генетически отличного штамма ВОК, который сможет избежать выявления с помощью одиночного видоспецифичного метода детекции. В настоящей работе предлагается новый комплексный подход к видоспецифичной и надежной детекции ВОК.

Материалы и методы

Вирусная ДНК. В работе использовали расширенную панель образцов ДНК ортопоксвирусов (ВОК – 47, ВНО – 13, ВОО – 2, ВОВ – 3, вирус экстремелии (ВЭ) – 2, вирус оспы верблюдов (ВОВр) – 1 штамм) и других вирусных агентов (вирусы миксомы кроликов, оспы кур, ветряной оспы и простого герпеса I и II типа) [8, 9].

Дизайн праймеров и зондов. Выбор видоспецифичных олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченных зондов проводили на основе выровненных с помощью программ BioEdit v.7.0 и Muscle v.3.6 нуклеотидных последовательностей всех доступных геномов ортопоксвирусов. Последовательности олигонуклеотидных праймеров и зондов анализировали, используя программу Oligo v.6.0, и проверяли на отсутствие гомологии с известными нуклеотидными последовательностями с помощью программы BLAST. Пары флуоресцентных красителей и соответствующих тушителей флуорес-

ценции вводили в зонды в соответствии с их специфичностью: родоспецифичный зонд содержал пару FAM/BNQ1, ВОК-специфичный зонд – JOE/BNQ1, ВЭ-специфичный зонд – Cy5/BNQ3 (таблица).

ПЦР в реальном времени. ПЦР-анализ с выщеплением 5'-концевой метки (TaqMan формат) проводили на приборе Real-Time PCR System 7500 (Applied Biosystems, USA). 25 мкл реакционной смеси содержало 2,5 мкл 10x TaqMan® Buffer A, 200 мкМ dNTP, 5 мМ MgCl₂, олигонуклеотидные праймеры (300 нМ каждого), гибридизационные зонды (250 нМ каждого), 0,5 ед. AmpliTaq Gold® DNA polymerase, и 1 мкл раствора анализируемой ДНК. ПЦР с измерением интенсивности флуоресценции проводили по следующему протоколу: 10 мин при 95 °С и далее 45 циклов по 15 с при 95 °С и 1 мин при 63 °С.

Результаты и обсуждение

Одним из вариантов решения проблемы надежной видоспецифичной детекции ВОК и отсутствия ложноотрицательных результатов является мультилокусный подход. В этом случае в каждом индивидуальном локусе ВОК-специфичные праймеры/зонд не обязательно должны детектировать все известные штаммы ВОК – достаточно добиться детекции каждого штамма хотя бы по одному–двум локусам. Такой подход значительно повысит количество подходящих видоспецифичных районов с учетом высокой гетерогенности и кластеризации по нескольким отдельным группам известных геномов ВОК [3].

Для многих ВОК-специфичных районов генома (не имеющих гомологии с геномами других патогенных для человека ортопоксвирусов) оказывается невозможным выбор олигонуклеотидов, не выявляющих ДНК ВЭ (непатогенный для человека ортопоксвирус). С точки зрения целевого предназначения разрабатываемого метода – анализ клинических образцов человека, отсутствие возможности дифференцировать ВОК от ВЭ не является недостатком, однако это необходимо учесть для расширения арсенала средств, подходящих для детекции ДНК ортопоксвирусов. Решение данной задачи может быть реализовано за счет одновременного использования ВЭ-специфичных и ВОК-специфичных олигонуклеотидов. Тогда при отсутствии ВЭ-специфичного сигнала и наличии сигнала для флуорофорного красителя, специфичного ВОК, можно будет идентифицировать образец как вирус оспы коров.

Альтернативно, для усиления надежности одновременно с ВОК-специфичными олигонуклеотидами целесообразно использовать родоспецифичную диагностику в одной пробирке. В таком случае, даже если будет получен ложноотрицательный результат по детекции ВОК, всегда будет идентифицирована ортопоксвирусная ДНК в образце за счет использования высококонсервативного района, и данный образец сможет быть охарактеризован последующим

Олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченные зонды для родоспецифичной детекции ортопоксвирусов и видоспецифичной детекции ВОК и ВЭ

Мишень	Название	Последовательность олигонуклеотидов, 5'-3'	Краситель / тушитель
ОПВ-С8Л	OPV_C8L_probe	TTCCGAATGAATGTTTCAATGGCC	FAM/BHQ1
	OPV_C8L_upper	GATAGTTTTTTTCATTACTATCTTTAACAT	
	OPV_C8L_lower	GGCTAGATGTTTCTACGGATTTC	
ВОК-D8Л	CPXV_D8L_probe	AAGTCATCTACTACATAGACCATGATCAACCAA	JOE/BHQ1
	CPXV_D8L_upper	GGTAGGTTTCATGTTGGAAAATATC	
	CPXV_D8L_lower	AAGATGTTATTAGTGGTATTAGAGAGAAAT	
ВОК-D11Л	CPXV_D11L_probe	CCACAATCAGGATCTGTAAAGCGAGC	JOE/BHQ1
	CPXV_D11L_upper	AAAACTCTCCACTTTCCATCTTCT	
	CPXV_D11L_upper2	GATCTTCTTTCAATGGTAGGATTATA	
	CPXV_D11L_lower	GCATTCAGATACGGATACTGATTC	
ВОК-K2R	CPXV_K2R_probe	CATCCATTCCTAATCATATTCCCACGTG	JOE/BHQ1
	CPXV_K2R_upper	GCGATCCTGGAATGTATAT	
	CPXV_K2R_lower	CTCTGTCCTGTGTGTACTA	
ВЭ-EVM001	ECTV_EVM001_probe	AATGCCGTACATTGGAGAGACGCTA	Cy5/BHQ3
	ECTV_EVM001_upper	CATGAGTGATGGCTGGAGATT	
	ECTV_EVM001_lower	AAACACAGTGAATGCTCGGTT	

секвенированием.

С учетом обобщения вышеобозначенных подходов был разработан мультиплексный вариант ПЦР в реальном времени (таблица) для одновременной родоспецифичной детекции на основе ОПТ C8Л, ВОК-специфичной детекции на основе ОПТ D8Л, D11Л [8] и K2R (рис. 1) и ВЭ-специфичной детекции на основе ОПТ EVM001 (рис. 2). Разработанный вариант ВЭ-специфичной детекции на основе уникального для ВЭ района позволит эффективно дифференцировать данный вирусный агент относительно штаммов ВОК. Следует отметить, что олигонуклеотиды к району ОПТ K2R являются более ВОК-специфичными в сравнении с методом на основе ОПТ D8Л за счет наличия двух нуклеотидных замен в области, комплементарной гибридационному зонду CPXV_K2R_probe, для ВЭ (рис. 1).

В состав гибридационных зондов включили различные флуоресцентные красители и тушители флуоресценции для возможности проведения ПЦР в мультиплексном формате: для ОПВ-специфичного

зонда – FAM/BHQ1, трех вариантов ВОК – JOE/BHQ1 и ВЭ – Cy5/BHQ3.

Последующий анализ на панели ДНК различных штаммов ортопоксвирусов, включая ВОК, ВНО, ВОО, ВОВ, ВЭ и ВОВр (суммарно, 68 штаммов) и других вирусных агентов, включая вирусы миксомы кроликов, оспы кур, ветряной оспы и простого герпеса I и II типов, показал абсолютную ВОК-специфичность и адекватность интерпретации полученных результатов.

В настоящее время предложенный комплексный подход для надежной детекции различных гетерогенных штаммов вируса оспы коров применяется в Сотрудничающем Центре ВОЗ по диагностике ортопоксвирусных инфекций и музее штаммов и ДНК вируса оспы при ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

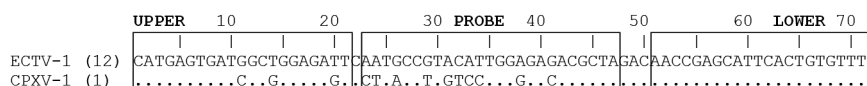


Рис. 1. Сравнение нуклеотидной последовательности ОПТ K2R ВОК штамм Ratrox09 с соответствующими районами геномов ортопоксвирусов. Элайнмент на основе 50 штаммов выполнен с помощью программы BioEdit Sequence Alignment Editor. Штаммы одного вида с полностью идентичными нуклеотидными последовательностями рассматриваемого сегмента представлены однократно с указанием в скобках количества таких штаммов. Идентичные нуклеотиды в сравниваемых последовательностях вирусных геномов по отношению к последовательности ОПТ K2R ВОК штамм Ratrox09 обозначены точками, делеции – прочерком. Рамками отмечены области, комплементарные олигонуклеотидным праймерам и гибридационному зонду для видоспецифичной детекции ДНК ВОК. Цифры сверху нуклеотидной последовательности обозначают положение нуклеотидов в анализируемом сегменте ДНК. Обозначения штаммов: CPXV-1 (KC813501.1, LN864566.1, LN864565.1, KC813512.1, KC813510.1, KC813508.1, KC813505.1, KC813503.1, HQ407377.1), CPXV-2 (KC813511.1, KC813507.1, KC813506.1, KC813495.1, KC813491.1, HQ420898.1, HQ420895.1), CPXV-3 (KC813504.1, KC813500.1, KC813498.1, KC813497.1, KC813492.1), CPXV-4 (HQ420900.1, HQ420899.1, HQ420896.1, AF482758.2, U87234.1), CPXV-5 (DQ437593.1, U87583.1, U87582.1), CPXV-6 (KC813499.1, HQ420894.1), CPXV-7 (HQ420897.1), CPXV-8 (KC813494.1), CPXV-9 (KC813493.1), CPXV-10 (U87581.1), CPXV-11 (HQ420893.1), CPXV-12 (X94355.2), ECTV-1 (KJ563295.1, KJ563295.1, JQ410350.1, JQ410350.1, AF012825.2, AF012825.2, AJ567693.1, AJ567692.1, AJ567688.1, U87580.1, U87579.1, U87578.1, U87235.1). UPPER, CPXV_K2R_upper; PROBE, CPXV_K2R_probe; LOWER, CPXV_K2R_lower

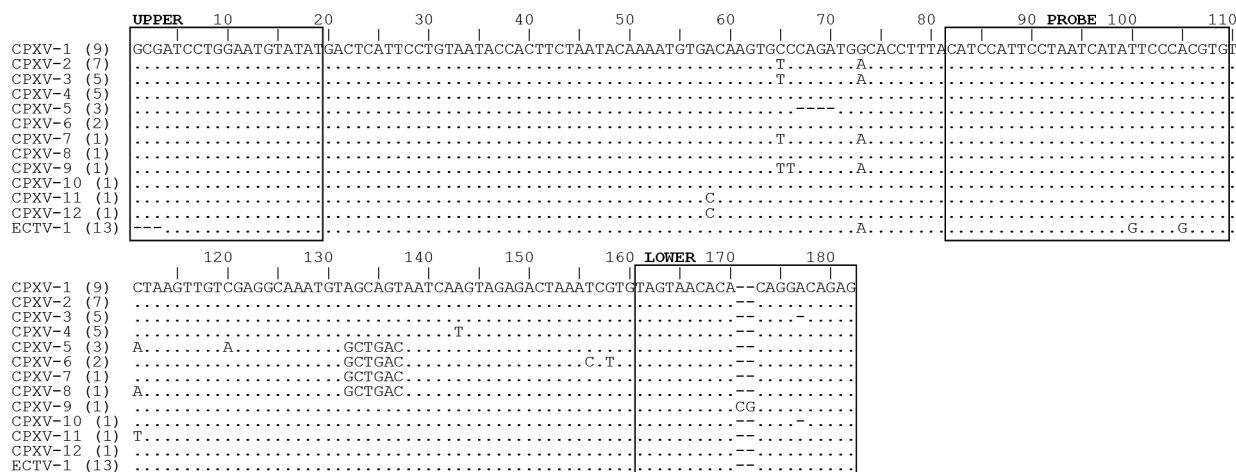


Рис. 2. Сравнение нуклеотидной последовательности ОПТ EVM001 ВЭ штамм Moscow с соответствующими районами геномов ортопоксвирусов. Элайнмент на основе 13 штаммов выполнен с помощью программы BioEdit Sequence Alignment Editor. Штаммы одного вида с полностью идентичными нуклеотидными последовательностями рассматриваемого сегмента представлены однократно с указанием в скобках количества таких штаммов. Идентичные нуклеотиды в сравниваемых последовательностях вирусных геномов по отношению к последовательности ОПТ EVM001 ВЭ штамм Moscow обозначены точками. Рамками отмечены области, комплементарные олигонуклеотидным праймерам и гибридизационному зонду для видоспецифичной детекции ДНК ВЭ. Цифры сверху нуклеотидной последовательности обозначают положение нуклеотидов в анализируемом сегменте ДНК. Обозначения штаммов: ECTV-1 (KJ563295.1, JQ410350.1, AF012825.2, KJ563295.1, JQ410350.1, AY102991.1, AY102989.1, AY102988.1, AY102987.1, AF012825.2, AJ277112.1, AJ277111.1), CPXV-1 (HQ407377.1). UPPER, ECTV_EVM001_upper; PROBE, ECTV_EVM001_probe; LOWER, ECTV_EVM001_lower.

REFERENCES / СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baxby D, Bennett M, Getty B. Human cowpox 1969-93: a review based on 54 cases. *Br. J. Dermatol.* 1994; 131(5):598-607.
2. Blackford S, Roberts D.L., Thomas P.D. Cowpox infection causing a generalized eruption in a patient with atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 1993; 129(5):628-9.
3. Carroll D.S., Emerson G.L., Li Y., Sammons S., Olson V., Frace M., Nakazawa Y., Czerny C.P., Tryland M., Kolodziejek J., Nowotny N., Olsen-Rasmussen M., Khristova M., Govil D., Karem K., Damon I.K., Meyer H. Chasing Jenner's vaccine: revisiting cowpox virus classification. *PLoS One.* 2011; 6(8):e23086. DOI: 10.1371/journal.pone.0023086.
4. Duraffour S., Mertens B., Meyer H., van den Oord J.J., Mitera T., Matthys P., Snoeck R., Andrei G. Emergence of cowpox: study of the virulence of clinical strains and evaluation of antivirals. *PLoS One.* 2013; 8(2):e55808. DOI: 10.1371/journal.pone.0055808.
5. Gavrilova E.V., Shcherbakov D.N., Maksyutov R.A., Shchelkunov S.N. Development of real-time PCR assay for detection of cowpox virus. *J. Clin. Virol.* 2010; 49:37-40. DOI: 10.1016/j.jcv.2010.06.003.
6. Hobi S., Mueller R.S., Hill M., Nitsche A., Löscher T., Guggemos W., Ständer S., Rjosk-Dendorfer D., Wollenberg A. Neurogenic inflammation and colliquative lymphadenitis with persistent orthopox virus DNA detection in a human case of cowpox virus infection transmitted by a domestic cat. *Br. J. Dermatol.* 2015; 173(2):535-9. DOI: 10.1111/bjd.13700.
7. Kinnunen P.M., Holopainen J.M., Hemmälä H., Piiparinen H., Sironen T., Kivelä T., Virtanen J., Niemimä J., Nikkari S., Järvinen A., Vapalahti O. Severe Ocular Cowpox in a Human, Finland. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(12):2261-3. DOI: 10.3201/eid2112.150621.
8. Maksyutov R.A., Gavrilova E.V., Meyer H., Shchelkunov S.N. Real-time PCR assay for specific detection of cowpox virus. *J. Virol. Methods.* 2015; 175:163-9.
9. Maksyutov R.A., Gavrilova E.V., Shchelkunov S.N. Species-specific differentiation of variola, monkeypox, and varicella-zoster viruses by multiplex real-time PCR assay. *J. Virol. Methods.* 2016; 236:215-20. DOI: 10.1016/j.jviromet.2016.07.024.
10. Ninove L., Domart Y., Vervel C., Salez N., Raoult D., Meyer H., Capek I., Zandotti C., Charrel R. Cowpox virus

transmission from pet rats to humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(5):781-4. DOI: 10.3201/eid1505.090235.

11. Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Lloyd Smith J.O., Kisalu N.K., Kinkela T.L., Blumberg S., Thomassen H.A., Pike B.L., Fair J.N., Wolfe N.D., Shongo R.L., Graham B.S., Formenty P., Okitolonda E., Hensley L.E., Meyer H., Wright L.L., Muyembe J.J. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107(37):16262-7. DOI: 10.1073/pnas.1005769107.

12. Shchelkunov S.N. An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog.* 2013; 9(12):e1003756. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003756.

13. Shchelkunov S.N., Shcherbakov D.N., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V. Species-specific identification of variola, monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses by multiplex real-time PCR assay. *J. Virol. Methods.* 2011; 175(2):163-9. DOI: 10.1016/j.jviromet.2011.05.002.

14. Silva-Fernandes A.T., Travassos C.E., Ferreira J.M., Abrahão J.S., Rocha E.S., Viana-Ferreira F., dos Santos J.R., Bonjardim C.A., Ferreira P.C., Kroon E.G. Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. *J. Clin. Virol.* 2009; 44(4):308-13. DOI: 10.1016/j.jcv.2009.01.007.

15. Vorou R.M., Papavassiliou V.G., Pierrotsakos I.N. Cowpox virus infection: an emerging health threat. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2008; 21(2):153-6. DOI: 10.1097/QCO.0b013e3282f44c74.

Authors:

Maksyutov R.A. State Research Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru

Об авторах:

Максютов Р.А. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: maksyutov_ra@vector.nsc.ru.

Поступила 03.08.16.

А.В.Никитина¹, В.Г.Помелова¹, Т.А.Быченкова¹, Д.В.Парамонов¹, Т.С.Кострюкова¹, Н.С.Осин²

ИММУНОЧИПЫ ДЛЯ ОДНОВРЕМЕННОГО ОБНАРУЖЕНИЯ ПЯТИ БОТУЛОТОКСИНОВ МЕТОДОМ ФОСФОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА (ФОСФАН)

¹ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения», Москва, Российская Федерация; ²ЗАО «Иммюноскрин», Москва, Российская Федерация

Цель работы. Разработать и сравнить по чувствительности тесты для одновременного обнаружения ботулотоксинов А, В, С, Е, F методом мультиплексного фосфоресцентного анализа (ФОСФАН) с применением стандартной (на основе Рt копропорфирина) и модифицированной (на основе биоспецифичных наночастиц) систем регистрации фосфоресцентного сигнала. **Материалы и методы.** Иммуноанализ по технологии ФОСФАН выполняли в лунках стандартного 96-луночного микропланшета. На дне каждой лунки были напечатаны в виде микропятен моноспецифические антитела и поливалентный иммуноглобулин. Диапазон анализируемых концентраций анатоксинов – от 100 до 0,005 нг/мл. Для проявления реакции использовали смесь конъюгированных с биотином моноспецифических и поливалентного иммуноглобулинов и детекторные системы на основе конъюгатов стрептавидина с Рt копропорфирином или полистироловыми наночастицами, содержащими хелат европия. Люминесценцию обоих метчиков регистрировали на биочип-анализаторе в режиме временного разрешения. Порог детекции определяли как минимальную концентрацию анатоксина, при которой отношение $P/N \geq 2$, а число таких проб (в серии из 10–30 экспериментов) не менее 50 %. **Результаты и выводы.** Разработанные иммуночипы обеспечивали группоспецифическое обнаружение пяти ботулотоксинов с возможностью типоспецифической идентификации ботулотоксинов А, В и Е. Перекрестные реакции между ботулотоксинами не выявлены. Применение фосфоресцентных наночастиц позволило повысить чувствительность детекции примерно на порядок до 10 пг/мл. Разработанные мультиплексные тесты можно рекомендовать для специфической индикации ботулотоксинов в клинических образцах, пробах из объектов окружающей среды или пищевых продуктов.

Ключевые слова: ботулотоксины типов А, В, С, Е, F, иммуночипы, мультиплексный фосфоресцентный анализ (ФОСФАН), биоспецифичные наночастицы, Рt копропорфирин, хелат Eu.

Корреспондирующий автор: Анна Викторовна Никитина, e-mail: an-na-nikitina@ya.ru.

A.V.Nikitina¹, V.G.Pomelova¹, T.A.Bychenkova¹, D.V.Paramonov¹, T.S.Kostryukova¹, N.S.Osin²

Microarray Immunoassay Tests for Simultaneous Detection of Five Botulinum Toxins by Phosphorescence Analysis (PHOSPHAN)

¹State Research Institute of Biological Instrument Engineering, Moscow, Russian Federation; ²CJSC “Immunoscreen”, Moscow, Russian Federation

Combination of multiplex microarray immunoassay tests and luminescent nanoparticle tags is considered as a promising approach to the development of highly sensitive, specific, and rapid methods of causative agent detection. **Objective** of this study was to develop and compare the sensitivity of the tests for simultaneous detection of five botulinic toxins (A,B,C,E,F) applying multiplex phosphorescence analysis (PHOSPHAN) using standard (Pt coproporphyrin tag-based) and modified (europium containing nanoparticles) systems of phosphorescent signal registration. **Materials and methods.** PHOSPHAN assay was performed in standard 96 well microplate. The toxoids added to the wells interacted with monospecific and polyvalent immunoglobulins printed as tiny spots on the bottom of each well, and with a mixture of the same antibodies conjugated to biotin. Analyzed anatoxin concentration range – 0.005 to 100 ng/ml. The reaction was manifested by streptavidin conjugated to either Pt coproporphyrin, or the luminescent nanoparticles. The luminescence of both tags was recorded in time-resolved mode by Biochip Analyzer. The limit of detection corresponded to a minimum toxoid concentration, at which the P/N ratio was equal or exceeded 2, while the number of such samples (in a series of 10-30 experiments) was no less than 50%. **Results and conclusions.** Both multiplex tests provided for simultaneous group-specific detection of five botulinum toxins with the option of type-specific (A, B, E) identification. No cross-reactivity was revealed. The use of phosphorescent nanoparticles allowed for the increase in detection sensitivity by an order of magnitude, up to 10 pg/ml. The tests developed could be recommended for specific detection and identification of botulinum toxins in clinical, environmental, and food samples.

Key words: botulinum toxin types A,B,C,E,F, microarray immunoassay tests, multiplex phosphorescence analysis (PHOSPHAN), biospecific nanoparticles, Pt coproporphyrin, Eu chelate.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Anna V. Nikitina, e-mail: an-na-nikitina@ya.ru.

Citation: Nikitina A.V., Pomelova V.G., Bychenkova T.A., Paramonov D.V., Kostryukova T.S., Osin N.S. Microarray Immunoassay Tests for Simultaneous Detection of Five Botulinum Toxins by Phosphorescence Analysis (PHOSPHAN). *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 4:64–68. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-64-68

Ботулинические нейротоксины относятся к числу наиболее опасных для человека бактериальных токсинов. Они продуцируются в анаэробных условиях грамположительной бактерией *Clostridium*

botulinum и являются причиной ботулизма – крайне тяжелого заболевания, характеризующегося поражением нервной системы. Известны семь иммунологически различающихся серотипов ботулотоксинов (БТ), обозначаемых латинскими буквами А-Г, среди которых БТА, БТВ и БТЕ чаще всего ответственны за развитие ботулизма у человека [12]. Ботулотоксины попадают в организм в основном при употреблении зараженных пищевых продуктов, не прошедших должной термической обработки, при загрязнении почвой открытой раны, а также при вдыхании аэрозоля, содержащего токсин. Помимо естественных путей заражения, возможно преднамеренное применение ботулотоксинов в террористических целях.

Ботулотоксины всех серотипов обладают сходной биологической активностью, вызывая нарушение транспорта синаптического пузырька с ацетилхолином и его высвобождение в синаптическую щель, что, в свою очередь, приводит к параличу мышц [11]. Поскольку эффективность лечения ботулизма зависит от количества токсина, попавшего в организм, и своевременности оказания медицинской помощи, то весьма актуальна разработка экспрессных, высокочувствительных и специфичных методов обнаружения.

В качестве «золотого стандарта» для лабораторного выявления ботулотоксинов рассматривается метод биопробы на белых мышах, обеспечивающий порог детекции (по БТА и БТВ) порядка 10–30 пг/мл [6, 13]. Его постановка, однако, может занимать до 72 ч. Другие методы (иммунохроматографический или иммуноферментный анализ, реакция пассивной гемагглютинации, молекулярные методы) более быстрые, но значительно менее чувствительные [4]. Достижение высоких показателей чувствительности и специфичности, а также сокращение времени и стоимости анализа возможно при использовании мультиплексных методов для одновременного обнаружения нескольких токсинов [8] и систем детекции на основе люминесцентных наночастиц [7].

В данной работе для создания мультиплексного теста применена отечественная биочип-технология фосфоресцентного анализа (ФОСФАН™) [1], эффективность которой для специфической индикации и диагностики ряда особо опасных инфекций была продемонстрирована ранее [2, 9]. Суть технологии состоит в выявлении аналитов с помощью длительно люминесцирующих (фосфоресцирующих) соединений в режиме временного разрешения люминесценции, которая регистрируется с поверхности микрозон (микроэрреев), напечатанных на дне лунок стандартных полистироловых микропланшетов. В качестве универсальной детектирующей системы используют стрептавидин, маркированный фосфоресцентной меткой – платинакопропорфирином (Pt КП). Перспективным новым метчиком для ФОСФАН могли бы оказаться полимерные наночастицы, содержащие хелатный комплекс ионов европия с нафтоилтрифторацетоном [7]. Разработка отечествен-

ной технологии синтеза таких частиц к настоящему времени завершена в ФГУП «ГосНИИБП».

Цель исследований – разработать и сравнить по чувствительности тесты для одновременного обнаружения ботулотоксинов А, В, С, Е, F методом ФОСФАН с применением стандартной (на основе Pt КП) и модифицированной (на основе биоспецифичных наночастиц) систем регистрации фосфоресцентного сигнала.

Материалы и методы

В работе использованы моноклональные антитела (МКА) к БТА, клоны БТА 232 и 111 (ООО «Импакт», Москва), поликлональные моноспецифические антитела к БТВ или БТЕ и поливалентный иммуноглобулин к ботулотоксинам А, В, С, Е, F (НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи, Москва). МКА БТА 232 и БТА 111 представляли собой иммуноглобулины (фракция IgG1), выделенные методом аффинной очистки на протеин G-сефарозе (степень очистки более 95 %) из иммунной асцитной жидкости мышей BALB/c, инокулированных гибридами одноименных клонов. Иммуноглобулины антитоксические противоботулинические моноспецифические (фракция IgG) типов В и С были получены из кроличьих антисывороток к гомогенным нейротоксинам типов В, штамм В₃₆₄ или С, штамм С₂₀ соответственно. Каждый из этих иммуноглобулинов проявляет специфическую нейтрализующую активность в отношении только гомологичного ботулотоксина (БТВ или БТС). Иммуноглобулин (IgG) антитоксический противоботулинический поливалентный типов А, В, С, Е, F получен из антисыворотки кролика, иммунизированного смесью очищенных анатоксинов типов А, В и гомогенных анатоксинов типов С, Е, F. Обладает нейтрализующей активностью в отношении пяти указанных типов ботулотоксинов.

На первом этапе иммуноанализа перечисленные выше иммуноглобулины (кроме клона БТА 111) использовались в качестве первичных (улавливающих) антител. Они были напечатаны в виде микрозон (диаметром 0,5 мм) на дне лунки стандартного 96-луночного полистиролового микропланшета (Nunc, Дания), по 4 микрозоны на каждый иммуноглобулин (всего 16 микрозон). Печать проведена с помощью наноплоттера для контактной печати (ЗАО «ИММУНОСКРИН», Москва). Концентрация антител для печати – 100 мкг/мл. Буфер для сорбции – 0,1 М КББ, pH 9,6, содержащий 5 % глицерина (Sigma, США). После инкубации в течение 1 сут при 2–8 °С и последующей трехкратной отмывки и блокировки (1 ч при 37 °С) сенсibilизированный микропланшет высушивали, помещали в пластиковый пакет и хранили до исследования в холодильнике.

Иммуноанализ по технологии ФОСФАН выполняли в лунках микропланшета. В каждую лунку вносили по 10 мкл конъюгированных с биотином ан-

Результаты выявления пяти ботулотоксинов методом ФОСФАН с применением стандартной (Pt КП) и модифицированной (НЧ-Eu) систем регистрации флуоресцентного сигнала

Выявляемый ботулотоксин	Значение P/N ¹⁾ в микрозонах для обнаружения ботулотоксинов типа:				Порог детекции, нг/мл, в микрозоне с иммуноглобулином:	
	A	B	E	A, B, C, E, F ²⁾	гомологичным	поливалентным
Система детекции на основе платина копропорфирина (Pt КП)						
A	41,4±12 ³⁾	0,9±0,3	1,5±0,3	33,5±4,0	1	5
B	1,7±0,4	77,9±12,2	1,2±0,7	48,7±15,1	0,25	1
E	1,5±0,3	1,5±0,4	39,8±7,8	19,9±4,7	1	5
C	1,6±0,1	1,4±0,1	1,4±0,1	6,7±0,4	- ⁴⁾	10
F	1,3±0,1	1,4±0,1	2,2±0,5	7,9±0,6	-	5
Система детекции на основе флуоресцентных наночастиц (НЧ-Eu)						
A	42,1±4,1	1,1±0,1	0,9±0,1	38,5±4,8	0,25	0,25
B	1,7±0,1	107±15,2	1,0±0,1	52,2±8,8	0,010	0,25
E	1,1±0,1	1,4±0,1	52,8±18,6	22,9±4,1	0,25	0,25
C	1,1±0,1	1,1±0,1	1,2±0,1	10,1±0,5	-	0,5
F	1,2±0,1	1,0±0,1	1,9±0,2	12,8±0,7	-	0,5

Примечания: ¹⁾ Для концентрации ботулотоксинов 100 нг/мл; ²⁾ Микрозона с поливалентным иммуноглобулином; ³⁾ Среднее значение P/N ± среднеквадратичное отклонение (из 8–10 повторных измерений); ⁴⁾ Не определяется в связи с отсутствием гомологичной микрозоны.

тител, представленных смесью МКА БТА 111, моноспецифических антител к БТВ и БТЕ, и поливалентного иммуноглобулина. Затем добавляли по 200 мкл одного из пяти БТ (анатоксинов) типов А, В, С, Е или F (НПО «Микроген», Уфа). Планшет инкубировали при комнатной температуре и встряхивании на шейкере в течение 90 мин. На этой стадии анализа выявляемый анатоксин образовывал иммунный комплекс с гомологичным и/или поливалентным иммуноглобулинами, сорбированными в соответствующих микрозонах на дне лунки планшета, и одновременно с гомологичным и/или поливалентным иммуноглобулинами, конъюгированными с биотином. Диапазон анализируемых концентраций анатоксинов от 100 до 0,005 нг/мл (разведения приготовлены на буфере – 0,1 М ТРИС, pH 7,7). После завершения стадии инкубации планшет трехкратно промывали буферным раствором.

Для выявления образовавшихся иммунных комплексов использовали две детекторные системы на основе стрептавидина, конъюгированного с Pt КП (стандартная система регистрации сигнала) или с полистироловыми наночастицами, содержащими инкорпорированный хелат ионов европия – НЧ-Eu (модифицированная система). Синтез биоспецифичных наночастиц проведен по технологии, разработанной специалистами ФГУП «ГосНИИБП». Конъюгаты стрептавидина с платина-копропорфирином (или с наночастицами) вносили по 30 мкл в каждую лунку. Микропланшет инкубировали при комнатной температуре и встряхивании на шейкере в течение 15 мин (при использовании Pt КП) или 120 мин (для НЧ-Eu), а затем трехкратно промывали буферным раствором и дополнительно 3 раза дистиллированной водой. После этого планшет высушивали на воздухе.

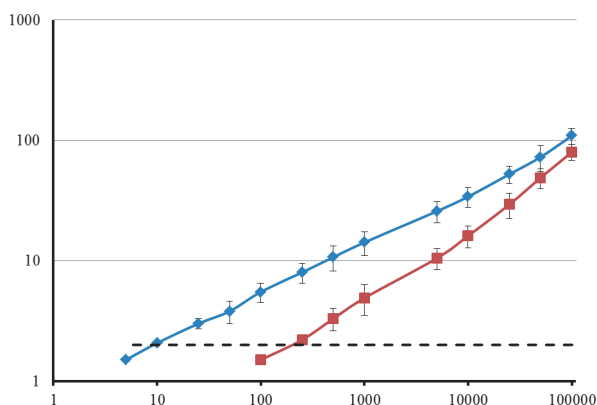
Люминесценцию обоих метчиков возбуждали на длине волны 365 нм и регистрировали на биочип-

анализаторе ИФИ-04 (ФГУП «ГосНИИБП») в режиме временного разрешения на длине волны 653 нм (для Pt КП) или 615 нм (для НЧ-Eu). Порог детекции определяли как минимальную концентрацию анатоксина, при которой интенсивность люминесценции пробы (Р) не менее чем в два раза превышала сигнал отрицательного контроля (N), а число проб со значением $P/N \geq 2$ (в серии из 10–30 экспериментов) составляло не менее 50 %.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены результаты детекции пяти ботулотоксинов методом ФОСФАН в разработанных мультиплексных тестах. Положительное «срабатывание» ($P/N \geq 2$) при выявлении БТА, БТВ или БТЕ регистрировали в микрозонах с гомологичным и поливалентным иммуноглобулинами, БТС и БТФ – только с поливалентным иммуноглобулином. Таким образом, положительный сигнал в зоне с поливалентным иммуноглобулином свидетельствовал о возможном наличии в исследуемой пробе любого из пяти БТ (или их смеси), из числа которых три токсина (БТА, БТВ и БТЕ) могли быть типированы на основе взаимодействия с соответствующей гомологичной микрозоной.

Перекрестные реакции между исследованными ботулотоксинами отсутствовали. Лишь при высокой концентрации (100 нг/мл) отмечено незначительное неспецифическое связывание БТФ с микрозоной для выявления БТЕ. Различия в чувствительности при взаимодействии с гомологичным и поливалентным иммуноглобулинами (для БТА, БТВ и БТЕ) наблюдали только в стандартной системе детекции. С флуоресцентными наночастицами этот эффект был выявлен лишь для БТВ, чувствительность обнаружения которого с гомологичным иммуноглобулином была



Кривые титрования ботулотоксина типа В (БТВ) методом ФОСФАН с системой регистрации сигнала на основе фосфоресцентных наночастиц (ромбы) или платина копропорфирина (квадраты):

Пунктирная линия соответствует пороговому уровню детекции ($P/N = 2$). Разведения приготовлены на буферном растворе. По оси абсцисс: концентрация БТВ, пг/мл, по оси ординат: отношение сигнал/фон (P/N), отн.ед.

наиболее высокой (табл. 1).

Порог детекции ботулотоксинов в модифицированной системе с использованием фосфоресцентных наночастиц был существенно (до 25 раз) ниже, чем в стандартной системе на основе Pt КП (табл. 1). Это обусловлено высокой излучательной способностью наночастиц, содержащих до 2000 молекул фосфоресцентной метки. Достигнутый уровень чувствительности (по БТВ) – 10 пг/мл соответствовал $8 \cdot 10^6$ молекул токсина в анализируемой пробе объемом 200 мкл (или $1,4 \cdot 10^{-13}$ М) и был сопоставим с чувствительностью биопробы.

Система детекции на основе Pt КП обеспечивала определение ботулотоксинов в 400-кратном диапазоне концентраций: от 0,25 до 100 нг/мл. Применение фосфоресцентных наночастиц позволило расширить этот диапазон в 25 раз: от 10 пг/мл до 100 нг/мл (рисунок, табл. 2). Верхний предел детекции мог быть существенно выше 100 нг/мл, но из соображений экономии биоматериала такие исследования не про-

водились.

При исследовании проб, загрязненных почвой или с высокой концентрацией соли, используемой в качестве консерванта, наблюдалось существенное снижение чувствительности ФОСФАН. Аналогичное негативное влияние отмечено при детекции БТ в молочных продуктах (табл. 2), что может быть обусловлено блокирующим действием присутствующих в молоке авидинов на процесс связывания биотинилированных антител со стрептавидином [5], покрывающим поверхность наночастиц. Несмотря на это, достигнутый с фосфоресцентными наночастицами уровень чувствительности был достаточен для надежного выявления БТ в концентрациях ниже летальной дозы, установленной для взрослого человека при оральной интоксикации [3, 10].

Продолжительность анализа на иммуночипе с использованием фосфоресцентных наночастиц составляла примерно 3,5 ч, что существенно превышало показатель для стандартной схемы регистрации сигнала (табл. 2). В дополнительных экспериментах, выполненных на «чистых» пробах, была исследована возможность уменьшения времени анализа за счет сокращения длительности стадии инкубации с анатоксином (с 90 мин до 60, 30 или 15 мин) и/или стадии связывания с наночастицами (со 120 мин до 90, 60 или 30 мин). Было установлено, что общая длительность иммуноанализа могла быть уменьшена (без потери чувствительности) до 90 мин за счет сокращения времени инкубации с анатоксином (до 30 мин) и с наночастицами (до 60 мин). Дальнейшее сокращение длительности указанных стадий приводило к снижению отношения P/N , а следовательно, и к потере чувствительности. Вопрос о возможности сокращения времени иммуноанализа требует, однако, дополнительного изучения на пробах, представляющих собой сыворотки крови и/или «грязные» пробы, содержащие разного рода примеси.

Таким образом, разработанные иммуночипы обеспечивают одновременное группоспецифическое об-

Таблица 2

Аналитические характеристики иммуночипов для детекции ботулотоксинов методом ФОСФАН

Показатели	Система регистрации сигнала на основе	
	Pt КП	НЧ-Eu
Выявляемые токсины	БТА, БТВ, БТЕ, БТС, БТГ	
Время анализа (без пробоподготовки)	1 ч 45 мин	3,5 ч ¹⁾
Динамический диапазон, нг/мл	от 0,25–1 до 100	от 0,01–0,25 до 100
Уровень фоновой люминесценции, имп.	20–40	150–350
Порог детекции (на модели БТВ):		
в буферном растворе	0,25 нг/мл	10 пг/мл
в пробах, содержащих примеси почвы	10 нг/мл	50 пг/мл
в пробах, содержащих соль	10 нг/мл	100 пг/мл
в сыворотке крови человека	5 нг/мл	100 пг/мл
в пищевых продуктах (кроме молока)	Не исследовали	10–250 пг/мл
в молоке и молочных продуктах	Не исследовали	500 пг/мл

Примечание. ¹⁾ Может быть сокращено до 90 мин без потери чувствительности.

нарушение пяти ботулотоксинов методом ФОСФАН с возможностью типоспецифической идентификации ботулотоксинов типов А, В и Е. Применение модифицированной системы регистрации сигнала на основе фосфоресцентных наночастиц позволяет повысить чувствительность детекции примерно на порядок по сравнению со стандартным подходом с использованием фосфоресцентного метчика Рт копропорфирина. Благодаря высокой чувствительности и специфичности, разработанные мультиплексные тесты можно рекомендовать для проведения специфической индикации ботулотоксинов в клинических образцах (сыворотка крови), пробах из объектов окружающей среды или пищевых продуктов.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Осин Н.С., Помелова В.Г., Соколов А.С., Быченкова Т.А., Бекман Н.И., Шарафудинова Т.Ю., Аслиян С.К., Ивановская Н.П., Ларичева С.Ю., Канаева Т.А. Фосфоресцентный микроанализ как новая технологическая платформа для молекулярной диагностики. *Вестник РАМН*. 2007; 12:3–10.
- Помелова В.Г., Быченкова Т.А., Осин Н.С. Иммуночип на основе микропланшетной технологии ФОСФАН для определения иммуноглобулинов G к вирусам Западного Нила, Крымской-Конго геморрагической лихорадки и клещевого энцефалита. *Пробл. особо опасных инф.* 2009; 3(101):54–8.
- Arnon S.S., Schechter R., Inglesby T.V., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S., Eitzen E., Fine A.D., Hauer J., Layton M., Lillibridge S., Osterholm M.T., O'Toole T., Parker G., Perl T.M., Russell P.K., Swerdlow D.L., Tonat K.; Working Group on Civilian Biodefense. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA*. 2001; 285(8):059–70.
- Capek P., Dickerson T.J. Sensing the Deadliest Toxin: Technologies for Botulinum Neurotoxin Detection. *Toxins*. 2010; 2:24–53; DOI: 10.3390/toxins2010024.
- Doellgast G. J., Triscott M. X., Beard G. A., Bottoms J. D., Cheng T., Roh B. H., Roman M. G., Hall P. A., Brown E. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins A, B, and E using signal amplification via enzyme-linked coagulation assay. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31:2402–9.
- Ferreira J. L., Eliasberg S. J., Edmonds P., Harrison M. A. Comparison of the mouse bioassay and enzyme-linked immunosorbent assay procedures for the detection of type A botulinum toxin in food. *J. Food Prot.* 2004; 67(1):203–6.
- Jaras K., Tajudin A.A., Ressine A., Soukka T., Marko-Varga G., Bjartell A., Malm J., Laurell T., Lilja H. Europium nanoparticles for signal enhancement of antibody microarrays on nanoporous silicon. *J. Proteome Res.* 2008; 7:1308–14; DOI: 10.1021/pr700591j.
- Jenke K.L., Zhang Y., Kostenko Y., Fan Y., Garcia-Rodriguez C., Lou J., Marks J.D., Varnum S.M. Development of an ELISA microarray assay for the sensitive and simultaneous detection of ten biodefense toxins. *Analyst*. 2014; 139:5093–102; DOI: 10.1039/c4an01270d.
- Osin N.S., Pomelova V.G. Microarray immunophosphorescence technology for the detection of infectious pathogens. In: National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH. *Frontiers in Research. Humana Press*; 2008. P. 233–40. DOI: 10.1007/978-1-59745-569-5_25.
- Scarlato A., Welt B. A., Cooper B.Y., Archer D., DeMarse T., Chau K.V. Methods for detecting botulinum toxin with applicability to screening foods against biological terrorist attacks. *J. of Food Science*. 2005; 70(8):121–30; DOI: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb11525.x.
- Schiavo G., Matteoli M., Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol. Rev.* 2000; 80:717–66.
- Sharma S.K., Ferreira J.L., Eblen B.S., Whiting R.C. Detection of type A, B, E, and F *Clostridium botulinum* neurotoxins in foods by using an amplified enzyme-linked immunosorbent assay with digoxigenin-labeled antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72(2):1231–8. DOI: 10.1128/AEM.72.2.1231-1238.2006.
- Wictome M. W., Newton K., Jameson K., Hallis B., Dunnigan P., Mackay E., Clarke S., Taylor R., Gaze J., Foster K., Shone C. C. Development of an in vitro bioassay for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in foods that is more sensitive than the mouse bioassay. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65(9):3787–92.

References

- Osin N.S., Pomelova V.G., Sokolov A.S., Bychenkova T.A., Bekman N.I., Sharafudinova T.Yu., Asliyan S.K., Ivanovskaya N.P., Laricheva S.Yu., Kanaeva T.A. [Phosphorescent microarray as a basis for novel technological platform for molecular diagnostics]. *RAMS Bulletin*. 2007; 12:3–10.
- Pomelova V.G., Bychenkova T.A., Ossin N.S. [PHOSPHAN microplate technology-based microarray for detection of IgG antibodies against West Nile, Crimean-Congo hemorrhagic fever and tick-borne encephalitis viruses]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2009; 3(101):54–8.
- Arnon S.S., Schechter R., Inglesby T.V., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S., Eitzen E., Fine A.D., Hauer J., Layton M., Lillibridge S., Osterholm M.T., O'Toole T., Parker G., Perl T.M., Russell P.K., Swerdlow D.L., Tonat K.; Working Group on Civilian Biodefense. Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA*. 2001; 285(8):059–70.
- Capek P., Dickerson T.J. Sensing the Deadliest Toxin: Technologies for Botulinum Neurotoxin Detection. *Toxins*. 2010; 2:24–53; DOI: 10.3390/toxins2010024.
- Doellgast G. J., Triscott M. X., Beard G. A., Bottoms J. D., Cheng T., Roh B. H., Roman M. G., Hall P. A., Brown E. Sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Clostridium botulinum* neurotoxins A, B, and E using signal amplification via enzyme-linked coagulation assay. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31:2402–9.
- Ferreira J. L., Eliasberg S. J., Edmonds P., Harrison M. A. Comparison of the mouse bioassay and enzyme-linked immunosorbent assay procedures for the detection of type A botulinum toxin in food. *J. Food Prot.* 2004; 67(1):203–6.
- Jaras K., Tajudin A.A., Ressine A., Soukka T., Marko-Varga G., Bjartell A., Malm J., Laurell T., Lilja H. Europium nanoparticles for signal enhancement of antibody microarrays on nanoporous silicon. *J. Proteome Res.* 2008; 7:1308–14; DOI: 10.1021/pr700591j.
- Jenke K.L., Zhang Y., Kostenko Y., Fan Y., Garcia-Rodriguez C., Lou J., Marks J.D., Varnum S.M. Development of an ELISA microarray assay for the sensitive and simultaneous detection of ten biodefense toxins. *Analyst*. 2014; 139:5093–102; DOI: 10.1039/c4an01270d.
- Osin N.S., Pomelova V.G. Microarray immunophosphorescence technology for the detection of infectious pathogens. In: National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH. *Frontiers in Research. Humana Press*; 2008. P. 233–40. DOI: 10.1007/978-1-59745-569-5_25.
- Scarlato A., Welt B. A., Cooper B.Y., Archer D., DeMarse T., Chau K.V. Methods for detecting botulinum toxin with applicability to screening foods against biological terrorist attacks. *J. of Food Science*. 2005; 70(8):121–30; DOI: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb11525.x.
- Schiavo G., Matteoli M., Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol. Rev.* 2000; 80:717–66.
- Sharma S.K., Ferreira J.L., Eblen B.S., Whiting R.C. Detection of type A, B, E, and F *Clostridium botulinum* neurotoxins in foods by using an amplified enzyme-linked immunosorbent assay with digoxigenin-labeled antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72(2):1231–8. DOI: 10.1128/AEM.72.2.1231-1238.2006.
- Wictome M. W., Newton K., Jameson K., Hallis B., Dunnigan P., Mackay E., Clarke S., Taylor R., Gaze J., Foster K., Shone C. C. Development of an in vitro bioassay for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in foods that is more sensitive than the mouse bioassay. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999; 65(9):3787–92.

Authors:

Nikitina A.V., Pomelova V.G., Bychenkova T.A., Paramonov D.V., Kostryukova T.S. State Research Institute of Biological Instrument Engineering. 75/1, Volokolamskoe Highway, Moscow, 125424, Russian Federation. E-mail: an-na-nikitina@ya.ru.

Osin N.S. CJSC "Immunoscreen". 75/1, Volokolamskoe Highway, Moscow, 125424, Russian Federation.

Об авторах:

Никитина А.В., Помелова В.Г., Быченкова Т.А., Парамонов Д.В., Кострюкова Т.С. Государственный научно-исследовательский институт биологического приборостроения. Российская Федерация, 125424, Москва, Волоколамское шоссе, 75/1. E-mail: an-na-nikitina@ya.ru.

Осин Н.С. ЗАО «Иммюноскрин». Российская Федерация, 125424, Москва, Волоколамское шоссе, 75/1.

Поступила 04.10.16.

Н.А.Осина, Ж.А.Касьян, И.А.Касьян, О.Ю.Ляшова, А.В.Осин

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИДОВОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ШТАММОВ БРУЦЕЛЛ ИЗ ФОНДА ГОСУДАРСТВЕННОЙ КОЛЛЕКЦИИ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ «МИКРОБ» С ПОМОЩЬЮ АМПЛИФИКАЦИОННЫХ И РЕСТРИКЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

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

Цель работы. Определение таксономического положения штаммов *Brucella* spp. с использованием комплекса амплификационных и рестрикционных методов. **Материалы и методы.** Проведено уточнение видовой принадлежности 17 типовых и 48 природных штаммов из фонда Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» с использованием амплификационного («Ген *Brucella* – идентификация – РГФ», AMOS-DEL, Bruce-Ladder, Suis-Ladder) и рестрикционного анализа *omp25*, *omp2a*, *omp2b* локусов с помощью ферментов *AluI*, *EcoRI*, *Eco32I* (*EcoRV*). **Результаты и выводы.** В ходе проведенной молекулярной идентификации у 50 штаммов бруцелл подтверждено таксономическое положение, указанное в паспорте штамма, у 12 культур уточнена видовая принадлежность. Для трех штаммов бруцелл установлены новые профили амплификации и рестрикции, что указывает на необходимость продолжения исследований. Полученные результаты в полной мере подтверждают перспективность применения комплексного подхода с использованием нескольких амплификационных систем и препаратов и рестрикционного анализа для определения видовой принадлежности штаммов к виду и биовару возбудителя бруцеллеза.

Ключевые слова: бруцеллы, идентификация, таксономическое положение, амплификационные системы, рестрикционный анализ.

Корреспондирующий автор: Наталия Александровна Осина, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

N.A.Osina, Zh.A.Kas'yan, I.A.Kas'yan, O.Yu.Lyashova, A.V.Osin

Determination of Specific Appurtenance of *Brucella* Strains Stored in the State Collection of Pathogenic Bacteria "Microbe", Using Amplification and Restriction Techniques

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

Objective of the study is to identify species appurtenance of *Brucella* spp. strains, using a complex of restriction and amplification techniques. **Materials and methods.** Carried out has been revision and clarification of species appurtenance of 17 reference and 48 natural strains, stored in the biobank of the State collection at the RusRAPI "Microbe", using amplification ("Gen *Brucella* – identification – RGF", AMOS-DEL, Bruce-Ladder, Suis-Ladder) and restriction analyses of *omp25*, *omp2a*, *omp2b* loci, applying *AluI*, *EcoRI*, *Eco32I* (*EcoRV*) ferments. **Results and conclusions.** Performed molecular identification has confirmed the stated in the profile taxonomic status of 50 *Brucella* strains, while for 12 isolates species appurtenance has been rectified. New profiles of amplification and restriction have been established for three cultures, which outlines the necessity to continue further investigations. The results obtained fully substantiate the prospects of the complex approach, which implies several amplification systems and preparations, as well as restriction analysis for determination of species and biovar of brucellosis agent strains.

Key words: *Brucella*, identification, taxonomic status, amplification systems, restriction analysis.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Natalya A. Osina, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Osina N.A., Kas'yan Zh.A., Kas'yan I.A., Lyashova O.Yu., Osin A.V. Determination of Specific Appurtenance of *Brucella* Strains Stored in the State Collection of Pathogenic Bacteria "Microbe", Using Amplification and Restriction Techniques. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 4:69–74. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-69-74

Бруцеллез является особо опасным и социально значимым инфекционным заболеванием, которое обуславливает высокий уровень инвалидизации больных, а также наносит значительный экономический ущерб. На сегодняшний день известно 11 видов бруцелл. В Российской Федерации зарегистрирована циркуляция 6 видов, из которых в заражении человека и животных основную роль играют виды *B. abortus* и *B. melitensis*. Идентификация возбудителя бруцеллеза до сих пор остается серьезной проблемой лабораторной диагностики.

Определение видовой принадлежности бруцелл с использованием традиционной схемы предусма-

тривает изучение роста штаммов в атмосфере с избыточным содержанием углекислоты и на средах, содержащих фуксин и тионин, образования сероводорода и наличия дезаминазной активности, агглютинабельности моноспецифическими (А-, М-, R-) сыворотками, чувствительности к бруцеллезным бактериофагам Tb (Тбилиси), Wb (Weybridge), Fi (Firenze), Bk2 (Berkley). Выполнение таких исследований трудоемко, продолжительно и не позволяет дифференцировать все основные виды бруцелл. Часть штаммов возбудителя бруцеллеза, находящаяся в фонде Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» была полу-

чена в 1923–1966 гг., когда определение их видовой принадлежности зачастую основывалось на источнике выделения патогена. В связи с этим представляет интерес исследование штаммов *Brucella* spp. с помощью современных методов лабораторной диагностики. В настоящее время все более широкое применение получают молекулярно-генетические методы исследования, такие как ПЦР и ее модификации.

За последние годы зарубежными и отечественными авторами накоплен положительный опыт по применению полимеразной цепной реакции (ПЦР) для идентификации *Brucella* spp. Одним из первых способов, разработанных с этой целью, являлась система AMOS, предложенная Bricker и соавт. в 1994 г., и позволяющая определять *B. abortus* 1, 2-го и 4-го биоваров, *B. melitensis* всех биоваров, *B. suis* 1-го биовара [2]. Позднее эта система была модифицирована (AMOS-DEL), что позволило дополнительно идентифицировать штаммы *B. abortus* 3, 5, 6-го и 9-го биоваров [4]. Однако, несмотря на то, что данный подход получил широкое применение, с его помощью невозможно определить ряд видов и биоваров бруцелл.

Одной из референтных методик по определению видовой принадлежности бруцелл в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения животных является Bruce-Ladder [5]. Предложенный способ обеспечивает идентификацию видов *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae*, *B. ceti/B. pinnipedialis*, а также дифференциацию ряда вакцинных штаммов: *B. abortus* S19, *B. abortus* RB51, *B. melitensis* Rev1. Однако с помощью данной методики не представлялось возможным точное определение таксонов *B. canis* и *B. suis*, вследствие близких амплификационных профилей, наблюдающихся у ряда штаммов этих видов. Позднее, практически от той же группы авторов, была предложена система Suis-Ladder, обеспечивающая идентификацию всех биоваров *B. suis*, а также видов *B. canis* и *B. microti* [6].

Ранее нами был разработан и зарегистрирован набор реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ», позволяющий дифференцировать виды или группы видов бруцелл: *B. abortus/B. ovis*; *B. melitensis*; *B. suis/B. canis*; *B. neotomae* методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени, эффективность которого подтверждена при выявлении и ускоренной идентификации бруцелл в материале от животных [1].

A.Cloeckaert *et al.* [3] показана возможность определения некоторых видов и биоваров бруцелл на основании рестрикции генов *omp25*, *omp2a*, *omp2b*.

Несмотря на очевидную перспективность применения молекулярно-генетических методов для идентификации бруцелл, все обозначенные выше приемы и тест-системы не позволяют в полной мере дифференцировать виды *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis*, *B. ovis*, *B. neotomae* с учетом их биоварной принадлежности. Одним из способов в ре-

шении данного вопроса может быть использование представленных подходов в совокупности.

Целью исследования было определение таксономического положения штаммов *Brucella* spp. из фонда Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» с использованием комплекса амплификационных и рестрикционных

Материалы и методы

Всего в исследовании использовано 17 типовых и 48 природных штаммов.

Культуры выращивали на эритроцит-агаре (НИИ им. Мечникова, Москва), pH 7,2, при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48 ч. Из выросших культур готовили суспензии в 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида по отраслевому стандартному образцу мутности 10 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-85-П (10 МЕ)), что соответствовало $1,6 \cdot 10^9$ м.к./мл для возбудителя бруцеллеза. Для обеззараживания проб к ним добавляли мертиолят натрия до конечной концентрации 1:10000 (0,01 %), прогревали при 56°C в течение 30 мин, с последующим смешиванием 100 мкл полученной суспензии с лизирующим буфером на основе 6 моль гуанидинизотиоцианата в объеме, указанном в инструкции к набору для выделения ДНК, и инкубированием 15 мин при температуре $(65 \pm 1)^\circ\text{C}$. Выделение ДНК осуществляли с помощью наборов «АмплиПраймДНК-сорб В» («ООО ИнтерЛабСервис», Россия) и «PureLink™ Mini» (Invitrogen, США). Работу проводили в соответствии с инструкциями к препаратам.

Постановку ПЦР с системой AMOS-DEL осуществляли в соответствии с рекомендациями авторов [4] с некоторыми модификациями. Реакционная смесь содержала праймеры PBa, PBm, PBo, Del 569 концентрации 6 пМоль, праймер PIS711 – 25 пМоль, ионов Mg^{2+} – 1,5 мМоль, дНТФ – 0,2 мМоль, фермента SynTaq-ДНК полимеразы (ЗАО «Синтол») – 2 ед. Концентрация ДНК препаратов бруцелл была не менее 1 нг/мкл. Программа амплификации включала прогревание при: 95°C – 10 мин; 30 циклов: 94°C – 30 с, 60°C – 30 с, 72°C – 2 мин; 72°C – 5 мин.

Анализ с системой Bruce-Ladder проводили в соответствии с рекомендациями авторов [5]. Реакционная смесь содержала праймеры в концентрации 6 пМоль каждого, ионов Mg^{2+} – 3 мМоль, дНТФ – 0,2 мМоль, фермента SynTaq-ДНК полимеразы (ЗАО «Синтол») – 2 ед. Концентрация ДНК препаратов бруцелл была не менее 10 нг/мкл. Программа амплификации включала прогревание при: 95°C – 5 мин; 25 циклов: 95°C – 30 с, 64°C – 45 с, 72°C – 3 мин; 72°C – 10 мин.

Для определения биоваров *B. suis* использовали систему Suis-Ladder [6]. Реакционная смесь содержала праймеры в концентрации 6 пМоль каждого, ионов Mg^{2+} – 2 мМоль, дНТФ – 0,2 мМоль, фермента SynTaq-ДНК полимеразы (ЗАО «Синтол») – 1 ед. Концентрация ДНК препаратов бруцелл была не ме-

нее 1 нг/мкл. Программа амплификации включала прогревание при: 95 °С – 7 мин; 30 циклов: 95 °С – 35 с, 63 °С – 45 с, 72 °С – 60 с.; 72 °С – 6 мин.

Проведение реакции с набором реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ» осуществляли в соответствии с инструкцией к препарату.

Постановку ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов осуществляли на приборе RotorGeneQ («Qiagen», Германия), а с электрофоретической детекцией – на амплификаторе Mastercycler Nexus (Eppendorf, Германия). Электрофорез проводили в 2 % агарозном геле, в случае учета результатов, с системами Bruce-Ladder и Suis-Ladder в 3 % агарозном геле NuSieve™ 3:1 (Lonza) при рестрикционном анализе. В качестве маркера молекулярных масс использовали GeneRuler Express DNA Ladder (Fermentas).

Рестрикцию проводили с использованием эндонуклеаз для ускоренного гидролиза ДНК: FastDigest *AluI*, *EcoRI*, *Eco32I* (*EcoRV*). Работу осуществляли в соответствии с инструкциями к препаратам.

Результаты и обсуждения

В основе системы AMOS-DEL лежит определение расположения в геноме патогена последовательности *IS711* элемента. При ее использовании у культур, относящихся к *B. abortus* 1, 2-го и 4-го биоваров наблюдается образование ампликона размером 498 п.н., к *B. abortus* 3b 5, 6, 9-го биоваров – 1700 п.н., к *B. melitensis* – 731 п.н., к *B. ovis* – 976 п.н., к *B. suis* 1-го биовара – 268 п.н. [4].

Система Bruce-Ladder направлена на амплификацию фрагментов генов *wboA*, *bp26*, *omp31*, *eryC*, участка нуклеотидной последовательности рибосомального белка *gplL* гена, транскрипционного регулятора *CRP*, гена *ABC Transporter* в разной степени встречающихся у видов бруцелл. При выполнении анализа с помощью данного подхода для штаммов *B. abortus* характерно образование ампликонов размером 1682/794/587/450/152 п.н., *B. melitensis* – 1682/1071/794/587/450/152 п.н., *B. suis* – 1682/1071/794/587/450/272/152 п.н., *B. canis* – 1682/1071/587/450/272/152 п.н., *B. ovis* – 1071/794/587/450/152 п.н., *B. neotomae* – 1682/1071/578/450/272 п.н. [5].

Определение биоваров *B. suis* при использовании метода Suis-Ladder также основано на наличии амплификации фрагментов различного размера: *B. suis* биовар 1 – 774/425/197 п.н., *B. suis* биовар 2 – 774/551/278 п.н., *B. suis* биовар 3 – 774/299/197 п.н., *B. suis* биовар 4 – 774/614/197 п.н., *B. suis* биовар 5 – 774/614/278/197 п.н. [6]. С системой Suis-Ladder также возможна идентификация представителей вида *B. canis* по образованию ампликонов размером 614 и 197 п.н., вида *B. microti* – 774 и 197 п.н.

Для проведения рестрикционного анализа нами были взяты ферменты, оказавшиеся, по данным A.Cloeckaert *et al.* [3], наиболее информативными для видовой дифференциации штаммов бруцелл *EcoRV*,

EcoRI, *AluI*. Для штаммов *B. ovis* характерен уникальный профиль рестрикции фрагмента локусов *omp25* с помощью фермента *EcoRV*, *omp2a* и *omp2b* – *AluI*. Культуры *B. neotomae* имеют специфичный только для них профиль рестрикции фрагмента гена *omp2a* ферментом *AluI*, *B. abortus* 1, 2, 4-го биоваров – гена *omp2a* ферментами *EcoRI* и *AluI*. Фрагмент локуса *omp25* у штаммов *B. melitensis* не подвергается гидролизу рестриктазой *EcoRV*.

Для оценки эффективности выбранных амплификационных и рестрикционных подходов при идентификации штаммов бруцелл на первом этапе нашей работы были исследованы типовые штаммы *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. canis* и *B. neotomae* с учетом биоварной принадлежности. Поскольку в коллекции не было типового штамма *B. ovis*, для анализа выбрано несколько природных штаммов данного вида.

Практически все проанализированные штаммы показали результаты, характерные для своего вида и биовара, что в полной мере подтверждает их таксономическое положение, указанное в паспорте (табл. 1).

Однако при исследовании культуры *B. abortus* 292 не подтверждена ее принадлежность к 4-му биовару данного вида. На это указывают полученные профили рестрикции фрагмента гена *omp2a* ферментами *EcoRI* и *AluI* и данные анализа с системой AMOS-DEL. Штамм *B. abortus* 63/75 7 биовара, который ранее не был изучен с помощью способа AMOS-DEL [4], имел амплификационный профиль, характерный для *B. abortus* 3b, 5, 6, 9-го биоваров. Помимо этого, культура *B. ovis* 2000 идентифицирована как *B. abortus* 3b, 5, 6, 9-го биоваров. Принадлежность к виду *B. abortus* подтверждают результаты всех использованных амплификационных и рестрикционных технологий. В то же время таксономическое положение взятых для исследования культур *B. ovis* 25-90 и И-107 не вызывает сомнения. При изучении штаммов *B. suis* 1330, Thomsen, 686, 40, 513 с помощью системы Suis-ladder в полной мере подтверждена их биоварная принадлежность: 1, 2, 3, 4-й и 5-й биовар соответственно.

Основываясь на полученных результатах, мы продолжили исследования на 48 природных штаммах бруцелл из фонда коллекции, выделенных в 1932–2014 гг. из различных источников. Результаты анализа представлены в табл. 2.

Из 10 исследованных штаммов *B. abortus*, по данным всех использованных подходов, 6 изолятов (А-81, С-442, 1271, 164-70, И-199, 1552) идентифицированы как *B. abortus* 3b, 5 6-го и 9-го биоваров, и один (339) как *B. melitensis*.

У штамма *B. abortus* 290 в ПЦР с системой AMOS-DEL наблюдалось образование двух фрагментов 1700 и 498 п.н., характерных разных биоваров *B. abortus* 3b, 5, 6, 9-го и 1, 2, 4-го биоваров соответственно. В профиле амплификации с системой Bruce-Ladder у культуры *B. abortus* 3143-П от-

Результаты идентификации типовых штаммов разных видов бруцелл с использованием амплификационных систем и рестрикционного анализа

Название штамма, таксономическое положение в соответствии с паспортом	Результаты исследования								Результаты идентификации на основании проведенного анализа
	Амплификационные системы				Рестрикция				
	Набор реагентов «Brucella- иденти- фикация – РГФ»	AMOS-Del-	Bruce-ladder	Suis- Ladder	EcoRV/ omp25	EcoRI/ omp2a	AluI/ omp2a	AluI/ omp2b	
<i>B. abortus</i> 544 ATCC 23448 1 bv	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	<i>B. abortus</i> (1, 2, 4 bv)	<i>B. abortus</i>	н/и	P1	P1	P1	P1	<i>B. abortus</i> (1, 2, 4 bv)
<i>B. abortus</i> Tulya ATCC 23450 3 bv <i>B. abortus</i> B-3196 ATCC 23452 5 bv <i>B. abortus</i> 870 ATCC 23453 6 bv <i>B. abortus</i> C-68 ATCC 23455 9 bv	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)	<i>B. abortus</i>	н/и	P1	P2	P2	P1	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)
<i>B. abortus</i> 292 ATCC 23451 4 bv	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)	<i>B. abortus</i>	н/и	P1	P2	P2	P1	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)
<i>B. abortus</i> 63/75 ATCC 23454 7 bv	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)	<i>B. abortus</i>	н/и	P1	P2	P2	P1	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)
<i>B. melitensis</i> 16M ATCC 23456 1 bv <i>B. melitensis</i> 63/9 ATCC 234579 2 bv <i>B. melitensis</i> 706 ATCC 234593 3 bv	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	н/и	NR	P2	P2	P1	<i>B. melitensis</i>
<i>B. suis</i> 1330 ATCC 23444 1 bv	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	<i>B. suis</i> 1 bv	<i>B. suis</i>	1 bv	P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i> 1 bv
<i>B. suis</i> Thomsen ATCC 23445 2 bv	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	NEG	<i>B. suis</i>	2 bv	P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i> 2 bv
<i>B. suis</i> 686 ATCC 23446 3 bv	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	NEG	<i>B. suis</i>	3 bv	P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i> 3 bv
<i>B. suis</i> 40 ATCC 23447 4 bv	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	NEG	<i>B. suis</i>	4 bv	P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i> 4 bv
<i>B. suis</i> 513 BCCN R21 5 bv	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	NEG	<i>B. suis</i>	5 bv	P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i> 5 bv
<i>B. canis</i> RM 6/66 ATCC 23365	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	NEG	<i>B. canis</i>	<i>B. canis</i>	P1	P2	P2	P1	<i>B. canis</i>
<i>B. neotomae</i> 5k33 ATCC 23459	<i>B. neotomae</i>	NEG	<i>B. neotomae</i>	н/и	P1	P2	P4	P1	<i>B. neotomae</i>
<i>B. ovis</i> 2000	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)	<i>B. abortus</i>	н/и	P1	P2	P2	P1	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)
<i>B. ovis</i> 25-90, И-107	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	<i>B. ovis</i>	<i>B. ovis</i>	н/и	P2	P2	P3	P2	<i>B. ovis</i>

существовал фрагмент размером 1682 п.н., который должен амплифицироваться у представителей данного вида. Несмотря на атипичные результаты по одному из использованных методов, по совокупности результатов данные штаммы все же относятся к виду *B. abortus*, но имеют некоторые генетические перестройки.

Особый интерес представляют результаты идентификации штамма *B. abortus* C-549, выделенного от мышевидных грызунов в Австралии в 1980 г. При исследовании с помощью набора реагентов «Ген *Brucella* – идентификация – РГФ» получен новый профиль амплификации (*BRA0541*⁺, *BR0262*⁺, *BMEI0711*⁺), который не соответствовал ни одному из характерных для видов или групп видов бруцелл *B. abortus/B. ovis* (*BRA0541*⁺, *BR0262*⁺, *BMEI0711*⁺); *B. melitensis* (*BRA0541*⁺, *BR0262*⁺, *BMEI0711*⁺); *B. suis/B. canis* (*BRA0541*⁺, *BR0262*⁺, *BMEI0711*⁺); *B. neotomae* (*BRA0541*⁺, *BR0262*⁺, *BMEI0711*⁺). Другая картина амплификации наблюдалась и при использовании системы Bruce-Ladder – отсутствовал фрагмент размером 1682 п.н. Помимо этого, для данного штамма характерны уникальные профили рестрикции участков генов *omp2a* и *omp2b* ферментом *AluI* (рисунок), тогда как результаты рестрик-

ции *omp25*, *omp2a* локусов рестриктазами *EcoRV* и *EcoRI*, соответственно, идентичны таковым для ряда видов бруцелл. Все это указывает на то, что штамм *B. abortus* C-549 относится к роду *Brucella* spp., но определить его видовую принадлежность не представляется возможным. Очевидна необходимость дальнейшего изучения данного изолята, в том числе с использованием полногеномного секвенирования.

Полученные нами результаты согласуются и дополняют данные R.T.Tiller *et al.* [7], которые установили, что штаммы возбудителя бруцеллеза, выделенные от грызунов в 1980-е годы на территории Австралии, отличаются по ряду фенотипических и генетических признаков от известных видов бруцелл. Филогенетический анализ, проведенный авторами на основании нуклеотидной последовательности генов 16S рДНК, *recA*, *rpoB* и 15 VNTR-локусов, показал, что эти культуры имели схожесть со штаммом *B. inopinata* BO1, атипичным изолятом *Brucella* BO2, но образовывали отдельную самостоятельную ветку.

Из 14 исследованных изолятов *B. melitensis* для 11 (И-328, М-117, М-97, С563-С570) подтверждена их принадлежность к виду, указанному в паспорте. В то же время штамм *B. melitensis* 286 идентифицирован как *B. suis*, *B. melitensis* C-482 как *B. abortus*,

Таблица 2

Результаты идентификации природных штаммов бруцелл с использованием амплификационных систем и рестрикционного анализа

Название штамма, таксономическое положение в соответствии с паспортом	Результаты исследования								Результаты идентификации на основании проведенного анализа
	Амплификационные системы				Рестрикция				
	Набор реагентов «Brucella- идентификация – РГФ»	AMOS-Del-	Bruce-ladder	Suis-Ladder	EcoRV/ omp25	EcoRI/ omp2a	AluI/ omp2a	AluI/ omp2b	
<i>B. abortus</i> A-81, C-442, 1271, 164-70, И-199, 1552	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)	<i>B. abortus</i>	н/и	P1	P2	P2	P1	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)
<i>B. abortus</i> 290	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	н/иден	<i>B. abortus</i>	н/и	P1	P2	P2	P1	<i>B. abortus</i>
<i>B. abortus</i> 3143-П	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)	н/иден	н/и	P1	P2	P2	P1	<i>B. abortus</i>
<i>B. abortus</i> C-549	н/иден	NEG	н/иден	н/и	P1	P2	P _{new}	P _{new}	<i>Brucella</i> spp.
<i>B. abortus</i> 339	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	н/и	NR	P2	P2	P1	<i>B. melitensis</i>
<i>B. melitensis</i> И-328, М-117, М-97, C563-C570	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	н/и	NR	P2	P2	P1	<i>B. melitensis</i>
<i>B. melitensis</i> 286	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	<i>B. suis</i> 1 bv	<i>B. suis</i>		P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i> 1 bv
<i>B. melitensis</i> C-482	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	<i>B. abortus</i> (1, 2, 4 bv)	<i>B. abortus</i>	н/и	P1	P1	P1	P1	<i>B. abortus</i> (1, 2, 4 bv)
<i>B. melitensis</i> М-114	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	<i>B. ovis</i>	<i>B. ovis</i>	н/и	P2	P2	P3	P2	<i>B. ovis</i>
<i>B. suis</i> 31, 61, 6, И-100	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	<i>B. suis</i> 1bv	<i>B. suis</i>	bv1	P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i> 1 bv
<i>B. suis</i> И-99	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	NEG	<i>B. suis</i>	bv2	P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i> 2 bv
<i>B. suis</i> 214/23	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	NEG	<i>B. suis</i>	bv4	P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i> 4 bv
<i>B. suis</i> C-445	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	NEG	<i>B. suis</i>	bv5	P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i> 5 bv
<i>B. suis</i> C-450, C-451	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	NEG	<i>B. suis</i>	н/иден	P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i>
<i>B. ovis</i> 440, 25-90, И-107	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	<i>B. ovis</i>	<i>B. ovis</i>	н/и	P2	P2	P3	P2	<i>B. ovis</i>
<i>B. ovis</i> 64/1, 390-90, 10/2, 83-89, 2000	<i>B. abortus</i> / <i>B. ovis</i>	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)	<i>B. abortus</i>	н/и	P1	P2	P2	P1	<i>B. abortus</i> (3b, 5, 6, 9 bv)
<i>B. ovis</i> 830	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. melitensis</i>	н/и	NR	P2	P2	P1	<i>B. melitensis</i>
<i>B. ovis</i> 712	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	NEG	<i>B. suis</i>	bv5	P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i> 5 bv
<i>B. canis</i> 666, 1066	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	NEG	<i>B. canis</i>	<i>B. canis</i>	P1	P2	P2	P1	<i>B. canis</i>
<i>B. canis</i> И-966	<i>B. suis</i> / <i>B. canis</i>	NEG	<i>B. suis</i>	bv4	P1	P2	P2	P1	<i>B. suis</i> 4 bv
<i>B. neotomae</i> 65/168, 66/2	<i>B. neotomae</i>	NEG	<i>B. neotomae</i>	н/и	P1	P2	P4	P1	<i>B. neotomae</i>

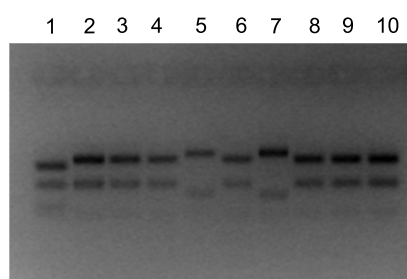
Примечания: н/иден – идентификация бруцелл не возможна, н/и – не исследуется, NEG – отсутствие амплификации, NR– нет рестрикции.

Примечания: н/иден – идентификация бруцелл не возможна, н/и – не исследуется, NEG – отсутствие амплификации, NR – нет рестрикции.

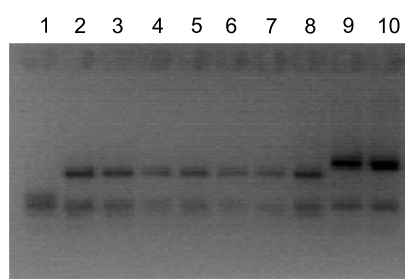
B. melitensis М-114 как *B. ovis*.

Таксономическое положение девяти изученных штаммов *B. suis*, определенное с помощью амплификационных и рестрикционных технологий, полностью совпало с паспортными данными. Особый интерес представляют результаты анализа культур *B. suis* C-450 и C-451, выделенных от лесных мышей в 1990 г., с помощью системы Suis-Ladder. У этих штаммов профиль амплификации составил 774/488/278/197 п.н., и он не соответствовал ни одному из указанных I. Lopez-Goni *et al.* [6]. Наиболее близким профилем к полученному обладали штаммы *B. suis* 5-го биовара: 774/614/278/197 п.н. Авторами в

качестве ДНК-мишени для дифференциации биоваров *B. suis* предложено использовать участок Brucе 11, содержащий вариабельные tandemные повторы (VNTR). Поэтому в ПЦР у биоваров наблюдается образование ампликонов разного размера: биовар 1 – 425 п.н. (6 повторов), биовар 2 – 551 п.н. (8 повторов), биовар 3 – 299 п.н. (4 повтора), биовар 4 и 5 – 614 п.н. (9 повторов). У изученных штаммов *B. suis* C-450 и C-451 выявлена амплификация 7 повторов (488 п.н.). Полученные результаты указывают на необходимость расширения спектра изученных штаммов данного вида с похожим источником выделения для решения вопроса о дополнении схемы интерпре-



А



Б

Результаты рестрикции *omp2b* (А) и *omp2a* (Б) ферментом *AluI* у штаммов бруцелл:

1 – *B. abortus* C-549; 2 – *B. abortus* 3143-П; 3 – *B. abortus* 1552; 4 – *B. canis* 1066; 5 – *B. canis* И-966; 6 – *B. canis* 6/66; 7 – *B. ovis* 440; 8 – *B. ovis* 712; 9 – *B. neotomae* 65/168; 10 – *B. neotomae* 66/2

тации результатов системы Suis-Ladder.

Из 10 штаммов *B. ovis* на основании проведенного анализа только три (440, 25-90, И-107) принадлежали данному виду, пять (64/1, 390-90, 10/2, 83-89, 2000) идентифицированы как *B. abortus*, один штамм (830) как *B. melitensis* и одна культура (712) – *B. suis* 5-го биовара. Результаты исследования, полученные с использованием разных амплификационных систем и рестрикционного анализа фрагментов *omp25*, *omp2a* и *omp2b* генов с помощью ферментов *EcoRV* и *AluI*, полностью совпадали.

При изучении трех штаммов *B. canis* для двух из них (666, 1066) подтверждено таксономические положения в соответствии с паспортными данными, тогда как последний (Н-966) являлся *B. suis* 4-го биовара. Оба штамма *B. neotomae* 65/168, 66/2 принадлежали к виду, указанному в паспорте.

Таким образом, применение комплекса амплификационных методов и тест-систем («Ген *Brucella* – идентификация – РГФ» или аналог, AMOS-DEL, Bruce-Ladder, Suis-Ladder) и рестрикционного анализа *omp25*, *omp2a*, *omp2b* локусов с помощью ферментов *AluI*, *EcoRI*, *Eco32I* (*EcoRV*) является эффективным подходом для определения видовой и, в ряде случаев, биоварной принадлежности бруцелл. Полученные результаты указывают на перспективность продолжения работы по уточнению видовой принадлежности штаммов, хранящихся в фонде Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб», а также на целесообразность совершенствования способов определения видовой принадлежности возбудителя бруцеллеза с помощью полимеразной цепной реакции с учетом результатов в режиме реального времени.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Касьян Ж.А., Осина Н.А., Касьян И.А., Шарова И.Н., Казакова Е.С. Апробация нового генодиагностического препарата при исследовании проб биологического материала на наличие возбудителя бруцеллеза. *ЗНИСО*. 2016; 4(277):48.
2. Bricker B.J., Halling S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4 *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiology*. 1994; 32:2660–6.
3. Cloeckeaert A., Verger J.-M., Grayon M., Grepinet O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology*.

1995; 141:2111–21.

4. İca T., Aydın F., Gümüşsoy K.S., Perçin D., Sümerkan A.B., Ocak F., Abay S., Doğan H.O., Findik A., Çiftçi A. Conventional and molecular biotyping of *Brucella* strains isolated from cattle, sheep and human. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.* 2012; 59:259–64.

5. Lopez-Goni I., Garcia-Yoldi D., Martin C.M., Miguel M.J., Munoz P.M., Blasco J.M., Jacques I., Grayon M., Cloeckeaert A., Ferreira A.C., Carloso R., Correa de Sa, M.I., Walravens K., Albert D., Garin-Bastuji B. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species including the vaccine strains. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46:3484–7. DOI: 10.1128/JCM.00837-08.

6. Lorpez-Goni I., Garcia-Yoldi D., Martin C.M., Miguel M.J., Barquero-Calvo E., Guzman n-Verri C., Albert D., Garin-Bastuji B. New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Vet. Microbiol.* 2011; 154:152–5. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.06.035.

7. Tiller R.V., Gee J.E., Frace M.A., Taylor T.K., Setubal J.C., Hoffmaster A.R., De B.K. Characterization of novel *Brucella* strains originating from wild native rodent species in North Queensland, Australia. *Appl. Environment. Microbiol.* 2010; 76:5837–45. DOI: 10.1128/AEM.00620-10.

References

1. Kas'yan Zh.A., Osina N.A., Kas'yan I.A., Sharova I.N., Kazakova E.S. [Validation of new gene-diagnostic preparation in tests of biological material samples for the presence of brucellosis agent]. *Zdor. Naselen. Sreda Obit.* 2016; 4(277): 48.
2. Bricker B.J., Halling S.M. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4 *Brucella melitensis*, *Brucella ovis* and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J. Clin. Microbiology*. 1994; 32:2660–6.
3. Cloeckeaert A., Verger J.-M., Grayon M., Grepinet O. Restriction site polymorphism of the genes encoding the major 25 kDa and 36kDa outer-membrane proteins of *Brucella*. *Microbiology*. 1995; 141:2111–21.
4. İca T., Aydın F., Gümüşsoy K.S., Perçin D., Sümerkan A.B., Ocak F., Abay S., Doğan H.O., Findik A., Çiftçi A. Conventional and molecular biotyping of *Brucella* strains isolated from cattle, sheep and human. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.* 2012; 59:259–64.
5. Lopez-Goni I., Garcia-Yoldi D., Martin C.M., Miguel M.J., Munoz P.M., Blasco J.M., Jacques I., Grayon M., Cloeckeaert A., Ferreira A.C., Carloso R., Correa de Sa, M.I., Walravens K., Albert D., Garin-Bastuji B. Evaluation of a multiplex PCR assay (Bruce-ladder) for molecular typing of all *Brucella* species including the vaccine strains. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46:3484–7. DOI: 10.1128/JCM.00837-08.
6. Lorpez-Goni I., Garcia-Yoldi D., Martin C.M., Miguel M.J., Barquero-Calvo E., Guzman n-Verri C., Albert D., Garin-Bastuji B. New Bruce-ladder multiplex PCR assay for the biovar typing of *Brucella suis* and the discrimination of *Brucella suis* and *Brucella canis*. *Vet. Microbiol.* 2011; 154:152–5. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.06.035.
7. Tiller R.V., Gee J.E., Frace M.A., Taylor T.K., Setubal J.C., Hoffmaster A.R., De B.K. Characterization of novel *Brucella* strains originating from wild native rodent species in North Queensland, Australia. *Appl. Environment. Microbiol.* 2010; 76:5837–45. DOI: 10.1128/AEM.00620-10.

Authors:

Osina N.A., Kas'yan Zh.A., Kas'yan I.A., Lyashova O.Yu., Osin A.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Осина Н.А., Касьян Ж.А., Касьян И.А., Ляшова О.Ю., Осин А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 29.07.16.

Н.А.Плеханов, С.П.Заднова

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ БИОСИНТЕЗ МАННОЗОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩИХ ПИЛЕЙ АДГЕЗИИ У РАЗЛИЧНЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* БИОВАРА ЭЛЬ ТОР

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

Цель работы. Провести сравнительный структурный и функциональный анализ генов, кодирующих биосинтез маннозочувствительных гемагглютинирующих пилей у типичных штаммов и геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор. **Материалы и методы.** В работе использовали типичные и генетически измененные штаммы холерного вибриона биовара Эль Тор, выделенные на территории Российской Федерации в период с 1970 по 2012 год из объектов внешней среды и от больных. Были применены микробиологические и молекулярно-генетические методы, анализ данных полногеномного секвенирования. **Результаты и выводы.** Методом ПЦР установлено присутствие гена *mshA*, кодирующего основную субъединицу MSHA пилей, у всех исследуемых штаммов. При сравнительном анализе нуклеотидной последовательности генов, входящих в *msh* кластер, у типичных штаммов и геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, установлена идентичность нуклеотидной последовательности гена *mshA* у всех исследованных штаммов. При этом у штаммов геновариантов, изолированных в период их появления (1988, 1993, 1994 гг.), структура остальных генов *msh* оперона идентична типичным Эль Тор вибрионам. В то же время, начиная с 1997 г., в штаммах геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор в последовательности генов, участвующих в сборке и секреции MSHA пилей, выявлены SNP, которые не оказывают влияния на биосинтез данных пилей адгезии, но их появление, возможно, явилось следствием адаптации штаммов геновариантов к разным условиям существования.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, геноварианты, MSHA, SNP.

Корреспондирующий автор: Никита Александрович Плеханов, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

N.A.Plekhanov, S.P.Zadnova

Structural-Functional Analysis of the Genes, Encoding Biosynthesis of Mannose-Sensitive Hemagglutinating Pili of Adhesion in Different *Vibrio cholerae* El Tor Strains

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

Objective of the study is to conduct comparative structural and functional analysis of the genes, encoding biosynthesis of mannose-sensitive hemagglutinating pili in typical *V. cholerae* El Tor strains and genovariants. **Materials and methods.** Utilized were typical and genetically altered strains of cholera vibrio, biovar El Tor, isolated in the territory of the Russian Federation between 1970 and 2012 from ambient environment objects and from patients. Applied were microbiological and molecular-genetic methods, as well as analysis of the data on the whole genome sequencing. **Results and conclusions.** Using PCR assay the presence of *mshA* gene, encoding basic sub-unit of MSHA pili, has been detected in all of the tested strains. Comparative analysis of the nucleotide sequence of the genes, included into *msh* cluster, has revealed identity of the nucleotide sequence of *mshA* gene, both in typical *V. cholerae* strains and genovariants. Thereat, in strains of genovariants, isolated at the time of their emergence (1988, 1993, 1994), the structure of the other genes in *msh* operon is identical to typical El Tor vibrios. At the same time, since 1997, in strains of *V. cholerae* El Tor genovariants, in the sequence of the genes, involved in the assembly and secretion of MSHA pili, identified have been the SNPs, which do not influence biosynthesis of these pili, but their occurrence, probably, was due to adaptation of the genovariant strains to varying living conditions.

Key words: *Vibrio cholerae*, genovariants, MSHA, SNP.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Nikita A. Plekhanov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Plekhanov N.A., Zadnova S.P. Structural-Functional Analysis of the Genes, Encoding Biosynthesis of Mannose-Sensitive Hemagglutinating Pili of Adhesion in Different *Vibrio cholerae* El Tor Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 4:75–78. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-75-78

В настоящее время причиной заболевания холерой являются токсигенные штаммы геновариантов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор. Данные изоляты, впервые появившиеся в 90-х годах XX столетия, заменили типичные штаммы Эль Тор вибрионов, которые вызвали начало текущей, 7-й пандемии холеры [3, 8]. Геноварианты в настоящее время получили глобальное распространение в мире [9] и с 1993 г. завозятся в Российскую Федерацию, вызывая

вспышки и единичные случаи заболевания [2].

Как известно, *V. cholerae* является не только патогеном человека, но и естественным обитателем пресных и соленых водоемов. В связи с этим особую важность представляют исследования механизмов выживания возбудителя во внешней среде. Переход из организма человека в водную среду сопровождается различными изменениями в клетках. В том числе снижается продукция факторов вирулентности,

но активно начинают экспрессироваться гены факторов адаптации, способствующие выживанию патогена в данной среде обитания. Показано, что уже на поздней стадии инфекции увеличивается экспрессия генов, кодирующих биосинтез маннозочувствительных гемагглютинирующих пилей адгезии (MSHA) [5, 10, 14]. MSHA пили располагаются на поверхности бактериальной клетки и участвуют в первом этапе формирования биопленки – прикреплении микроорганизма к субстрату. При отсутствии продукции данных пилей биопленка не образуется [12, 13]. В составе биопленки холерные вибрионы защищены от действия различных повреждающих факторов внешней среды и могут длительное время сохраняться в воде открытых водоемов. По данным литературы, геноварианты так же, как и типичные Эль Тор вибрионы, содержат *msh* оперон, но сведения о его структуре у штаммов геновариантов, изолированных в разные годы, а также сравнительной продукции ими MSHA пилей отсутствуют. В то же время изучение механизмов адаптации штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, способствующих их выживанию во внешней среде, позволят понять причины их селективного преимущества в современный период.

Учитывая важную роль MSHA пилей в выживании холерного вибриона во внешней среде, цель нашего исследования состояла в проведении сравнительного структурного и функционального анализа генов, кодирующих биосинтез маннозочувствительных гемагглютинирующих пилей адгезии у типичных штаммов и геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор.

Материалы и методы

Исследования были проведены на 41 штамме *V. cholerae*, выделенном на территории Российской Федерации от больных и из внешней среды в период с 1970 по 2012 год (табл. 1). Штаммы хранили в лиофилизированном виде в Государственной коллекции патогенных бактерий. Культуру выращивали на агаре и бульоне LB (pH 7,2) в течение 18–24 ч при 37 °С.

Продукцию MSHA-пилей определяли с использованием эритроцитов I группы человека, учитывая максимальное разведение культуры, дающее видимую агглютинацию [4].

Наличие гена *mshA* выявляли методом ПЦР по описанной ранее методике [1]. Анализ данных полногеномного секвенирования штаммов проводили с помощью пакета программ DNASTAR SeqMan pro.

Результаты и обсуждение

Согласно данным литературы, биосинтез MSHA пилей кодирует 17 генов, объединенных в два оперона (структурный и секреторный) и расположенных на острове персистенции EPI (от англ. *environmental persistence island*) на большой хромосоме [6]. При этом кроме гена *mshA*, кодирующего основную субъ-

единицу маннозочувствительных гемагглютинирующих пилей адгезии, в указанный оперон входят гены *mshB-Q*, ответственные за сборку и транспортирование пилей на поверхность клеток. Так, белок MshE (52,5 kDa) выполняет функцию АТФазы, MshJ относится к белкам системы секреции II типа и совместно с MshN участвует в сборке и секреции MSHA пилей [6, 7].

На первом этапе работы проведен анализ нуклеотидных последовательностей генов, входящих в *msh* оперон, у штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор, полные геномы которых депонированы в базе данных NCBI. Для анализа были взяты типичный штамм *V. cholerae* M818 биовара Эль Тор (Саратов, 1970, LANM00000000.1) и штаммы геновариантов, изолированные в разные годы на эндемичной территории и завезенные в Россию и сопредельные государства, – *V. cholerae* P13762 (Узбекистан, 1988, LQYD00000000.1), M1275 (Дагестан, 1993, LRAF00000000.1), M1293 (Дагестан, 1994, JFFW00000000.1), P17644 (Ачинск, 1997, JRTW00000000.1), M1429 (Башкирия, 2002, LAEM00000000.1), P18899 (Мурманск, 2006, LAKM00000000.1), L3226 (Москва, 2010, JDVX00000000), секвенированные в лаборатории геномного и протеомного анализа РосНИПЧИ «Микроб». Из базы данных NCBI также были

Таблица 1

Штаммы *V. cholerae* биовара Эль Тор, использованные в работе

Штамм	Место выделения	Год выделения
Типичные штаммы Эль Тор вибрионов		
M712; M713	Московская область	1970
M736, M738	Пермь	1970
M818	Саратов	1970
M886; M887; M890	Астрахань	1970
M1011, M1013	Башкирия	1972
M582	Калмыкия	1974
M642	Астрахань	1975
C402	Ставрополь	1990
M1259; M1261	Пермь	1990
Геноварианты		
M1275; M1297	Дагестан	1993
M1264; M1272; M1298; M1299	Краснодар	1993
M1270	Татарстан	1993
M1293; M1295	Дагестан	1994
M1268, M1269	Магнитогорск	1994
M1266	Пермь	1994
P17644; P17647	Ачинск	1997
P17645	Иркутск	1997
M1326	Дагестан	1998
M1344; M1345	Казань	2001
M1429	Башкирия	2004
M1430	Тверь	2005
P18899	Мурманск	2006
L3225; L3226, L4150	Москва	2010
301	Таганрог	2011
M1509	Москва	2012

Результаты анализа нуклеотидной последовательности генов *msh* оперона различных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор

Штамм	Место и год выделения	Гены				
		<i>mshA</i>	<i>mshE</i>	<i>mshH</i>	<i>mshJ</i>	<i>mshN</i>
M818	Саратов, 1970	–	–	–	–	–
P13762	Узбекистан, 1988	–	–	–	–	–
M1275	Дагестан, 1993	–	–	–	–	–
M1293	Дагестан, 1994	–	–	–	–	–
P17644	Ачинск, 1997	–	p:1219 G=>A	–	p:560 A=>G	p:249 G=>
CIRS101	Бангладеш, 2002	–	p:1219 G=>A	–	p:560 A=>G	–
M1429	Башкирия, 2002	–	p:1219 G=>A	p:1384=>G	p:560 A=>G	–
P18899	Мурманск, 2006	–	p:1219 G=>A	–	p:560 A=>G	–
H1	Гаити, 2010	–	p:1219 G=>A	–	p:560 A=>G	–
L3226	Москва, 2010	–	p:1219 G=>A	–	p:560 A=>G	–

Примечание: «–» – последовательность гена идентична последовательности референс-штамма *V. cholerae* N16961 биовара Эль Тор.

взяты для сравнения полногеномные последовательности штаммов CIRS101 (Бангладеш, 2002, ACVW00000000.1), H1 (Гаити, 2010, AKNH00000000.1).

Предварительно использованные в эксперименте штаммы были протестированы на наличие гена *mshA*. При ПЦР-анализе было установлено, что в геноме всех исследуемых штаммов присутствует данный ген, что может указывать на биосинтез штаммами MSHA-пилей.

В результате анализа нуклеотидных последовательностей полных геномов изученных нами штаммов установлено, что последовательность гена *mshA* одинакова у всех исследованных штаммов и идентична референс-штамму *V. cholerae* N16961 биовара Эль Тор.

У штаммов *V. cholerae* M818, P13762, M1275 и M1293 структура остальных генов *msh* оперона также полностью совпадала с референс-штаммом.

В то же время у штамма *V. cholerae* P17644, изолированного в 1997 г., выявлена делеция одного нуклеотида в гене *mshN* в позиции 255 от начала гена, а также обнаружены несинонимичные однонуклеотидные замены (SNP) в генах *mshJ* (замена А на Г в позиции 560) и *mshE* (замена Г на А в позиции 1307). В штаммах геновариантов, выделенных в более поздние годы и в современный период (P18899, L3226, референс-штамм геновариантов CIRS101), также присутствовали SNP в генах *mshJ* и *mshE* (табл. 2). Необходимо отметить, что аналогичные замены были обнаружены зарубежными авторами у штаммов, выделенных во время эпидемии на острове Гаити в 2010 г. [11]. Возможно, выявленные SNP могут служить генетической меткой штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, выделенных после 1997 г.

У штамма M1429, кроме указанных SNP в *mshJ* и *mshE*, был обнаружен сдвиг рамки считывания в гене *mshH*, вызванный вставкой единичного гуанинового нуклеотида в позиции 1384, приводящий к образованию стоп-кодона.

Таким образом, в результате анализа структуры генов *msh* кластера был обнаружен ряд SNP в генах *mshE* и *mshJ*, общих для всех исследованных штаммов геновариантов, выделенных в период с 1997 по 2010 год. Структура *msh* оперона у ранее выделенных штаммов геновариантов идентична типичным штаммам *V. cholerae* биовара Эль Тор.

На следующем этапе работы была изучена экспрессия данных пилей у типичных штаммов и штаммов геновариантов. В результате установлено, что все изученные штаммы продуцировали MSHA пили. При этом значительных отличий по их продукции между типичными штаммами *V. cholerae* биовара Эль Тор, изолированными в начале текущей пандемии холеры (1970–1990 гг.), и штаммами геновариантов, завезенными в разные годы (1993–2010), не выявлено.

В результате проведенных исследований установлено, что геноварианты *V. cholerae* биовара Эль Тор так же, как и типичные Эль Тор вибрионы, продуцируют MSHA пили, поэтому способны формировать биопленку и длительное время сохраняться во внешней среде. Анализ нуклеотидной последовательности *msh* оперона у исследованных штаммов, показал стабильное сохранение структуры гена *mshA* во всех исследованных штаммах *V. cholerae* биовара Эль Тор, что говорит о ее важной роли в работе всей *msh*-системы. При этом структура *msh* оперона в штаммах геновариантов, изолированных в период их появления (1988, 1993, 1994 гг.), идентична типичным Эль Тор вибрионам. В то же время, начиная с 1997 г., в штаммах геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор в последовательности генов, участвующих в сборке и секреции MSHA пилей, выявлены SNP, которые не оказывают влияние на биосинтез данных пилей адгезии, но их появление, возможно, явилось следствием адаптации штаммов геновариантов к разным условиям существования.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Осин А.В., Нефедов К.С., Ерошенко Г.А., Смирнова Н.И. Сравнительный анализ геномов холерных вибрионов эльтор, выделенных до начала и в разные периоды седьмой пандемии холеры. *Генетика*. 2005; 41:53–62.
- Смирнова Н.И., Горяев А.А., Заднова С.П., Краснов Я.М., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Генетическая характеристика клинических штаммов *Vibrio cholerae*, завезенных на территорию Российской Федерации в разные периоды 7-й пандемии холеры. *Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол.* 2011; 3:3–10.
- Смирнова Н.И., Челдышова Н.Б., Горяев А.А., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Эволюция генома *Vibrio cholerae*: пути формирования атипичных штаммов. *Пробл. особо опасных инф.* 2008; 3(97):5–11.
- Hanne L.F., Finkelstein R.A. Characterization and distribution of the hemagglutinins produced by *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Immun.* 1982; 36(1):209–14.
- Lutz C., Erken M., Noorian P., Sun S., McDougald D. Environmental reservoirs and mechanism of persistence of *Vibrio cholerae*. *Frontiers Microbiol.* 2013; 4(00375):1–15. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00375.
- Marsh J.W., Taylor R.K. Genetic and transcriptional analyses of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin type 4 pilus gene locus. *J. Bacteriol.* 1999; 181(4):1110–7.
- Marsh J.W., Sun D., Taylor R.K. Physical linkage of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin secretory and structural subunit gene loci: identification of the *mshG* coding sequence. *J. Infect. Immun.* 1996; 64(2):460–5.
- Nair G.B., Faruque L.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(9):3296–9. DOI: 10.1128/JCM.40.9.3296-3299.2002.
- Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18(1):46–54. DOI: 10.1016/j.tim.2009.10.003.
- Schild S., Tamayo R., Nelson E.J., Qadri F., Calderwood S.B., Camilli A. Genes induced late in infection increase fitness of *Vibrio cholerae* after release into the environment. *Cell. Host. Microbe.* 2007; 2(4):64–77. DOI: 10.1016/j.chom.2007.09.004.
- Sealfon R., Gire S., Ellis C., Calderwood S., Qadri F., Hensley L., Kellis M., Ryan E.T., LaRocque R.C., Harris J.B., Sabeti P.C. High depth, whole-genome sequencing of cholera isolates from Haiti and Dominican Republic. *BMC Genomics*. 2012; 13:468. DOI: 10.1186/1471-2164-13-468.
- Teschler J.K., Zamorano-Sanchez D., Utada A.S., Warner C.J., Wong G.C., Wong R.G., Linington R.G., Yildiz F.H. Living in the matrix. Assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *J. Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13(5):255–68. DOI: 10.1038/nrmicro3433.
- Watnick P.L., Fullner K.J., Kolter R. A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *J. Bacteriol.* 1999; 181(11): 606–9.
- Yildiz F.H., Visick K.L. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *J. Trends Microbiol.* 2009; 17(3):109–18. DOI: 10.1016/j.tim.2008.12.004.

References

- Osin A.V., Nefedov K.S., Eroshenko G.A., Smirnova N.I. [Comparative analysis of El Tor cholera vibrios, isolated before and in different periods of the seventh cholera pandemic]. *Genetika*. 2005; 41:53–62.
- Smirnova N.I., Goryaev A.A., Zadnova S.P., Krasnov Ya.M., Lozovsky Yu.V., Kutyrev V.V. [Genetic characteristics of clinical *Vibrio cholerae* strains, imported into the territory of the Russian Federation in different periods of the 7th cholera pandemic]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2011; 3:3–10.
- Smirnova N.I., Cheldyshova N.B., Goryaev A.A., Lozovsky Yu.V., Kutyrev V.V. [*Vibrio cholerae* genome evolution: ways of atypical strains formation]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2008; 3(97):5–11.
- Hanne L.F., Finkelstein R.A. Characterization and distribution of the hemagglutinins produced by *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Immun.* 1982; 36(1):209–14.
- Lutz C., Erken M., Noorian P., Sun S., McDougald D. Environmental reservoirs and mechanism of persistence of *Vibrio cholerae*. *Frontiers Microbiol.* 2013; 4(00375):1–15. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00375.
- Marsh J.W., Taylor R.K. Genetic and transcriptional analyses of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin type 4 pilus gene locus. *J. Bacteriol.* 1999; 181(4):1110–7.
- Marsh J.W., Sun D., Taylor R.K. Physical linkage of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin secretory and structural subunit gene loci: identification of the *mshG* coding sequence. *J. Infect. Immun.* 1996; 64(2):460–5.
- Nair G.B., Faruque L.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(9):3296–9. DOI: 10.1128/JCM.40.9.3296-3299.2002.
- Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18(1):46–54. DOI: 10.1016/j.tim.2009.10.003.
- Schild S., Tamayo R., Nelson E.J., Qadri F., Calderwood S.B., Camilli A. Genes induced late in infection increase fitness of *Vibrio cholerae* after release into the environment. *Cell. Host. Microbe.* 2007; 2(4):64–77. DOI: 10.1016/j.chom.2007.09.004.
- Sealfon R., Gire S., Ellis C., Calderwood S., Qadri F., Hensley L., Kellis M., Ryan E.T., LaRocque R.C., Harris J.B., Sabeti P.C. High depth, whole-genome sequencing of cholera isolates from Haiti and Dominican Republic. *BMC Genomics*. 2012; 13:468. DOI: 10.1186/1471-2164-13-468.
- Teschler J.K., Zamorano-Sanchez D., Utada A.S., Warner C.J., Wong G.C., Wong R.G., Linington R.G., Yildiz F.H. Living in the matrix. Assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *J. Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13(5):255–68. DOI: 10.1038/nrmicro3433.
- Watnick P.L., Fullner K.J., Kolter R. A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *J. Bacteriol.* 1999; 181(11): 606–9.
- Yildiz F.H., Visick K.L. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *J. Trends Microbiol.* 2009; 17(3):109–18. DOI: 10.1016/j.tim.2008.12.004.

Authors:

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

Об авторах:

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

Поступила 06.10.16.

А.М.Сеничкина, Н.А.Осина, А.С.Абдрашитова, В.Г.Германчук

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПЦР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ «ГЕН *FRANCISELLA TULARENSIS* - РЭФ» И «ГЕН *FRANCISELLA TULARENSIS* - РГФ» ПРИ ИССЛЕДОВАНИИ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ОТ ЖИВОТНЫХ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТУЛЯРЕМИЕЙ

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

Цель работы. Оценка диагностической эффективности ПЦР с использованием тест-систем «Ген *Francisella tularensis* - РГФ» и «Ген *Francisella tularensis* - РЭФ» в сравнении с другими методами при исследовании материала, полученного от животных с экспериментальной туляремией. **Материалы и методы.** Проведено исследование проб лимфоузлов, печени, селезенки, легкого и сердца, полученных от животных с экспериментальной туляремией с различной инфекционной нагрузкой, с помощью ПЦР, ИФА, ИХА, МФА, бактериоскопии и бактериологического анализа. **Результаты и выводы.** Установлена высокая диагностическая эффективность метода ПЦР (98 %) с применением тест-систем «Ген *Francisella tularensis* - РЭФ» и «Ген *Francisella tularensis* - РГФ» при выявлении возбудителя туляремии в пробах биологического материала от инфицированных животных. Для других методов данный показатель составил: ИФА – 70,4 %, МФА – 72,1 %, бактериоскопии – 54 % и бактериологического анализа – 64,3 %. Продemonстрирована возможность и информативность исследования пробы легкого на наличие *F. tularensis* на ранних этапах развития заболевания у высоковосприимчивых животных с помощью ПЦР и бактериологического метода.

Ключевые слова: диагностическая эффективность, ПЦР, экспериментальная туляремия.

Корреспондирующий автор: Айслу Махамятовна Сеничкина., e-mail: rusrapi@microbe.ru.

А.М.Senichkina, N.A.Osina, A.S.Abdrashitova, V.G.Germanchuk

Assessment of Diagnostic Efficiency of PCR Kits «Gen *Francisella tularensis* - REF» and «Gen *Francisella tularensis* - RGF» when Analyzing Biological Samples from Animals with Experimental Tularemia

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russian Federation

Objective of the study is to assess diagnostic efficiency of PCR kits «Gen *Francisella tularensis* - REF» and «Gen *Francisella tularensis* - RGF», when performing analysis of biological samples from animals with experimental tularemia, as compared to other diagnostic methods. **Materials and methods.** Samples of lymphatic node, liver, spleen, lung and heart tissues, taken from animals with experimental tularemia with different infectious load, have been analyzed by PCR, ELISA, immune-chromatography, DFA, microscopy and culture cultivation. **Results and conclusions.** High diagnostic efficiency (98 %) has been determined for PCR kits «Gen *Francisella tularensis* - REF» and «Gen *Francisella tularensis* - RGF», used for detection of tularemia agent in biological samples taken from infected animals. For other diagnostic methods this index is: 70,4 % – for ELISA, 72,1 % – for DFA, 54 % – for microscopy and 64,3 % – for culture cultivation. Demonstrated has been the possibility and informational content of investigating lung samples for the presence of *F. tularensis* at early stages of infection in highly susceptible animals, using PCR and culture cultivation.

Keywords: diagnostic efficiency, PCR, experimental tularemia.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Aislu M. Senichkina, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Senichkina A.M., Osina N.A., Abdrashitova A.S., Germanchuk V.G. Assessment of Diagnostic Efficiency of PCR Kits «Gen *Francisella tularensis* - REF» and «Gen *Francisella tularensis* - RGF» when Analyzing Biological Samples from Animals with Experimental Tularemia. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 4:79–84. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-79-84

В связи с сохраняющейся активностью природных очагов туляремии на территории Российской Федерации и других стран важное значение имеет своевременное выявление туляремийного микроба в пробах от диких мелких млекопитающих или их трупов, собранных в природе, подснежных гнезд грызунов и продуктов их жизнедеятельности, пометок хищных птиц, помета хищных млекопитающих, эктопаразитов и из объектов окружающей среды. Для проведения лабораторных исследований в соответствии с МУ 3.1.2007-05 «Эпидемиологический

надзор за туляремией» предусмотрено использование бактериоскопии, люминесцентной микроскопии, иммуносерологических реакций, полимеразной цепной реакции (ПЦР), бактериологического анализа и биологической пробы. Чувствительность ряда из обозначенных приемов при исследовании суспензий органов мелких млекопитающих хорошо известна: для бактериоскопии и люминесцентной микроскопии данный показатель составляет $1 \cdot 10^9$ и $1 \cdot 10^6$ м.к./г (мл) соответственно, а для бактериологического и биологического методов – единичные

клетки патогена [8]. В то же время данных о диагностической эффективности амплификационных технологий крайне мало. Н. Rossow *et al.* [10] при воспроизведении туляреминой инфекции на биопробных животных показали, что уже на третий день с момента подкожного и интраназального заражения в дозе 120 и 1200 м.к. ДНК *F. tularensis holarctica* выявляется в пробах суспензий селезенки и почек, при этом концентрация возбудителя составляет от $1 \cdot 10^3$ до $1 \cdot 10^4$ м.к./г (мл). Через пять дней заболевания авторы детектировали туляреминый микроб дополнительно в пробах фекалий и мочи, а его количество в пробах суспензий селезенки и почек увеличилось до $1 \cdot 10^7 - 1 \cdot 10^9$ м.к./г. Для выявления ДНК *F. tularensis* была использована количественная ПЦР с праймерами на основе гена, кодирующего белок 23 кДа, предложенная Т. Skottman *et al.* [11].

Ранее нами были разработаны и зарегистрированы препараты для обнаружения возбудителя туляремии методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени («Ген *Francisella tularensis* - РГФ») и методом электрофореза в агарозном геле («Ген *Francisella tularensis* - РЭФ») [4]. В ходе лабораторных, технических и клинических испытаний подтверждена высокая чувствительность ($1 \cdot 10^3$ м.к./мл) и специфичность (100 %) данных наборов реагентов. Для проведения анализа использовали бактериальные суспензии штаммов микроорганизмов и пробы клинического и биологического материала, искусственно контаминированные туляреминым микробом. Получен положительный опыт по использованию этих тест-систем для выявления ДНК *F. tularensis* в полевом материале при проведении эпизоотологического мониторинга территорий Российской Федерации [7]. Однако данные о чувствительности и специфичности ПЦР с этими препаратами при анализе материала от животных с туляреминой инфекцией отсутствуют.

Целью исследования являлось определение диагностической эффективности ПЦР с применением тест-систем «Ген *Francisella tularensis* - РГФ» и «Ген *Francisella tularensis* - РЭФ» в сравнении с другими методическими приемами при исследовании биологического материала от животных с экспериментальной туляремией.

Материалы и методы

Для моделирования туляреминой инфекции использовали штамм *F. tularensis* подвид *holarctica* КМ-8. Культуру выращивали на FT агаре (pH 7,2) при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 48 ч. Затем готовили бактериальную взвесь штамма в 2 мл 0,9 % раствора натрия хлорида по отраслевому стандартному образцу мутности – 10 единиц ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-85-П (10МЕ)), что соответствует $5 \cdot 10^9$ м.к./мл для *F. tularensis*. Далее осуществляли 10-кратные разведения полученной суспензии в 0,9 % растворе натрия хлорида до конечной концентрации $5 \cdot 10^6 - 5 \cdot 10^1$ м.к./мл.

В качестве биопробных животных использовали беспородных белых мышей, которым подкожно вводили по 0,2 мл суспензии туляреминого микроба, содержащей патоген в концентрации $1 \cdot 10^6 - 1 \cdot 10^1$ м.к.

За биопробными животными было установлено наблюдение в течение 9 дней с момента заражения. По одному не павшему животному вскрывали на 3, 5, 8-е сутки после заражения, а также исследовали всех павших животных.

Для анализа отбирали кусочки паренхиматозных органов, где наиболее вероятно локализуется возбудитель туляремии при инфекционном процессе: печень, селезенка, легкое, а также пробы лимфатических узлов и сердца [3].

Весь биологический материал исследовали бактериологическим (культуральным), бактериоскопическим (мазки, окрашенные по Граму), иммуносерологическими (метод флуоресцирующих антител – МФА, иммунохроматографический анализ – ИХА, иммуноферментный анализ – ИФА) и молекулярно-генетическим (ПЦР) методами.

Проведение люминесцентной микроскопии осуществляли с использованием «Иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих туляреминых» (Медгамал), иммуноферментного анализа – с набором реагентов «ИФА-Тул-СтавНИПЧИ» (ФКУЗ «Став НИПЧИ»), иммунохроматографического анализа – с препаратом «ИХ тест-система *F. tularensis* (ЛПС)» (ФБУН «ГНЦ ПМБ»), ПЦР – с наборами реагентов «Ген *Francisella tularensis* - РГФ» и «Ген *Francisella tularensis* - РЭФ» (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб») в соответствии с инструкциями к препаратам.

Результаты и обсуждение

Известно, что большинство диких и лабораторных животных по отношению к туляреминой инфекции, вызванной *F. tularensis holarctica*, делятся на три группы: I – виды высоковосприимчивые и высокочувствительные к туляремии, II – высоковосприимчивые, но малочувствительные, III – маловосприимчивые и практически нечувствительные к туляремии [3]. Мелкие млекопитающие, которые составляют большую часть материала, собранного при проведении эпизоотологического мониторинга, относятся к I группе, реже – ко II.

У видов животных, относящихся к I группе, заболевание протекает в острой форме и заканчивается гибелью животных, при этом интенсивность обсеменения паренхиматозных органов и крови к концу заболевания достигает $1 \cdot 10^{10} - 1 \cdot 10^{11}$ м.к./г (мл) [3]. В то же время у животных II группы наблюдается умеренное накопление возбудителя – не более $1 \cdot 10^9$ м.к./г (селезенка) и $1 \cdot 10^3$ м.к./мл (кровь). Течение заболевания у животных данного типа в большинстве случаев доброкачественное и заканчивается формированием иммунитета.

Для создания инфекционного процесса у био-

пробных животных (белые мыши, I группа) с разным уровнем обсемененности органов и крови было выбрано 6 заражающих доз: от $1 \cdot 10^6$ до $1 \cdot 10^1$ м.к., при этом высокими концентрациями ($1 \cdot 10^6 - 1 \cdot 10^4$ м.к.) заражали по 3, а низкими ($1 \cdot 10^3 - 1 \cdot 10^1$ м.к.) – по 5 животных. Сроки наблюдения и исследования составили 9 дней. Первый этап исследования проводили через 3 дня, второй – через 5 дней, третий и четвертый (при наличии выживших животных) – на 8 и 9-й день.

При наблюдении за экспериментальными животными на 1–2-е сутки после заражения видимых симптомов заболевания не выявлено. На 3-и сутки у животных, зараженных высокими концентрациями возбудителя ($1 \cdot 10^6 - 1 \cdot 10^5$ м.к.), отмечалось снижение аппетита, активности и веса, на 5-е сутки – все животные пали. Развитие инфекционного процесса при введении меньшего количества микробных клеток возбудителя туляремии ($1 \cdot 10^4 - 1 \cdot 10^1$ м.к.) было более длительным и достигало 8–9 дней. При вскрытии в органах всех павших животных отмечались патологоанатомические изменения, характерные для туляремийной инфекции [2, 3].

Для оценки диагностической эффективности метода ПЦР с применением тест-систем «Ген *Francisella tularensis* - РГФ» и «Ген *Francisella tularensis* - РЭФ» в сравнении с другими методическими приемами осуществляли анализ каждого вида материала от биопробных животных (кусочки печени, селезенки, легкого, сердца, лимфатических узлов) с помощью ПЦР, МФА, ИФА, бактериологического анализа и бактериоскопии.

В последние годы для выявления антигенов туляремийного микроба в пробах из объектов окружающей среды и для идентификации выделенных культур патогена нашел применение иммунохроматографический анализ с использованием набора реагентов «ИХ тест-система *F. tularensis* (ЛПС)» [6]. Однако возможность использования этого подхода для обнаружения возбудителя туляремии в пробах биологического материала от животных не изучена. В то же время С.А.Бельковой и С.В.Балахоновым получен положительный опыт выявления антигенов чумного микроба в суспензиях органов мелких мле-

копитающих методом ИХА [1]. Поэтому весь биологический материал, полученный от биопробных животных, мы также исследовали с помощью ИХА.

Методом ПЦР с использованием генодиагностических препаратов «Ген *Francisella tularensis* - РГФ» и «Ген *Francisella tularensis* - РЭФ» ДНК туляремийного микроба выявлена во всех пробах печени, селезенки, легкого, сердца, лимфатических узлов биопробных животных уже на 3-и сутки с момента заражения возбудителем в концентрациях от $1 \cdot 10^6 - 1 \cdot 10^5$ м.к. (табл. 1). У всех животных этой группы к этому моменту наблюдались признаки болезни. Аналогичный результат получен при исследовании материала от животных, инфицированных таким же количеством клеток патогена, на 5-е сутки, когда они все пали.

При снижении заражающей дозы до $1 \cdot 10^4 - 1 \cdot 10^1$ м.к. результаты анализа практически не изменились: ДНК *F. tularensis* выявлена во всех исследованных пробах на 3, 5, 8-е сутки, за исключением суспензий печени от биопроб, инфицированных 100 и 10 м.к. возбудителя туляремии на 3-и и 5-е сутки. Одной из причин получения отрицательных результатов может быть то, что на ранних сроках заболевания, вызванного попаданием в организм восприимчивого животного небольшого количества клеток туляремийного микроба, накопление возбудителя в ткани печени происходит медленно, и его концентрация невелика. К 8-м суткам количество микроорганизмов становится достаточным, чтобы выявить с помощью ПЦР. Данный факт подтверждают результаты исследования этих же проб с помощью других методов лабораторной диагностики туляремии. Возбудитель туляремии в пробах печени обнаружен только с помощью бактериологического анализа на 5-е сутки заболевания животных.

Особый интерес представляют данные о выявлении ДНК туляремийного микроба во всех исследованных пробах суспензий легкого вне зависимости от использованной заражающей дозы и сроков анализа. Это может указывать на то, что в ткани легких животных I группы возбудитель попадает очень быстро и сохраняется там до конца инфекционного

Таблица 1

Результаты исследований проб материала от животных с экспериментальной туляремией методом ПЦР с использованием наборов реагентов «Ген *Francisella tularensis* - РГФ» и «Ген *Francisella tularensis* - РЭФ»

Метод	Выявление туляремийного микроба в суспензиях															Заражающая доза, м.к.
	лимфоузлов			печени			селезенки			легких			сердца			
	Сутки															
	3-и	5-е	8-е	3-и	5-е	8-е	3-и	5-е	8-е	3-и	5-е	8-е	3-и	5-е	8-е	
ПЦР			н/и			н/и			н/и			н/и			н/и	1·10 ⁶
			н/и			н/и			н/и			н/и			н/и	1·10 ⁵
																1·10 ⁴
																1·10 ³
																1·10 ²
																1·10 ¹

Примечание: серым выделены положительные результаты, н/и – не исследуются.

Результаты исследований проб материала от животных с экспериментальной туляремией с помощью иммуносерологических и бактериологических методов

Метод	Выявление туляремийного микроба в суспензиях															Заражающая доза, м.к.
	лимфоузлов			печени			селезенки			легких			сердца			
	Сутки															
	3-и	5-е	8-е	3-и	5-е	8-е	3-и	5-е	8-е	3-и	5-е	8-е	3-и	5-е	8-е	
МФА			н/и			н/и			н/и			н/и			н/и	1·10 ⁶
			н/и			н/и			н/и			н/и			н/и	1·10 ⁵
																1·10 ⁴
																1·10 ³
																1·10 ²
																1·10 ¹
ИФА			н/и			н/и			н/и			н/и			н/и	1·10 ⁶
			н/и			н/и			н/и			н/и			н/и	1·10 ⁵
																1·10 ⁴
																1·10 ³
																1·10 ²
																1·10 ¹
ИХА			н/и			н/и			н/и			н/и			н/и	1·10 ⁶
			н/и			н/и			н/и			н/и			н/и	1·10 ⁵
																1·10 ⁴
																1·10 ³
																1·10 ²
																1·10 ¹
Бактериоскопия			н/и			н/и			н/и			н/и			н/и	1·10 ⁶
			н/и			н/и			н/и			н/и			н/и	1·10 ⁵
																1·10 ⁴
																1·10 ³
																1·10 ²
																1·10 ¹
Бактериология			н/и			н/и			н/и			н/и			н/и	1·10 ⁶
			н/и			н/и			н/и			н/и			н/и	1·10 ⁵
																1·10 ⁴
																1·10 ³
																1·10 ²
																1·10 ¹

Примечание: серым выделены положительные результаты, н/и – не исследуются.

процесса. Подтверждением тому являются данные о развитии к концу заболевания дисметаболических и медиаторных процессов в легочной ткани биопробных животных с экспериментальной туляремией, которые приводят к нарушению гемодинамики, вентиляции и мощному повреждению ткани легких [2].

Детекция ДНК туляремийного микроба в пробах легких на ранних этапах развития заболевания также установлена Р.А.Еmanuel *et al.* [9] при исследовании проб печени, селезенки, легкого и почек от белых мышей, зараженных интраназально штаммом *F. tularensis* подвид *tularensis* SCHU 4 в концентрации $1,04 \cdot 10^4$ КОЕ/мл, через 1, 24, 48, 72, 96 ч. Анализ осуществляли с помощью бактериологического метода и ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов с праймерами на основе генов *forA* и *tul4*. Авторы показали, что ДНК возбудителя туляремии выявлена в суспензиях легкого и почек

биопробных животных уже через 2 дня после инфицирования, а в пробах печени и селезенки – только через 4 дня. Результаты, полученные в ходе нашего эксперимента, в полной мере согласуются с данными Р.А.Еmanuel *et al.* (2003) и подтверждают факт обнаружения ДНК возбудителя туляремии в пробах легкого методом ПЦР на ранних сроках заболевания животного.

Все пробы суспензий органов экспериментальных животных были также исследованы с помощью ИФА, ИХА, МФА, бактериоскопии и бактериологического анализа (табл. 2).

При анализе проб от животных, инфицированных $1 \cdot 10^6$ – $1 \cdot 10^5$ м.к. патогена, диагностическая эффективность методов на 3-и сутки составляла: МФА – 40 %, ИХА – 0 %, ИФА – 60 %, культуральный – 100 %. На 5-е сутки возбудитель туляремии был выявлен во всех образцах с помощью бакте-

риоскопии, МФА и посева на плотные питательные среды (100 %). Чувствительность ИХА и ИФА при исследовании проб от животных этой группы на 5-е сутки зависела от заражающей дозы: при $1 \cdot 10^6$ м.к. она составляла 80 и 100 %, а при $1 \cdot 10^5$ м.к. – 50 и 80 % соответственно.

При снижении заражающей дозы до $1 \cdot 10^4$ м.к. возбудитель туляремии выявлен на 3-и и 5-е сутки в 20 и 60 % проб с помощью бактериоскопии соответственно, в 40 и 60 % – МФА, 0 и 20 % – ИХА, 20 и 80 % – ИФА, 80 и 100 % – при посеве на плотные питательные среды. На 8-й день, когда наблюдался падеж всех биопробных животных этой группы, чувствительность использованных диагностических приемов составляла от 100 % (бактериоскопия, МФА), 80 % (ИХА, ИФА) до 40 % (бактериологический анализ). При посеве материала от павших животных на плотные питательные среды не всегда удавалось получить рост колоний возбудителя туляремии из-за ингибирования посторонней микрофлорой.

При исследовании материала от животных, зараженных $1 \cdot 10^3$ – $1 \cdot 10^1$ м.к., туляремиальный микроб выявлен с помощью бактериоскопии в 20 % случаев на 3-и и 5-е сутки заболевания, МФА – 40 %, ИХА – 0 %, ИФА – 20–60 %. С помощью бактериологического анализа в материале от биопробных животных этой группы на 3-и сутки ни в одном случае культуру *F. tularensis* выделить не удалось, тогда как на 5-е сутки чувствительность метода составила 100 % и патоген выявлен во всех видах материала. На 8-е сутки эксперимента после падежа большинства животных диагностическая эффективность методических подходов зависела от использованной заражающей дозы (рисунок).

Исходя из полученных данных, видно, что при низкой заражающей дозе на ранних этапах развития заболевания у животных I группы наиболее информативными для выявления патогена являются МФА и ПЦР, тогда как к концу болезни – ИФА и ПЦР.

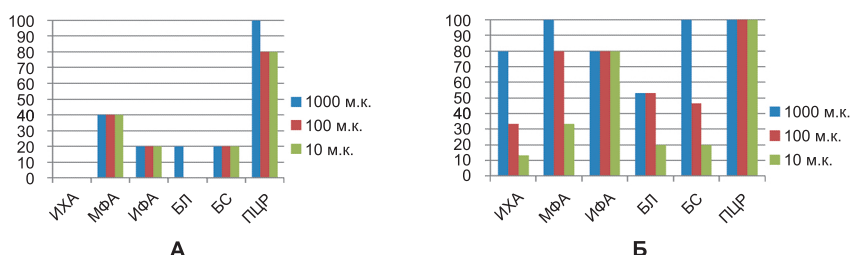
Эффективность использованных методов также отличалась для каждого вида материала. Наибольшая информативность МФА наблюдалась при исследовании мазков-отпечатков лимфоузлов и селезенки вне зависимости от сроков заболевания и количества клеток, использованных для заражения животных. В то же время в мазках-отпечатках печени, легкого и сердца возбудитель туляремии с помощью данного подхода был выявлен только к концу заболевания, когда происходит генерализация процесса и количество патогена в органах увеличивается до $1 \cdot 10^7$ м.к./г (мл) и выше.

Аналогичные результаты получены при использовании световой микроскопии и окраски мазков-отпечатков анилиновыми красителями по Граму. Возбудитель туляремии выявлен во всех исследованных пробах биологического материала в случае инфицирования животных высокими концентрациями туляремиального микроба. При более низкой заражающей дозе патоген детектирован только в образцах от животных на 8–9-е сутки.

Метод ИФА позволил обнаружить *F. tularensis* в суспензиях лимфоузлов, печени и селезенки на 3-и и 5-е сутки при введении животным $1 \cdot 10^6$ – $1 \cdot 10^5$ м.к. туляремиального микроба, и на 5–8-е сутки при дозе $1 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^1$ м.к. Выявление антигенов возбудителя туляремии данным способом в суспензиях легкого отмечено только к концу заболевания. С помощью ИХА туляремиальный микроб детектирован в пробах суспензий лимфоузлов, печени, селезенки, легкого биопробных животных только на 5–8-е сутки инфекционного процесса, когда в органах животных накапливается достаточное количество клеток патогена.

С использованием бактериологического анализа выделить культуру *F. tularensis* удалось в равной степени из всех исследованных видов биологического материала на 3-и и 5-е сутки при заражении животных высокими концентрациями возбудителя. При снижении заражающей дозы и увеличении сроков наблюдения за животными эффективность данного подхода снижалась. Так, на 5-е сутки патоген выявлен во всех видах биологического материала вне зависимости от количества клеток, использованных для инфицирования животных, а к 8-м суткам – он детектируется преимущественно в суспензиях легкого и сердца. Одной из причин отсутствия роста туляремиального микроба при посеве суспензий печени и селезенки от павших животных может быть их обильная контаминация посторонней микрофлорой. Возможно, исследование проб легкого и сердца позволит повысить информативность бактериологического анализа.

Полученные нами результаты в полной мере подтвердили диагностическую эффективность МФА, ИФА, бактериоскопии и бактериологического анализа для выявления туляремиального микроба в биологическом материале от животных в соответствии с действующими нормативно-методическими документами [6, 8]. Более того, несмотря на то, что к концу заболевания концентрация возбудителя туляремии в органах одинакова вне зависимости от заражающей дозы, на ранних стадиях болезни его количество в разных видах материала отличается. На основании



Диагностическая эффективность (%) различных методов при исследовании проб от животных с экспериментальной туляремией в зависимости от заражающей дозы (1000, 100 и 10 м.к.) и сроков исследования:

А – на 3-и сутки заболевания животных; Б – на 8-е сутки заболевания животных

анализа диагностической эффективности различных методов при исследовании суспензий легкого от животных, инфицированных различными концентрациями возбудителя туляремии, видно, что попадание патогена в ткани легких начинается сразу после заражения, однако его количество не превышает $1 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^5$ м.к./г (мл). Значительная микробная обсемененность данного органа достигается только к концу заболевания. Так, при заражении животных высокими концентрациями патогена (110^6 – $1 \cdot 10^5$ м.к.), уже на 3-и сутки заболевания, при исследовании суспензий легкого, выявлена ДНК *F. tularensis* и выделена культура патогена на плотной питательной среде, тогда как с помощью иммуносерологических методов обнаружить антигены возбудителя туляремии в этом же виде материала стало возможным только на 5-е сутки инфекционного процесса, когда животные пали. При инфицировании животных низкими концентрациями ($1 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^1$ м.к.) в пробах легкого ДНК патогена была детектирована на 3-и сутки заболевания, культура туляремийного микроба на плотной питательной среде выделена на 5-е сутки инфекционного процесса, а антигены возбудителя в иммуносерологических реакциях – только на 8-е сутки болезни. Полученные результаты указывают на возможность повышения информативности не только бактериологического анализа при исследовании суспензий легкого от больных животных, но и ПЦР.

Таким образом, нами установлена высокая диагностическая эффективность ПЦР с использованием наборов реагентов «Ген *Francisella tularensis* - РГФ» и «Ген *Francisella tularensis* - РЭФ» при выявлении туляремийного микроба в пробах биологического материала от животных с экспериментальной туляремией – не менее 98 %. Для других способов лабораторной диагностики туляремии данный показатель составил: ИФА – 70,4 %, МФА – 72,1 %, бактериоскопия – 54 %, бактериологический анализ – 64,3 %. Продemonстрирована возможность выявления антигенов туляремийного микроба в материале от животных методом ИХА на поздних сроках заболевания (в том числе после гибели). Показана возможность повышения информативности ПЦР и культурального метода путем дополнительного исследования суспензий легкого наряду с регламентированными для каждого метода видами биологического материала. Установлена перспективность использования ПЦР с зарегистрированными генодиагностическими препаратами в сочетании с другими методическими подходами для детекции возбудителя туляремии в материале от животных на ранних стадиях развития заболевания.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРА

1. Белькова С.А., Балахонов С.В. Индикация капсульного антигена чумного микроба в суспензиях органов мелких млекопитающих с применением иммунохроматографической тест-системы. *Дальневосточный журн. инф. патол.* 2014; 25:96–8.

2. Бугоркова С.А., Филимонова Д.Г. Оценка тяжести течения экспериментальной туляремийной инфекции по ряду морфометрических характеристик. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 2:9–53.

3. Олсуфьев Н.Г., Дунаева Т.Н. Природная очаговость. Эпидемиология и профилактика туляремии. М.; 1970. 272 с.

4. Осина Н.А., Сеничкина А.М., Бугоркова Т.В., Щербаклова С.А. Разработка амплификационных тест-систем для выявления возбудителя туляремии. *Пробл. особо опасных инф.* 2015; 2:54–7.

5. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности: МУ 1.3.2569 – 09.

6. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики туляремии для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней: МУ 4.2.2939-11.

7. Сеничкина А.М., Осина Н.А., Зайцев А.А., Усольцева Н.М., Усманова С.М. Апробация новых генодиагностических препаратов при эпизоотологическом мониторинге территорий Российской Федерации на наличие возбудителя туляремии. *Здоровье населения и среда обитания.* 2015; 6(267):43–6.

8. Эпидемиологический надзор за туляремией: МУ 3.1.2007-05.

9. Emanuel P.A., Bell R., Dang J.L., McClanahan R., David J.C., Burgess R.J., Thompson J., Collins L., Hadfield T. Detection of *Francisella tularensis* within Infected Mouse Tissues by Using a Hand-Held PCR Thermocycler. *J. Clin. microbiol.* 2003; 41(2): 689–93. DOI: 10.1128/JCM.41.2.689-693.20013

10. Rossow H., Forbes K.M., Tarkka E., Kinnunen P.M., Hemmila H., Huitu O., Nikkari S., Henttonen H., Kipar A., Vapalahti O. Experimental Infection of Voles with *Francisella tularensis* Indicates Their Amplification Role in Tularemia Outbreaks. *PLoS One.* 2014; 9(10):1–9. DOI: 10.1371/journal.pone.0108864.

11. Skottman T., Piiparinen H., Hyytiäinen H., Myllys V., Skurnik M., Nikkari S. Simultaneous real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2007; 26(2):207–11.

References

1. Bel'kova S.A., Balakhonov S.V. [Indication of plague microbe capsular antigen in suspensions of organ tissues from small mammals, using immune-chromatographic test-system]. *Dal'nevost. Zh. Infek. Patol.* 2014; 24:96–8.

2. Bugorkova S.A., Filimonova D.G. [Estimation of the severity of experimental tularemia against a number of morphometric characteristics]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 2:49–53.

3. Olsuf'ev N.G., Dunaeva T.N. [Natural Focality. Epidemiology and Prophylaxis of Tularemia]. M.; 1970. 272 p.

4. Osina N.A., Senichkina A.M., Bugorkova T.V., Shcherbakova S.A. [Development of amplification test-systems for tularemia agent detection]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2015; 2:54–7.

5. [Management of work in laboratories applying methods of amplification of nucleic acids when working with samples, containing microorganisms of the I–IV groups of pathogenicity]. Methodological regulations 1.3.2569-09.

6. [Procedure for organization and conducting laboratory diagnostics of tularemia for territorial, regional, and federal laboratory facilities]. Methodological regulations 4.2.2939-11.

7. Senichkina A.M., Osina N.A., Zaitsev A.A., Usol'tseva N.M., Usmanova S.M. [Approbation of new diagnostic preparations in the process of epizootiological survey of the territories of the Russian Federation for the presence of tularemia agent]. *Zdor. Naselen. Sreda Obit.* 2015; 6(267):43–6.

8. [Epidemiological surveillance over tularemia]. Methodological regulations 3.1.2007-05.

9. Emanuel P.A., Bell R., Dang J.L., McClanahan R., David J.C., Burgess R.J., Thompson J., Collins L., Hadfield T. Detection of *Francisella tularensis* within Infected Mouse Tissues by Using a Hand-Held PCR Thermocycler. *J. Clin. microbiol.* 2003; 41(2): 689–93. DOI: 10.1128/JCM.41.2.689-693.20013

10. Rossow H., Forbes K.M., Tarkka E., Kinnunen P.M., Hemmila H., Huitu O., Nikkari S., Henttonen H., Kipar A., Vapalahti O. Experimental Infection of Voles with *Francisella tularensis* Indicates Their Amplification Role in Tularemia Outbreaks. *PLoS One.* 2014; 9(10):1–9. DOI: 10.1371/journal.pone.0108864.

11. Skottman T., Piiparinen H., Hyytiäinen H., Myllys V., Skurnik M., Nikkari S. Simultaneous real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2007; 26(2):207–11.

Authors:

Senichkina A.M., Osina N.A., Abdrashitova A.S., Germanchuk V.G. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Сеничкина А.М., Осина Н.А., Абдрашитова А.С., Германчук В.Г. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 27.10.16.

В.В.Сутягин¹, Т.В.Мекка-Меченко², О.В.Когай¹, А.Т.Бердибеков¹**ДЛИТЕЛЬНОСТЬ СОХРАНЕНИЯ ГЕНОВ ЧУМНОГО МИКРОБА (*YERSINIA PESTIS*) В КОСТНЫХ ОСТАНКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**¹РГУ «Талдыкорганская противочумная станция», Талдыкорган, Республика Казахстан; ²Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций им. М.Айкимбаева, Алматы, Республика Казахстан

Цель работы. Определение длительности сохранения ДНК чумного микроба в костной ткани грызунов и его количественной динамики во времени под воздействием биотических (ДНК-азы посторонней микрофлоры) и абиотических (изменяющиеся влажность, температура, инсоляция) факторов. **Материалы и методы.** Невозможность в большинстве случаев провести датировку подобного полевого материала, приводит к снижению его информативности. О длительности сохранения капсульного антигена (FI) чумного микроба, выявляемого серологическим методом, в погадках и костях и динамики его снижения известно из более ранних исследований. После гибели подопытных животных, зараженных вирулентным штаммом чумного микроба, их скелеты освобождали от мягких тканей и помещали в условия, приближенные к естественным. Исследование костных останков на наличие в них фрагментов ДНК чумного микроба проводили непосредственно после гибели животных, а затем дважды в год. **Результаты и выводы.** Полученные данные позволили все костные останки павших от чумной инфекции млекопитающих условно разделить на три группы: с высоким, средним и низким содержанием бактерий. Дальнейшее их исследование показало, что через полгода в костной ткани животных снижения концентрации ДНК возбудителя чумы не происходит. После одного года зафиксировано резкое снижение (в 100 раз) наблюдаемых разведений материала, при которых еще возможно обнаружение детектируемых плазмид. Через полтора года наблюдений генов чумного микроба в костях экспериментальных животных обнаружить не удалось. С целью увеличения информативности при исследовании такого типа материала предложено воссоздать систему смотровых площадок по сбору погадок и костных останков млекопитающих.

Ключевые слова: *Yersinia pestis*, ПЦР, ДНК, плазмидные гены, костные останки, погадки.

Корреспондирующий автор: Виталий Владимирович Сутягин, e-mail: tpcstald@mail.ru.

V.V.Sutyagin¹, T.V.Mekka-Mechenko², O.V.Kogay¹, A.T.Berdibekov¹**Duration of Conservation of Plague Microbe (*Yersinia pestis*) Genes in Mammalian Bone Remains**¹"Taldykorgan Plague Control Station", Taldykorgan, Republic of Kazakhstan; ²M.Aykimbaev Kazakh Scientific Center for Quarantine and Zoonotic Infections, Almaty, Republic of Kazakhstan

Objective of this work was to determine the long-term preservation of *Yersinia pestis* DNA, detected by polymerase chain reaction (PCR) in the bone tissue of rodents, and to quantify content changes over time under the influence of biotic and abiotic factors. **Materials and methods.** After death of model animals infected with virulent *Y. pestis* strain, their skeletons were freed from soft tissues and placed in the environments where conditions were close to the natural ones. The study of bone remains for the presence of *Y. pestis* DNA fragments was held immediately after the death of the animals, and then, twice a year. **Results and conclusions.** The data obtained allow for dividing all the fossil remains of the fallen from plague infection mammals into three separate groups: with high, medium, and low content of bacteria. Further study demonstrates that reduction of *Y. pestis* DNA concentration in bone tissue of animals after six months of storage does not occur. After a year, a sharp decrease (100-fold) of observable material dilutions for which the identification of detected plasmids is still possible, is registered. After one and a half year of observation, the genes of plague microbe in the bones of experimental animals could not be found. In order to increase the information content of the study of this type of material put forward has been proposal to reestablish the system of observation sites to collect castings and bone remains of mammals.

Keywords: *Yersinia pestis*, PCR, DNA, plasmid genes, bone remains, castings.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Vitaly V. Sutyagin, e-mail: tpcstald@mail.ru.

Citation: Sutyagin V.V., Mekka-Mechenko T.V., Kogay O.V., Berdibekov A.T. Duration of Conservation of Plague Microbe (*Yersinia pestis*) Genes in Mammalian Bone Remains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 4:85–87. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-85-87

В последнее время в практику эпизоотологического обследования природных очагов чумы прочно вошел метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Однако его место и роль среди различных лабораторных методов все еще остаются недостаточно определенными. Притом, что исследовать с помо-

щью полимеразной цепной реакции можно весь перечень материала, поступающего в лаборатории противочумных станций, тем не менее, сам метод накладывает определенные ограничения на хранение и транспортировку исследуемых образцов.

Погадки хищных птиц и костные останки мле-

копитающих, являясь одним из индикаторов протекания эпизоотий, перед поступлением в лабораторию довольно длительное время могут находиться на земной поверхности, подвергаясь таким образом неблагоприятному воздействию природно-климатических факторов. Исследовать же подобный материал возможно лишь двумя методами: серологическим и ПЦР.

Между тем известно, что стабильность биологических молекул во времени существенно варьирует. Они претерпевают драматические постмортальные изменения даже в тех случаях, когда тела организмов достаточно хорошо сохранились. В условиях, близким к физиологическим, вероятность сохранения ДНК очень ничтожна. Молекулы ДНК чрезвычайно восприимчивы к окислительным и гидролитическим повреждениям, любые изменения быстро ее дестабилизируют, образуя одностранные разрывы. Поэтому непосредственно после смерти молекулы ДНК быстро распадаются, и этот процесс начинается с автолиза [3].

Проводя анализ костных останков из древних захоронений людей [4–7] на наличие в них следов чумного микроба, следует учитывать, что данный материал находился длительное время в «законсервированном» состоянии (при достаточно низкой температуре без значительных колебаний, а также без воздействия солнечной инсоляции и изменяющейся влажности).

О длительности сохранения капсульного антигена (FI) возбудителя чумы, выявляемого серологическим методом, в погадках и костях, находящихся в естественных природных условиях, известно из экспериментальных работ, проводимых, в том числе и на Талдыкорганской противочумной станции [1]. О длительности сохранения и индикации ДНК чумного микроба в погадках и костных останках млекопитающих, а также динамики их снижения во времени на территории Среднеазиатского пустынного очага чумы информации нет.

В связи с вышеизложенным нами в 2014 г. были начаты работы по применению метода ПЦР при детекции возбудителя чумы в костных останках млекопитающих [2].

Цель работы – определение длительности сохранения ДНК чумного микроба в костной ткани грызунов и его количественной динамики во времени под воздействием биотических (ДНК-азы постронной микрофлоры) и абиотических (изменяющиеся влажность, температура, инсоляция) факторов.

Материалы и методы

В сентябре 2014 г. было произведено заражение десяти морских свинок музейным штаммом *Y. pestis* KA-68 (работа с лабораторными животными проводилась согласно рекомендациям Биоэтической комиссии Талдыкорганской противочумной станции). Данный штамм является типичным для Среднеазиатского пустынного очага чумы и содер-

жит гены *pla* и *caf*, расположенные на плаزمиде *pPst* и *pFra*. Заражение лабораторных животных проводили внутрибрюшинно путем введения 1 мл микробной взвеси концентрацией $1 \cdot 10^9$ м.к. в 1 мл.

После гибели подопытных животных их скелеты освобождали от мягких тканей, обеззараживали и исследовали в ПЦР с детекцией результатов методом гель-электрофореза по методике, изложенной в инструкциях к коммерческим тест-системам. Для выделения ДНК использовали набор реактивов для универсальной пробоподготовки «GenPak» (фирма ООО «Лаборатория Изоген», Москва).

Амплификацию образцов проводили с помощью трех наборов: набор реагентов для обнаружения ДНК *Y. pestis* гена *pla* (расположенного на плазмиде *pPst*) «GenPak» (фирма ООО «Лаборатория Изоген», Москва, РФ); набор реагентов «Pest-Quest», предназначенный для выделения ДНК возбудителя *Y. pestis* и содержащий праймеры для выявления генов *YPO-2088* и *cafI* (ТОО «master-gene», Алматы, РК); ПЦР-тест-система «ГенПест», содержащая две пары праймеров *PlaY1–PlaY2*, соответствует нуклеотидной последовательности гена *pla* (плазида *pPst*) и *F21–F22*, комплементарна участку гена *caf* (плазида *pFra*) (РосНИПЧИ «Микроб», РФ).

Наибольшие разведения, при которых происходила детекция ДНК возбудителя чумы, наблюдали при использовании ПЦР-тест-системы «ГенПест». Визуализацию результатов ПЦР производили под УФ в 1,5 % агарозном геле с бромистым этидием.

Первоначально исследовали концентрированный материал. Далее, при получении положительного результата, материал подвергали последовательному десятикратному разведению для уточнения концентрации хромосомных и плазмидных генов. После этого кости морских свинок были заложены в железный ящик с крышкой (крышка с отверстиями размером 1×1 см). Опечатанный ящик был выставлен на огороженный участок охраняемой территории эпидотряда, круглогодично подвергаясь, таким образом, воздействию различных природно-климатических факторов.

Исследование костных останков морских свинок на наличие в них фрагментов ДНК чумного микроба проводили непосредственно после гибели животных, а затем дважды в год.

Результаты и обсуждение

Установлено, что при гибели грызунов от чумы в их костной ткани возможно обнаружение ДНК возбудителя как в высоких концентрациях, так и в низких [1]. Однако высокие титры (1:200000) регистрируются лишь у малой части особей. По нашим данным, только у 10 % зараженных животных наблюдаются довольно высокие показатели накопления плазмидных генов *Y. pestis* в костях. У части млекопитающих (20 %) титры накопления в костной ткани *Y. pestis* можно считать средними (1:20000). У большинства же животных в костях, по нашим на-

блюдениям, накапливается относительно низкое количество микробных клеток, выявляемых лишь в разведении 1:400, или такая концентрация, которая не обнаруживается ни одним из этих методов.

Учитывая вышесказанное, костные останки павших от чумной инфекции млекопитающих мы условно разделили на три группы: с высоким, средним и низким содержанием чумного микроба. Наблюдение за каждой группой костей проводилось отдельно друг от друга.

Через шесть месяцев в костной ткани животных снижения концентрации плазмидных генов не зафиксировано. Однако стоит отметить, что первые полгода наблюдений пришлось на осенне-зимний период, когда материал большую часть времени находился в относительно стабильных условиях при низкой температуре.

По прошествии одного года мы зафиксировали резкое снижение (в 100 раз) наблюдаемых разведений материала, при которых еще возможно обнаружение детектируемых плазмид. Полтора года наблюдений показало, что в костных останках млекопитающих, плазмидных генов чумного микроба обнаружить уже не удастся.

Ниже для сравнения представлены данные по динамике снижения капсульного антигена (FI) в костях больших песчанок (таблица) [1].

Таким образом, в связи с тем, что полноценный антиген и ДНК *Y. pestis* в костях грызунов сохраняются в течение 1–1,5 лет, а в костях умерших от чумы грызунов изначально накапливается (в связи с различной индивидуальной чувствительностью, разным количеством возбудителя) данный вид полевого материала теряет свою информативность в плане невозможной его датировки. Чтобы избавиться от этого дефекта и иметь возможность использовать перспективный метод характеристики энзоотического процесса, необходимо заново воссоздать систему смотровых площадок по сбору погадок и костей, которая действовала на Талдыкорганской противочумной станции в 1989–1995 гг.

Техника закладки таких «датированных» площадок довольно проста. Для них выбирают уже существующие приседы хищных птиц (геодезические пункты, одиночно стоящие деревья, столбы электропередач и т.д.), или готовятся искусственные туры на верхушке барханов, где хищники до этого вынуждены были садиться на песок. Далее, эти площадки проверяют два раза в год или чаще. С площадок собирают кости млекопитающих и погадки пернатых, получая тем самым строго датированный материал.

При использовании данного подхода контур

Снижение среднеемметрических титров содержания капсульного антигена чумного микроба в костных останках млекопитающих

Реакция	Время наблюдения					
	После гибели песчанок	6 месяцев	1 год	1,5 года	5 лет	6–26 лет
РНГА	1:21450	1:115	1:25	0	0	0
РНАт	1:27020	1:3716	1:2941	1:2032	1:1016	1:83

пунктов и частота положительных результатов почти полностью совпадали с эпизоотическим контуром, полученном при бактериологическом исследовании носителей и переносчиков и при поиске песчанок с антителами.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Новиков Г.С. Поиск антигена фракции I как метод эпизоотического надзора за чумой на очаговых и потенциально очаговых территориях. *Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане*. 2001; 3:323–5.
- Сутягин В.В., Кислицын Ю.В., Лездиньш И.А., Когай О.В., Ким И.Б., Бердибеков А.Т., Сапожников В.И., Копбаев Е.Ш., Шагайбаева Г.Ж., Наурузбаев М.О. О применении полимеразной цепной реакции для детекции чумного микроба в костных останках млекопитающих. *Карантинные и зоонозные инф. в Казахстане*. 2014; 2:70–7.
- Челомина Г.Н. Древняя ДНК. *Генетика*. 2006; 42(3):293–309.
- Drancourt M., Aboudharam G., Signoli M., Dutour O., Raoult D. Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 1998; 95:12637–40.
- Drancourt M., Signoli M., Dang L.V., Bizot B., Roux V., Tzortzis S., Raoult D. *Yersinia pestis* Orientalis in remains of ancient plague patients. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(2):332–3.
- Harbeck M., Seifert L., Hansch S., Wagner D.M., Birdsell D., Parise K.L., Wiechmann I., Grupe G., Thomas A., Keim P., Zoller L., Bramanti B., Riehm J.M., Scholz H.S. *Yersinia pestis* DNA from skeletal remains from the 6th century AD reveals insights into Justinianic Plague. *Plos. Patog.* 2013; 9(5):e1003349. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003349.
- Tran N.N., Signoli M., Fozzati L., Aboudharam G., Raoult D., Drancourt M. High throughput, multiplexed pathogen detection authenticates plague waves in Medieval Venice, Italy. *PLoS ONE*. 2011. 6(3):e16735. DOI: 10.1371/journal.pone.0016735.

References

- Novikov G.S. [Search of antigen fraction I as a method of epizootological surveillance over plague in focal and potentially focal territories]. *Karantin. Zoonoz. Infek. v Kazakhstane*. 2001; 3:323–5.
- Sutyagin V.V., Kislytsyn Yu.V., Lezdin'sh I.A., Kogay O.V., Kim I.B., Berdibekov A.T., Sapozhnikov V.I., Kopbaev E.Sh., Shagaibaeva G.Zh., Nauruzbaev M.O. [Concerning application of polymerase chain reaction for the detection of plague microbe in bone remains of mammals]. *Karantin. Zoonoz. Infek. v Kazakhstane*. 2014; 2:70–7.
- Chelomina G.N. [Ancient DNA]. *Genetika*. 2006; 42(3):293–309.
- Drancourt M., Aboudharam G., Signoli M., Dutour O., Raoult D. Detection of 400-year-old *Yersinia pestis* DNA in human dental pulp: an approach to the diagnosis of ancient septicemia. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 1998; 95:12637–40.
- Drancourt M., Signoli M., Dang L.V., Bizot B., Roux V., Tzortzis S., Raoult D. *Yersinia pestis* Orientalis in remains of ancient plague patients. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(2):332–3.
- Harbeck M., Seifert L., Hansch S., Wagner D.M., Birdsell D., Parise K.L., Wiechmann I., Grupe G., Thomas A., Keim P., Zoller L., Bramanti B., Riehm J.M., Scholz H.S. *Yersinia pestis* DNA from skeletal remains from the 6th century AD reveals insights into Justinianic Plague. *Plos. Patog.* 2013; 9(5):e1003349. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003349.
- Tran N.N., Signoli M., Fozzati L., Aboudharam G., Raoult D., Drancourt M. High throughput, multiplexed pathogen detection authenticates plague waves in Medieval Venice, Italy. *PLoS ONE*. 2011. 6(3):e16735. DOI: 10.1371/journal.pone.0016735.

Authors:

Sutyagin V.V., Kogay O.V., Berdibekov A.T. Taldykorgan Plague Control Station. 104, Tauelsizdik St., Taldykorgan, 004000, Republic of Kazakhstan. E-mail: tpstead@mail.ru.

Mekka-Mechenko T.V. M.Aykimbaev Kazakh Scientific Center for Quarantine and Zoonotic Infections. 14, Kapalskaya St., Almaty, 050054, Republic of Kazakhstan. E-mail: tmeka-mechenko@kscqzd.kz.

Об авторах:

Сутягин В.В., Когай О.В., Бердибеков А.Т. Талдыкорганская противочумная станция. Республика Казахстан, 004000, г. Талдыкорган, ул. Тауелсиздик, д. 104. E-mail: tpstead@mail.ru.

Мекка-Меченко Т.В. Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций им. М.Айкимбаева. Республика Казахстан, 050054, г. Алматы, ул. Капальская, 14. E-mail: tmeka-mechenko@kscqzd.kz.

Поступила 22.09.16.

Н.Б.Челдышова, А.А.Крицкий, Ю.В.Лозовский, Н.П.Гусева

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ MLVA-АНАЛИЗ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* КЛАССИЧЕСКОГО БИОВАРА, ВЫДЕЛЕННЫХ В РОССИИ И ЗА РУБЕЖОМ

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

Цель работы. Определение филогенетического родства штаммов *V. cholerae* классического биовара, выделенных в период с 1937 по 1969 год в России, со штаммами из ближнего и дальнего зарубежья. **Материалы и методы.** В работе использовано 27 штаммов *Vibrio cholerae* классического биовара. ПЦР проводили на амплификаторе «БИС M112». Для секвенирования использовали генетический анализатор ABI 3500xl. MLVA-анализ вели по 5 MLVA-локусам (VC0147, VC0436-0437, VC1650, VCA0171, VCA0283). Питательные потребности и продукцию растворимой гемагглютини/протеазы определяли чашечным методом. **Результаты и выводы.** Выявлено 8 MLVA-кластеров и 21 MLVA-тип. Установлено, что штаммы, выделенные в период атипичной вспышки холеры в России в 1942–1943 гг., фено- и генотипически неоднородны и относятся к двум различным группам, одна из которых родственна изоляту, выделенному при вспышке холеры в Хабаровске в 1938 г., а вторая – штаммам из Индии и Китая, выделенным в 1946 и 1949 гг. соответственно.

Ключевые слова: *V. cholerae* классического биовара, MLVA-кластер, MLVA-тип, MLVA-профиль.

Корреспондирующий автор: Надежда Борисовна Челдышова, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

N.B.Cheldyshova, A.A.Kritsky, Yu.V.Lofovsky, N.P.Guseva

Comparative MLVA-Analysis of *Vibrio cholerae* Strains of Classical Biovar, Isolated in the Russian Federation and Abroad

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Objective of the study is to determine phylogenetic affinity of the *Vibrio cholerae* strains of classical biovar, isolated between 1937 and 1969 in Russia, to the strains from near and far abroad countries. **Materials and methods.** Utilized were 27 *Vibrio cholerae* strains of classical biovar. PCR was carried out applying “BIS M112” amplifier. Genetic analyzer ABI 3500xl was used for sequencing of the strains. MLVA-analysis was performed by reference to 5 MLVA-loci: VC0147, VC0436-0437, VC1650, VCA0171, and VCA0238. Nutrient requirement and soluble hemagglutinin/protease production was established using plate method. **Results and conclusions.** Identified have been 8 MLVA-clusters and 21 MLVA-types. It is determined that the strains, isolated during atypical cholera outbreak 1942–1943 in Russia, are inhomogeneous as regards phenotype and genotype and fall into two separate groups, one of which is related to the strain, isolated during cholera outbreak 1938 in Khabarovsk, and another group – to the strains from India and China, isolated in 1946 and 1949, respectively.

Key words: *V. cholerae* of classical biovar, MLVA-cluster, MLVA-type, MLVA-profile.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Nadezhda B. Cheldyshova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Cheldyshova N.B., Kritsky A.A., Lofovsky Yu.V., Guseva N.P. Comparative MLVA-Analysis of *Vibrio cholerae* Strains of Classical Biovar, Isolated in the Russian Federation and Abroad. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 4:88–92. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-88-92

Vibrio cholerae классического биовара считается возбудителем первых шести пандемий холеры, отличавшихся тяжелым течением болезни и высокой летальностью (около 42–50 %) [2, 4, 5]. В 60-х годах XX столетия произошла смена биовара возбудителя холеры с классического на биовар Эль Тор, явившийся причиной 7-й пандемии холеры. Холерные вибрионы биовара Эль Тор достаточно быстро распространились по всему земному шару, практически полностью вытеснив классические холерные вибрионы. Однако полного прекращения циркуляции холерных вибрионов классического биовара не произошло. Несмотря на то, что 6-я пандемия холеры закончилась к 1926 г., отдельные вспышки классической (азиатской) холеры продолжали регистрировать вплоть до 1960 г. в Индии, Китае, Пакистане,

Афганистане и других странах [2]. В России в этот период произошло две вспышки азиатской холеры. Первая из них, зафиксированная в Хабаровске в 1938 г., была быстро локализована и ликвидирована. Ее продолжительность составила 49 дней, холерой заболело 57 человек, летальных случаев не зафиксировано. Вторая, бо́льшая по масштабам распространения, вспышка холеры, вызванная классическими вибрионами, наблюдалась на территории Нижнего Поволжья и Башкирии в 1942–1943 гг. Она отличалась нехарактерно большим для классической холеры количеством легких и стертых клинических форм, длительным вибрионосительством на фоне высокой летальности в случае тяжелого течения болезни (41,2 %) и сравнительно небольшим распространением инфекции, преимущественно контактно-

бытовым путем [2].

Ряд крупных вспышек классической холеры наблюдался и после начала 7-й пандемии холеры: в Бангладеш в 1982, 1988–1989 гг., Мексике в 1991–1997 гг. и Непале в 2012 г. [6, 12, 13, 14]. Выделение единичных штаммов классического биовара отмечалось и при вспышке холеры в Иране в 2012 г. [7], а также из прибрежных вод Черного моря и внутренних водоемов в районе Тбилиси [11]. Интересен и тот факт, что, начиная с 90-х годов XX столетия, участились случаи выделения от больных и из внешней среды штаммов, несущих признаки как классического, так и Эль Тор биоваров [3, 8, 12, 13]. В настоящее время практически все выделяемые от людей токсигенные штаммы биовара Эль Тор несут в своем составе профаг с геном *ctxB1*, характерным для классических вибрионов [3]. В связи с этим некоторыми авторами высказано предположение о его получении непосредственно от холерных вибрионов классического биовара [12]. Все вышесказанное свидетельствует о том, что холерные вибрионы классического биовара, несмотря на то, что утратили прежнюю эпидемическую значимость, все же способны вызывать единичные случаи и вспышки холеры, а их потенциальная способность служить донорами отдельных мобильных генетических элементов, таких как профаг СТХф с геном *ctxB1*, ответственным за синтез В-субъединицы холерного токсина классического типа. Это говорит о необходимости их дальнейшего изучения.

Согласно исследованиям зарубежных и отечественных авторов, геном холерных вибрионов классического биовара в отличие от генома Эль Тор вибрионов является достаточно стабильным по присутствию основных детерминант вирулентности [9]. В то же время до сих пор остается недостаточно изученным вопрос о геномном разнообразии классических штаммов холерного вибриона и их филогенетических связях.

Целью данной работы явилось определение филогенетического родства штаммов *V. cholerae* классического биовара, выделенных в период с 1937 по 1969 год в России, со штаммами из ближнего и дальнего зарубежья.

Для этих целей нами был использован метод MLVA-типирования (MLVA – от *Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis*) по 5 MLVA-локусам (VC0147, VC0436-0437, VC1650, VCA0171, VCA0283), хорошо зарекомендовавший себя для дифференциации холерных вибрионов биовара Эль Тор. В основе метода MLVA-типирования лежит сравнительный анализ количества переменных повторов в 5 VNTR-локусах [1, 8].

Материалы и методы

В работе использовано 27 штаммов *V. cholerae* классического биовара (таблица), 13 из них было выделено в различных регионах России в 1942–1943 гг.,

1 штамм – в Хабаровске в 1938 г., 13 штаммов – на территории различных стран Средней, Южной и Юго-Восточной Азии (Туркмения, Пакистан, Индия, Китай, Корея). Указанные штаммы были получены из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» (ГКПБ «Микроб»), где они хранились в лиофилизированном состоянии. Культивирование бактерий осуществляли на бульоне и агаре Luria-Bertani (LB).

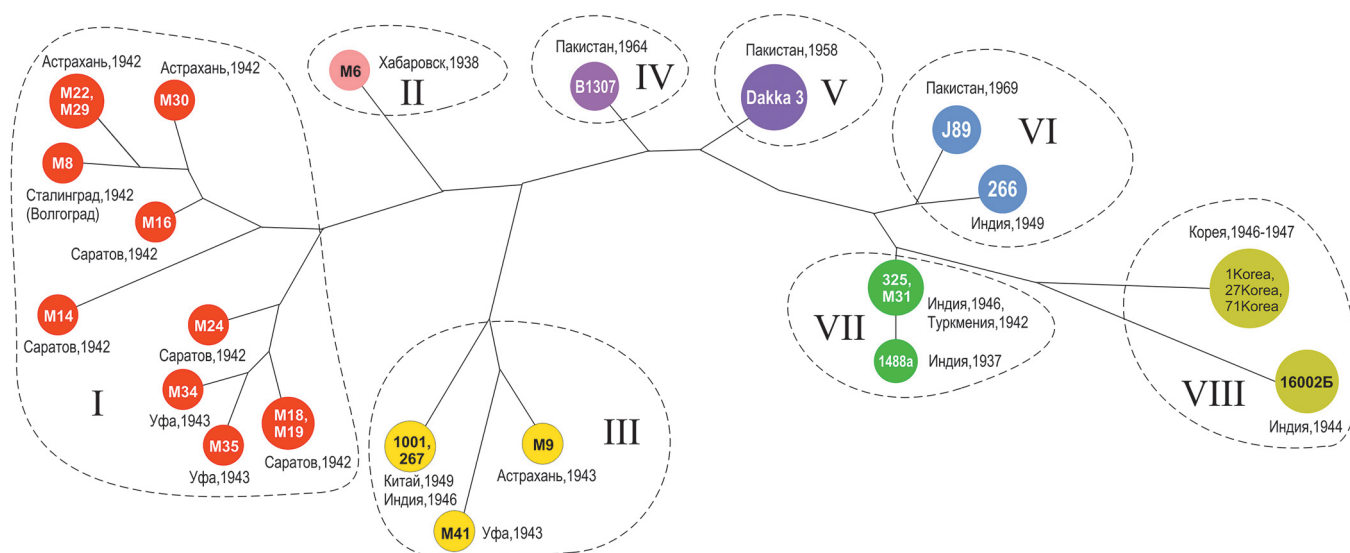
MLVA-типирование осуществляли с помощью специфических праймеров к 5 указанным выше MLVA-локусам холерного вибриона [8]. ПЦР проводили на амплификаторе с нагреваемой крышкой «БИС M112» по программе, описанной ранее [8]. Для секвенирования полученных ампликонов использовали генетический анализатор ABI 3500xl. Первичный анализ полученной нуклеотидной последовательности и определение числа tandemных повторов проводили с помощью программы MEGA 5.0. Построение филогенетического дерева осуществляли с помощью программы «BioNumerics 7.0» (Applied Maths, Бельгия) с использованием метода «максимальной бережливости» (Maximum parsimony).

Питательные потребности штаммов холерного вибриона определяли на минимальной среде с добавлением различных аминокислот, оснований и витаминов в концентрации 20–40 мкг/мл [4]. Продукцию растворимой гемагглютинин/протеазы (НА/Р – от *haemagglutinin/tease*) выявляли путем посева культур на агар, содержащий 1,0 % обезжиренного молока [4].

Результаты и обсуждение

В результате проведенного мультилокусного анализа 27 штаммов холерного вибриона классического биовара выявлен 21 MLVA-тип и 8 MLVA-кластеров (рисунок). Эти данные свидетельствуют о разнообразии геномов изученных штаммов классического биовара по MLVA-локусам.

В первый, наибольший по численности MLVA-кластер, вошли 11 из 13 штаммов, выделенных в 1942–1943 гг. в России, что указывает на их близкое генетическое родство. Кроме того, 2 MLVA-типа в пределах этого кластера состояли сразу из 2 штаммов, что свидетельствует об их клональном происхождении. MLVA-профили этих штаммов были идентичны или отличались лишь по наиболее варибельному локусу VCA0283 (таблица). Ни один из штаммов, выделенных в других странах, не вошел в I MLVA-кластер. Проведенные нами ранее исследования показали, что данная группа штаммов отличалась рядом фено- и генотипических особенностей. Все штаммы этой группы были ауксотрофами [4] в результате мутации в гене *purE* [5]. Кроме того, они не продуцировали НА/Р, были вирулентны и обладали повышенной продукцией холерного токсина (СТ – от *cholera toxin*) и токсин-корегулируемых пилей адгезии (TCP – от *toxin-coregulated pilus*) [4],



Филогенетическое дерево, построенное на основе MLVA-типирования по 5 VNTR-локусам штаммов *Vibrio cholerae* классического биовара, выделенных с 1937 по 1969 год на территории России и стран ближнего и дальнего зарубежья. MLVA-типы изображены кружками, в которых указаны номера, входящих в них штаммов. MLVA-типы, входящие в один MLVA-кластер, выделены одним цветом и контурной штриховкой

что, как показано нами ранее [5], связано с наличием у них ряда мутаций в регуляторных генах *proS* и *hapR*.

Наиболее близким по MLVA-профилю к штаммам I кластера оказался штамм M6, выделенный в

Хабаровске в 1938 г., который входил во II MLVA-кластер (рисунок). Его MLVA-профиль по 3 из 5 локусов был близок к I MLVA-кластеру (таблица). Исследование данного штамма на питательные потребности и продукцию НА/Р показало, что он

MLVA-профили штаммов *Vibrio cholerae* классического биовара

MLVA-кластер	№ штамма	Место и год выделения	Количество повторов в MLVA-локусах				
			VCO147 AACAGA	VC0436-0437 AACAGA	VC1650 GATAATCCA	VCA0171 TGCTGT	VCA0283 ACCAGA
I	M8	Сталинград (Волгоград), 1942	12	5	3	20	31
I	M14	Саратов, 1942	10	5	3	17	32
I	M16	Саратов, 1942	12	5	3	12	22
I	M18	Саратов, 1942	11	5	3	15	27
I	M19	Саратов, 1942	11	5	3	15	27
I	M22	Астрахань, 1942	12	5	3	16	26
I	M24	Саратов, 1942	11	5	3	12	34
I	M29	Астрахань, 1942	12	5	3	16	30
I	M30	Астрахань, 1942	12	5	3	15	34
I	M34	Уфа, 1943	11	5	3	18	35
I	M35	Уфа, 1943	11	5	4	16	31
II	M6	Хабаровск, 1938	12	4	3	13	16
III	1001	Китай, 1949	9	3	3	12	28
III	267	Индия, 1946	9	3	3	12	22
III	M9	Астрахань, 1942	9	4	3	23	24
III	M41	Уфа, 1943	9	4	3	9	7
IV	B1307	Пакистан, 1964	8	4	3	20	26
V	Dacca 3	Пакистан, 1958	8	4	3	21	26
VI	266	Индия, 1949	8	3	3	16	17
VI	J89	Пакистан, 1969	8	3	3	23	30
VII	M31	Туркмения, 1942	8	3	3	7	20
VII	1488a	Индия, 1937	8	3	3	7	8
VII	325	Индия, 1946	8	3	3	7	20
VIII	27 Korea	Корея, 1946	8	3	3	7	22
VIII	71 Korea	Корея, 1946	8	3	3	7	20
VIII	1 Korea	Корея, 1947	8	3	3	7	26
VIII	16002Б	Индия, 1944	9	3	3	11	22

так же, как и атипичные штаммы 1942 г., является ауксотрофом по аденину и не продуцирует НА/Р. Следует отметить, что остальные 15 штаммов *V. cholerae* классического биовара были прототрофами и продуцировали достаточное количество НА/Р. Более того, в литературных источниках нам ни разу не встретилось упоминание о выделении штаммов, обладающих сразу двумя указанными фенотипическими особенностями (ауксотрофностью по аденину и отсутствием продукции НА/Р). Учитывая фенотипические особенности хабаровского штамма, а также близость его MLVA-профиля с MLVA-профилем атипичных штаммов 1942 г., мы пришли к выводу, что указанные штаммы имеют близкое генетическое родство.

Штаммы М9 и М41, также выделенные в 1942–1943 гг. в период атипичной вспышки холеры в России, но несколько отличающиеся по фенотипическим характеристикам (прототрофы, НА/Р⁺, гипопродукция СТ, отсутствуют мутации в генах *hapR*, *rpoS* и *purE* [4, 5]), были отнесены к III MLVA-кластеру, как и штаммы 1001 (Китай, 1949 г.) и 267 (Индия, 1946 г.). Это говорит, во-первых, о генетическом родстве двух прототрофных штаммов 1942 г. со штаммами, выделенными через несколько лет в Индии и Китае, а во-вторых, о различном происхождении штаммов, выделенных во время вспышки холеры в России в 1942–1943 гг. MLVA-профили ауксотрофных и прототрофных штаммов, выделенных в России в 1942–1943 гг., отличались по 4 из 5 MLVA локусов (таблица).

Другие штаммы классического биовара сформировали еще 5 MLVA-кластеров, достаточно удаленных от кластеров штаммов, выделенных в России (рисунок), что свидетельствует о значительном разнообразии холерных вибрионов классического биовара по MLVA-локусам, даже в тех случаях, когда штаммы были выделены на одних и тех же территориях в разные годы. Так, три штамма, выделенные в Пакистане в 1958–1969 гг., входили в три различных MLVA-кластера (IV, V и VI). При этом IV и V кластеры включали только по одному штамму, что говорит об их отличии от других штаммов и друг от друга. VI кластер включал штаммы из Пакистана (J-89) и Индии (266). Интересно, что, несмотря на то, что между их выделениями прошло 20 лет (штамм 266 выделен в 1949 г., а штамм J-89 – в 1969 г.), эти изоляты оказались достаточно близкими по MLVA-профилю и отличались лишь по 2 наиболее переменным локусам, расположенным на II хромосоме (8,3,3,16,17 и 8,3,3,23,30 соответственно), что и позволило им сформировать один MLVA-кластер. В то же время штаммы 267 и 325, выделенные в один год в Индии, отличались по 3 MLVA-локусам (таблица), в связи с чем они вошли в разные MLVA-кластеры (рисунок).

Два индийских штамма (325 и 1488a) и 1 штамм (М31), выделенный в Туркмении в 1942 г., входили в VII MLVA-кластер. При этом штаммы М31 и 325

сформировали один MLVA-тип, а их MLVA-профили были идентичны (8, 3, 3, 7, 20), что говорит об их клональном происхождении. В то же время, тот факт, что все три штамма располагаются на одной ветви, может свидетельствовать о том, что штаммы М31 и 325 являются близкими родственниками индийского изолята 1488a, выделенного в 1937 г. и отличающегося от двух других штаммов этого кластера только по локусу VCA0283 (таблица). Возможно, все 3 указанных штамма произошли от общего предка, циркулировавшего на территории Индии еще до 1937 г. При этом одна часть дериватов этого штамма сохранила прежний MLVA-профиль (М31 и 325) и была занесена на территорию Туркмении (М-31), а другая – под действием изменившихся факторов среды утратила 12 дополнительных повторов в указанном локусе (штамм 1488a).

Восьмой MLVA-кластер включал штаммы из Кореи (Korea 1, Korea 27 и Korea 71), выделенные в 1946–1947 гг., и штамм 16002Б из Индии 1944 г. (рисунок). С учетом того, что указанные штаммы сформировали один MLVA-кластер, можно предположить, что они произошли от общего предка. Следует также отметить клональность происхождения корейских штаммов, которые образовали один MLVA-тип, хотя и были выделены в разные годы. MLVA-профили корейских штаммов отличались только по наиболее вариабельному локусу VCA0283 (таблица).

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что штаммы *V. cholerae* классического биовара, выделенные в различных регионах мира в период с 1937 по 1969 год, отличались значительным разнообразием по MLVA-локусам. Показано, что атипичная вспышка азиатской холеры в 1942–1943 гг. в России была вызвана двумя фенотипически и филогенетически различными группами штаммов. Одна из которых была представлена ауксотрофами, являющимися гиперпродуцентами СТ, но не продуцирующими НА/Р, родственными ауксотрофному НА/Р[–] изоляту из Хабаровска (1938 г.), вторая – прототрофами, с низкой продукцией СТ, НА/Р⁺ штаммами, имеющими общее происхождение со штаммами из Индии (1946 г.) и Китая (1949 г.). Полученные данные о близкородственном происхождении большинства атипичных штаммов и штамма из Хабаровска, отличавшихся отсутствием продукции НА/Р, которая на поздней стадии клинического процесса разрушает рецепторы кишечного эпителия, способствуя выходу холерного вибриона во внешнюю среду [4, 10], могут указывать на возможность длительного сохранения подобных штаммов в межвспышечный период в виде длительного вибрионистельства и развития латентных форм инфекции. В связи с тем, что указанный механизм открепления холерных вибрионов от клеток кишечного эпителия является общим для штаммов классического и Эль Тор биоваров, возможность длительного сохранения вибрионов, лишенных НА/Р, следует учитывать при проведении противоэпидемических мероприятий.

Авторы приносят глубокую благодарность канд. хим. наук, зав. лаб. геномного и протеомного анализа Краснову Я.М. за помощь в построении филогенетического дерева.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин М.Б., Сучков И.Ю. Вариабельные тандемные повторы, выявленные при компьютерном анализе генома *Vibrio cholerae*. Биотехнология. 2001; 6:85–8.
2. Покровский В.И., редактор. Холера в СССР в период VII пандемии. М.; 2000. 472 с.
3. Смирнова Н.И., Кульшань Т.А., Краснов Я.М. MLVA-типирование клинических штаммов *Vibrio cholerae*, изолированных в разные периоды текущей пандемии холеры. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2015; 1:15–22. DOI: 10.3103/S0891416815010085.
4. Смирнова Н.И., Челдышова Н.Б., Заднова С.П., Кутырев В.В. Молекулярно-генетические особенности штаммов *Vibrio cholerae* *classica*, вызвавших эпидемию азиатской холеры в России в 1942 г. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2001; 4:12–6.
5. Челдышова Н.Б., Крицкий А.А., Краснов Я.М., Смирнова Н.И. Анализ результатов фрагментарного и полногеномного секвенирования атипичных штаммов *Vibrio cholerae* классического биовара, вызвавших вспышку азиатской холеры в России. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2015; 20(5):24–31.
6. Alam M., Islam M.T., Rashed S.M., Johura F.T., Bhuiyan N.A., Delgado G., Morales R., Mendez J.L., Navarro A., Gil A.I., Watanabe H., Morita M., Nair B., Cravioto A. *Vibrio cholerae* classical biotype strains reveal distinct signatures in Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50 (7):2212–6. DOI:10.1128/JCM.00189-12.
7. Bakhshi B., Boustanshenas M., Mahmoudi-Aznavah A. Emergence of *Vibrio cholerae* O1 classical biotype in 2012 in Iran. *Lett. Appl. Microbiol.* 2014; 58 (2):145–9. DOI:10.1111/lam.12167.
8. Choi S.Y., Lee J.H., Jeon Y.S., Lee H.R., Kim E.J., Ansaruzzaman M., Bhuiyan N.A., Endtz H.P., Niyogi S.K., Sarkar B.L., Nair G.B., Nguen B.M., Hien N.T., Czerkinsky C., Clemens J.D., Chun J., Kim D.W. Multilocus variable-number tandem repeat analysis of *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains harbouring classical toxin B. *J. Med. Microbiol.* 2010; 59(7):763–9. DOI: 10.1099/jmm.0.017939-0.
9. Dziejman M., Balon E., Boydet D., Fraser C.M., Heidelberg J.F., Mekalanos J.J. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002; 99:1556–61. DOI: 10.1073/pnas.042667999.
10. Hase C.C., Finkelstein R.A. Cloning and nucleotide sequence of the *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease (HA/Protease) gene and construction of an HA/Protease-negative strain. *J. Bacteriol.* 1991; 173:3311–17.
11. Kokashvili T., Elbakidze T., Jaiani E., Janelidze N., Kamkamidze G., Whitehouse C., Huq A., Tediashvili M. Comparative phenotypic characterization of *Vibrio cholerae* isolates collected from aquatic environments of Georgia. *Georgian Med. News.* 2013; 224:55–62.
12. Longini I.M. Jr., Yunus M., Zaman K., Siddique A.K., Sack R.B., Nizam A. Epidemic and endemic cholera trends over a 33-year period in Bangladesh. *J. Infect. Dis.* 2002; 186(2):246–51. DOI: 10.1086/341206.
13. Pun S.B. The first appearance of classical-like phenotype

Vibrio cholerae in Nepal. *N. Am. J. Med. Sci.* 2014; 6(4):183–4. DOI: 10.4103/1947-2714.131248.

14. Rai K.R., Rai S.K., Bhatt D.R., Kurokuwa M., Ono K., Magar D.T. Study of medically important Vibrios in the sewage of Katmandu Valley, Nepal. *Nepal Med. Coll. J.* 2012; 14(3):212–5.

References

1. Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Mishan'kin M.B., Suchkov I.Yu. [Variable tandem repeats, detected by means of computer-based analysis of *Vibrio cholerae* genome]. *Biotechnologiya.* 2001; 6:85–8.
2. Pokrovsky V.I., editor. [Cholera in the USSR during the VII Pandemic]. M.; 2000. 472 p.
3. Smirnova N.I., Kul'shan' T.A., Krasnov Ya.M. [MLVA-typing of clinical *Vibrio cholerae* strains, isolated in different periods of the current cholera pandemic]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2015; 1:15–22. DOI: 10.3103/S0891416815010085.
4. Smirnova N.I., Cheldyshova N.B., Zadnova S.P., Kutyrev V.V. [Molecular-genetic peculiarities of *Vibrio cholerae* *classica* strains, which caused Asian cholera pandemic in Russia in 1942]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2001; 4:12–6.
5. Cheldyshova N.B., Kritsky A.A., Krasnov Ya.M., Smirnova N.I. [Analysis of the results of fragment and whole genome sequencing of atypical *Vibrio cholerae* strains, classical biovar, which caused Asian cholera pandemic in Russia]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2015; 20(5):24–31.
6. Alam M., Islam M.T., Rashed S.M., Johura F.T., Bhuiyan N.A., Delgado G., Morales R., Mendez J.L., Navarro A., Gil A.I., Watanabe H., Morita M., Nair B., Cravioto A. *Vibrio cholerae* classical biotype strains reveal distinct signatures in Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50 (7):2212–6. DOI:10.1128/JCM.00189-12.
7. Bakhshi B., Boustanshenas M., Mahmoudi-Aznavah A. Emergence of *Vibrio cholerae* O1 classical biotype in 2012 in Iran. *Lett. Appl. Microbiol.* 2014; 58 (2):145–9. DOI:10.1111/lam.12167.
8. Choi S.Y., Lee J.H., Jeon Y.S., Lee H.R., Kim E.J., Ansaruzzaman M., Bhuiyan N.A., Endtz H.P., Niyogi S.K., Sarkar B.L., Nair G.B., Nguen B.M., Hien N.T., Czerkinsky C., Clemens J.D., Chun J., Kim D.W. Multilocus variable-number tandem repeat analysis of *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains harbouring classical toxin B. *J. Med. Microbiol.* 2010; 59(7):763–9. DOI: 10.1099/jmm.0.017939-0.
9. Dziejman M., Balon E., Boydet D., Fraser C.M., Heidelberg J.F., Mekalanos J.J. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002; 99:1556–61. DOI: 10.1073/pnas.042667999.
10. Hase C.C., Finkelstein R.A. Cloning and nucleotide sequence of the *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease (HA/Protease) gene and construction of an HA/Protease-negative strain. *J. Bacteriol.* 1991; 173:3311–17.
11. Kokashvili T., Elbakidze T., Jaiani E., Janelidze N., Kamkamidze G., Whitehouse C., Huq A., Tediashvili M. Comparative phenotypic characterization of *Vibrio cholerae* isolates collected from aquatic environments of Georgia. *Georgian Med. News.* 2013; 224:55–62.
12. Longini I.M. Jr., Yunus M., Zaman K., Siddique A.K., Sack R.B., Nizam A. Epidemic and endemic cholera trends over a 33-year period in Bangladesh. *J. Infect. Dis.* 2002; 186(2):246–51. DOI: 10.1086/341206.
13. Pun S.B. The first appearance of classical-like phenotype *Vibrio cholerae* in Nepal. *N. Am. J. Med. Sci.* 2014; 6(4):183–4. DOI: 10.4103/1947-2714.131248.
14. Rai K.R., Rai S.K., Bhatt D.R., Kurokuwa M., Ono K., Magar D.T. Study of medically important Vibrios in the sewage of Katmandu Valley, Nepal. *Nepal Med. Coll. J.* 2012; 14(3):212–5.

Authors:

Cheldyshova N.B., Kritsky A.A., Lozovsky Yu.V., Guseva N.P. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Челдышова Н.Б., Крицкий А.А., Лозовский Ю.В., Гусева Н.П. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 11.01.16.

Ю.С.Ковтун, А.А.Курилова, Л.С.Катунина, Е.И.Василенко

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БЕЛКОВЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ ПРИ РАЗРАБОТКЕ НА ИХ ОСНОВЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БРУЦЕЛЛ

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

Цель. Сравнительная оценка специфической активности панкреатических гидролизатов белковых продуктов растительного и животного происхождения в отношении тест-штаммов бруцелл, конструирование на основе проведенной оценки модели питательной среды для культивирования бруцелл и изучение ее биологических показателей. **Материалы и методы.** Объектами исследования являлись панкреатические гидролизаты желатина, сои, соевого концентрата, глютена кукурузного, рыбной кормовой муки, кильки каспийской, крови КРС, приготовленные по традиционной технологии. Определение биологических показателей питательных сред, содержащих изучаемые гидролизаты, проводили с помощью тест-штаммов *Brucella abortus* 19 BA, *B. melitensis* Rev I. **Результаты и обсуждение.** Лучшими биологическими показателями в отношении указанных штаммов бруцелл обладал гидролизат желатина. Изучены биологические показатели питательных сред, содержащих сочетания гидролизата желатина с другими взятыми в работу гидролизатами. Разработана экспериментальная питательная среда для культивирования бруцелл. Проведена ее сравнительная оценка с двумя коммерческими средами, применяемыми для культивирования бруцелл.

Ключевые слова: гидролизат, питательная среда, биологические показатели, бруцеллы.

Корреспондирующий автор: Юрий Сергеевич Ковтун, e-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Yu.S.Kovtun, A.A.Kurilova, L.S.Katunina, E.I.Vasilenko

Comparative Evaluation of Protein Hydrolysates in the Process of Constructing Based on Them Nutrient Medium for Brucella Cultivating

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Objective of the study is to conduct comparative assessment of specific activity of pancreatic hydrolysates of protein-containing products, both phytogenous and zoogenous, as regards *Brucella* test strains; and consequently, to develop nutrient medium for *Brucella* cultivation, to study its biological parameters. **Materials and methods.** Gelatin, soy, soy concentrate, corn gluten, fish meal, freshly frozen Caspian sprat, and bovine blood pancreatic hydrolysates, obtained using conventional methodology, served as the test objects. Determination of biological parameters of nutrient media, containing the studied hydrolysates was carried out using the test-strains of *Brucella abortus* 19 BA and *B. melitensis* Rev I. **Results and discussion.** Gelatin hydrolysate has the best biological parameters as regards the *Brucella* strains. Studied have been biological parameters of nutrient media, containing combination of gelatin hydrolysate and other selected hydrolysates. Experimental nutrient medium for *Brucella* cultivation has been developed. Comparative assessment of the experimental nutrient medium and two other commercial media used for cultivating *Brucella* has been performed.

Key words: hydrolysate, nutrient medium, biological parameters, *Brucella*.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Yury S. Kovtun, e-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Citation: Kovtun Yu.S., Kurilova A.A., Katunina L.S., Vasilenko E.I. Comparative Evaluation of Protein Hydrolysates in the Process of Constructing Based on Them Nutrient Medium for Brucella Cultivating. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 4:93–97. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-93-97

При разработке и производстве микробиологических питательных сред актуальной задачей остается поиск сырья для белковых основ, не уступающих мясным по питательной ценности и удовлетворяющих требованиям стандартности и безопасности [1, 3]. Основными аргументами использования альтернативных источников сырья являются экономические факторы, экологические соображения, а также то обстоятельство, что в ряде случаев получаемые основы по отдельным качественным показателям превосходят традиционно применяемые пептоны. В нашей стране было выполнено большое количество исследований по использованию различных

видов белкового сырья для изготовления гидролизатов, применяемых в производстве питательных сред. Показана целесообразность их использования для решения конкретных задач. Однако, по нашему мнению, в доступной литературе недостаточно сравнительных данных о специфической активности пептонов, полученных из различных видов белкового сырья, в отношении микроорганизмов разных таксономических групп.

Для увеличения номенклатуры пептонов, применяемых при изготовлении микробиологических питательных сред, и определения путей их оптимального использования нами ранее была проведена

сравнительная оценка физико-химических свойств панкреатических гидролизатов желатина, сои, соевого концентрата, глютена кукурузного, рыбной кормовой муки, свежемороженой каспийской кильки, крови крупного рогатого скота (КРС), а также изучена специфическая активность питательных сред, включающих данные пептоны на модели питательного агара с использованием тест-штаммов бактерий *Shigella flexneri* 1a 8516, *S. sonnei* «S form», *Pseudomonas aeruginosa* 27/99, *Serratia plymuthica* 1 [2]. Для более детальной характеристики вышеперечисленных гидролизатов предполагалось также изучение их биологических показателей в отношении микроорганизмов других таксономических групп. В настоящей работе представлены результаты изучения гидролизатов с помощью тест-штаммов бруцелл.

Цель работы – сравнительная оценка специфической активности панкреатических гидролизатов желатина, сои, соевого концентрата, глютена кукурузного, рыбной кормовой муки, свежемороженой каспийской кильки, крови (КРС) в отношении тест-штаммов *Brucella abortus* 19 BA, *B. melitensis* Rev I, конструирование на основе проведенной оценки модели питательной среды для культивирования бруцелл и изучение ее биологических показателей с целью конкретизации потенциальной области применения.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись панкреатические гидролизаты желатина, сои, соевого концентрата, глютена кукурузного, рыбной кормовой муки, кильки каспийской, крови КРС, приготовленные по традиционной технологии.

Для определения биологических показателей питательных сред, содержащих изучаемые гидролизаты, использовали тест-штаммы *B. abortus* 19 BA, *B. melitensis* Rev I, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России и из ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи МЗ РФ.

Определение биологических показателей моделей питательных сред проводили в соответствии с методиками, изложенными в МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза» и МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред».

Для изготовления моделей питательных сред использовали: агар микробиологический (ГОСТ 17206-96), натрия хлорид (ГОСТ 4233-77), D-глюкозу (ГОСТ 6038-79), натрий сернистокислый пиро (ГОСТ 11683-76), дрожжевой экстракт (марка «Springer» тип Д), воду дистиллированную (ГОСТ 6709-72).

В качестве сред сравнения использовали питательную среду для выделения и культивирования бруцелл сухую (эритрит агар) производства ФГУП

«НПО «Микроген» МЗ РФ, питательный агар для культивирования и выделения возбудителя бруцеллеза сухой (бруцеллагар) производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» и основу агара для бруцелл (*Brucella Agar Base* код M074) производства HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия).

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Биологические показатели изготовленных гидролизатов в отношении вакцинных штаммов бруцелл *B. abortus* 19 BA, *B. melitensis* Rev I были изучены на агаровых питательных средах, включающих: гидролизат из расчета содержания в 1 л среды 12 г сухих веществ; глюкозу – 1 г/л; натрия хлорид с учетом вещества, содержащегося в гидролизате, вводили до содержания его в среде 5 г/л; агар микробиологический добавляли в количестве, обеспечивающем прочность готовой среды (340±40) г. pH агара устанавливали в пределах (7,1±0,1). В качестве контроля использовали эритрит агар.

О специфической активности питательных сред в отношении возбудителя бруцеллеза судили по количеству и морфологии колоний тест-штаммов *B. abortus* 19 BA и *B. melitensis* Rev I, выросших через 72 ч инкубации при температуре (37±1) °C. Результаты изучения биологических показателей питательных сред, содержащих гидролизаты изучаемого белкового сырья, представлены в табл. 1.

Полученные данные свидетельствуют, что лучшие биологические показатели в отношении обоих штаммов бруцелл были у сред, содержащих гидролизат желатина. Питательные среды, включающие данный гидролизат, по показателю прорастания не уступали, а по размеру выросших колоний превосходили эритрит агар, используемый в качестве контрольной среды. Средам на основе гидролизата желатина несколько уступали среды на основе гидролизатов глютена и соевого концентрата, более существенно – среды на основе гидролизатов сои и кильки ($p < 0,05$). На средах из гидролизата крови отсутствовал рост тест-штамма *B. melitensis* Rev I, а на средах из гидролизата рыбной муки отмечались только единичные колонии этого тест-штамма, рост тест-штамма *B. abortus* 19 BA отсутствовал.

Исходя из полученных данных, а также принимая во внимание то обстоятельство, что качество питательной среды можно улучшить, сочетая несколько гидролизатов, мы провели изучение специфической активности агаризованных сред, содержащих в качестве питательной основы смеси гидролизатов желатина с другими гидролизатами в соотношении 2:1 по содержанию сухих веществ. Содержание сухих веществ такой комплексной питательной основы так же, как и в предыдущей се-

Таблица 1

Биологические показатели питательных сред, содержащих гидролизаты различного белкового сырья

Тест-штаммы	Наименование показателей	Питательные агары, содержащие гидролизаты:							Эритроцит агар (контроль)
		рыбной муки	кильки	желатина	крови КРС	глютена	сои	соевого концентрата	
<i>B. abortus</i> 19 BA	Чувствительность	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
	Прорастание (из разведения 10 ⁻⁶), % М±m	Роста нет	48,06±6,67	86,52±8,89	17,59±6,42	67,00±9,55	24,06±6,20	92,13±9,54	82,73±2,07
	Стабильность основных свойств по морфологии колоний (диаметр колоний, мм; морфология; % диссоциации)	-	0,6–1,4; S-колонии; 0	1,2–1,9; S-колонии; 0	0,4–1,0; S-колонии; 0	0,8–1,6; S-колонии; 0	0,4–0,8; S-колонии; 0	1,0–1,8; S-колонии; 0	0,7–1,5; S-колонии; 0
<i>B. melitensis</i> Rev I	Чувствительность	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
	Прорастание (из разведения 10 ⁻⁶), % М±m	Единичные колонии	5,76±1,95	70,78±6,02	Роста нет	41,08±6,61	11,41±2,35	31,13±2,50	66,82±2,57
	Стабильность основных свойств по морфологии колоний (диаметр колоний, мм; морфология; % диссоциации)	0,4–1,2; S-колонии; 0	0,7–1,5; S-колонии; 0	1,2–1,8; S-колонии; 0	-	0,8–1; S-колонии; 0	0,3–0,6; S-колонии; 0	1,0–1,9; S-колонии; 0	0,6–1,5; S-колонии; 0

рии опытов, составляло 12 г/л.

Примененный подход, в сравнении с использованием в качестве питательной основы отдельных гидролизатов, как правило, приводил к увеличению количества и размера вырастающих колоний бруцелл. Так, при посеве из разведения 10⁻⁶ через 72 ч инкубации при температуре (37±1) °С на изучаемых средах наблюдалось варьирование показателя прорастания *B. abortus* 19 BA от (82,06±1,88) до (96,58±2,59) %, диаметра колоний – от 0,9–1,6 до 1,2–1,9 мм. Показатель прорастания *B. melitensis* Rev I находился в пределах от (72,26±4,00) до (82,76±3,71) %, диаметр колоний – от 0,8–1,6 до 1,2–1,8 мм.

Исключение составляли среды, содержащие гидролизаты желатина и крови, показатель прорастания *B. melitensis* Rev I которых – (42,00±7,16) %, значительно уступал аналогичному показателю других сред (p<0,05). Ниже на средах с вышеупомянутой комбинацией гидролизатов был и показатель прорастания *B. abortus* 19 BA – (72,40±9,98) %, а выросшие на них колонии бруцелл отличались и меньшим диаметром: 0,5–0,8 и 0,5–1,0 мм соответственно. Показатели прорастания и размер колоний *B. abortus* 19 BA и *B. melitensis* Rev I, выросших на эритроцит агаре, взятом в качестве среды сравнения, составили, соответственно, (84,19±4,03), (74,78±4,42) % и 0,8–1,6 мм, 0,6–1,5 мм.

С целью повышения специфической активности питательных сред, включающих сочетания гидролизата желатина с гидролизатами кильки, рыбной муки, сои и глютена, в них были добавлены дрожжевой экстракт в концентрации 2 г/л и натрий сернистокислый пирро в концентрации 0,1 г/л. Выбор концентраций этих веществ обусловлен тем, что они приводятся в большинстве известных рецептур питательных сред для культивирования бруцелл [4, 5]. Результаты изучения биологических показателей приготовленных таким образом питательных сред представлены в табл. 2.

Добавление дрожжевого экстракта и натрия

сернисто-кислого пирро способствовало увеличению размера колоний бруцелл на 0,1–0,3 мм на всех изучаемых вариантах питательных сред через 72 ч инкубации при температуре (37±1) °С. Количество выросших колоний на средах, включающих гидролизат желатина и гидролизаты кильки или рыбной муки, также увеличивалось. Внесение дрожжевого экстракта и натрия сернисто-кислого пирро в агар, содержащий гидролизаты желатина и глютена, приводило к увеличению числа колоний *B. melitensis* Rev I и уменьшению количества колоний *B. abortus* 19 BA, а введение вышеуказанных компонентов в агар, включающий гидролизаты желатина и сои, приводило к сокращению количества колоний обоих тест-штаммов.

Исходя из полученных результатов, а также учитывая технологичность изготовления гидролизатов, в качестве перспективного для дальнейших исследований был выбран вариант питательной среды, включающей комбинацию гидролизата желатина и гидролизата рыбной муки, дрожжевой экстракт, натрий сернисто-кислый пирро, натрий хлористый, глюкозу, агар микробиологический. Проведено сравнительное изучение выбранного варианта среды с бруцеллагаром и основой агара для бруцелл (*Brucella Agar Base*) по физико-химическим и биологическим показателям. При сравнении физико-химических показателей следует отметить высокую прозрачность и низкую цветность разработанной среды, что выгодно отличает ее от бруцеллагара. Результаты изучения биологических показателей сравниваемых сред, а также требования к биологическим показателям питательных сред для выделения и культивирования возбудителя бруцеллеза в соответствии с МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза» представлены в табл. 3.

Из табл. 3 видно, что по количеству выросших колоний бруцелл экспериментальные среды и бру-

Таблица 2

Влияние дрожжевого экстракта и натрия сернисто-кислого пиро на специфическую активность изучаемых питательных сред

Тест-штаммы	Наименование показателей	Питательные агары, содержащие гидролизат желатина в смеси с гидролизатом:								Бруцеллагар
		кильки		рыбной муки		сои		глутена		
		1	2	1	2	1	2	1	2	
<i>B. abortus</i> 19 BA	Чувствительность	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
	Прорастание (из разведе- ния 10 ⁻⁶), % М±m	72,04±7,86	87,30±3,05	89,14±2,61	97,53±3,33	98,67±4,38	87,20±4,82	98,90±3,35	89,91±3,25	95,67±5,05
	Стабильность основных свойств по морфологии колоний (диаметр коло- ний, мм; морфология; % диссоциации)	1,0–1,7; S-колонии; 0	1,3–1,9; S-колонии; 0	1,4–2,0; S-колонии; 0	1,5–2,2; S-колонии; 0	0,9–1,6; S-колонии; 0	1,1–1,7; S-колонии; 0	1,2–1,8; S-колонии; 0	1,5–2,1; S-колонии; 0	1,0–1,5; S-колонии; 0
<i>B. melitensis</i> Rev I	Чувствительность	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
	Прорастание (из разведе- ния 10 ⁻⁶), % М±m	75,33±4,58	88,37±4,37	83,25±2,63	88,63±2,17	89,33±3,50	80,53±3,35	79,64±2,82	85,33±2,60	87,72±4,67
	Стабильность основных свойств по морфологии колоний (диаметр коло- ний, мм; морфология; % диссоциации)	1,2–1,7; S-колонии; 0	1,4–1,9; S-колонии; 0	1,4–2,0; S-колонии; 0	1,5–2,1; S-колонии; 0	1,3–1,8; S-колонии; 0	1,5–2,0; S-колонии; 0	1,4–1,9; S-колонии; 0	1,5–2,0; S-колонии; 0	1,0–1,4; S-колонии; 0

Примечание: 1 – среды, не содержащие дрожжевой экстракт и натрий сернисто-кислый пиро; 2 – среды с добавлением дрожжевого экстракта и натрия сернисто-кислого пиро.

целлагар были равнозначны и существенно превосходили Brucella Agar Base ($p < 0,05$). Колонии штаммов *B. abortus* 19 BA и *B. melitensis* Rev I, выросшие на разработанной среде, в диаметре были на 15–30 % больше колоний, выросших на бруцеллагаре. Колонии, сформировавшиеся через 72 ч инкубации на Brucella Agar Base, в диаметре были меньше колоний, выросших на разработанной среде через 48 ч инкубации. Однако выход микробных клеток с 1 мл разработанной среды, измеренный с применением отраслевого стандартного образца (ОСО) мутности 42-28-85 (10 МЕ) ФГБУ НЦЭСМП, значительно уступал аналогичному показателю бруцеллагара и основе агара для бруцелл.

Таким образом, проведена сравнительная оценка биологических свойств панкреатических гидроли-

затов семи видов белкового сырья в отношении вакцинных штаммов бруцелл, на ее основе предложена рецептура плотной питательной среды для культивирования данных микроорганизмов. По большинству показателей разработанная среда превосходила среды сравнения, однако по показателю эффективности уступала им. Это лимитирует применение среды для накопления бактериальной массы бруцелл, но возможно ее использование для культивирования производственных штаммов на этапе исследования их свойств и подготовки посевной культуры при производстве медицинских иммунобиологических препаратов. Низкая цветность разработанной среды в сочетании с высокими прозрачностью, чувствительностью и скоростью роста микроорганизмов не исключают перспективы ее применения в диагностической

Таблица 3

Сравнительная характеристика биологических показателей изучаемых питательных сред для культивирования бруцелл

Тест-штаммы	Наименование показателей	Требования по МУ 3.3.2.2124-06	Экспериментальная питательная среда	Среды сравнения	
				бруцеллагар	Brucella Agar Base
<i>B. abortus</i> 19 BA	Чувствительность	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
	Прорастание (из разведения 10 ⁻⁶), % M±m	Не менее 60	97,88±4,87	91,42±6,21	50,98±8,72
	Стабильность основных свойств по морфологии колоний (диаметр колоний через 48/72 ч инкубации, мм; морфология; % диссоциации)	н.н.; S-колонии; 0	0,4–1,0/1,6–2,3; S-колонии; 0	0,3–0,7/1,2–1,7; S-колонии; 0	Точечные/0,3–0,8; S-колонии; 0
	Эффективность, м.к./мл	н.н.	6,12·10 ⁹	9,95·10 ⁹	9,01·10 ⁹
<i>B. melitensis</i> Rev I	Чувствительность	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
	Прорастание (из разведения 10 ⁻⁶), % M±m	Не менее 60	90,04±2,68	90,06±4,42	67,22±9,48
	Стабильность основных свойств по морфологии колоний (диаметр колоний через 48/72 ч инкубации, мм; морфология; % диссоциации)	н.н.; S-колонии; 0	0,4–1,0/1,5–2,0; S-колонии; 0	0,3–0,6/1,0–1,6; S-колонии; 0	Точечные/0,3–0,8; S-колонии; 0
	Эффективность, м.к./мл	н.н.	6,21·10 ⁹	12,4·10 ⁹	13,43·10 ⁹

Примечание: н.н. – не нормируется.

практике. Для этого требуется дальнейшее изучение биологических показателей среды с помощью расширенного набора тест-штаммов бруцелл.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калягина С.Ю. Создание питательной среды из отходов мясного сырья и оценка ее свойств. *Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол.* 2008; 3:91–4.
2. Ковтун Ю.С., Курилова А.А., Таран Т.В., Катунина Л.С., Чурикова Н.В. Сравнительная оценка потенциальных белковых основ микробиологических сред. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 3:92–5.
3. Никифоров А.К., Антонычева М.В., Волох О.А., Еремин С.А., Киреев М.Н., Жулидов И.М., Алешина Ю.А., Авдеева Н.Г., Вахрушина Н.И., Холматов К.И. Разработка питательных сред на основе непищевого сырья для глубинного культивирования штаммов холерного вибриона. *Пробл. особо опасных инф.* 2015; 1:85–8.
4. Диагностика особо опасных инфекций (ООИ). HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия). [Электронный ресурс]. URL: <http://www.himedialabs.ru/m074-m348/> (дата обращения 15.01.2016 г.).
5. Difco and BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media, 2nd edition. Becton Dickinson and Company; 2009. P 104.

References

1. Kalyagina S.Yu. [Construction of nutrient medium from meat by-products and wastes and evaluation of its properties]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2008; 3:91–4.
2. Kovtun Yu.S., Kurilova A.A., Taran T.V., Katunina L.S., Churikova N.V. [Comparative assessment of prospective protein bases for microbiological media]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 3:92–5.
3. Nikiforov A.K., Antonycheva M.V., Volokh O.A., Eremin S.A., Kireev M.N., Zhulidov I.M., Afeshina Yu.A., Avdeeva N.G., Vakhrushina N.I., Kholmato K.I. [Development of food-raw-material-based nutrient media for submerged cultivation of cholera vibrio strains]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2015; 1:85–8.
4. [Diagnostics of particularly dangerous infections (PDI)]. HiMedia Laboratories Pvt. Limited (India) [cited 15 Jan 2016]. Available from: <http://www.himedialabs.ru/m074-m348/>
5. Difco and BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media, 2nd edition. Becton Dickinson and Company; 2009. P 104.

Authors:

Kovtun Yu.S., Kurilova A.A., Katunina L.S., Vasilenko E.I. 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., Катунина Л.С., Василенко Е.И. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Поступила 09.02.16.

Л.М.Михайлов, Н.М.Андреевская, В.А.Михайлова, Н.Л.Баранникова, Л.Е.Токарева,
К.Ю.Ястремская, С.В.Балахонов

ПОЛУЧЕНИЕ ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК К ТЕРМОЭКСТРАКТАМ ИЗ БРУЦЕЛЛ В S- И L-ФОРМАХ

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск,
Российская Федерация

Цель. Получение гипериммунных сывороток к термоэкстрактам из бруцелл в S- и L-формах. **Материалы и методы.** В работе использовали термоэкстракты, полученные из штамма *Brucella abortus* И-206 в S- и L-формах. В качестве животных-продуцентов сывороток использовали кроликов породы Шиншилла. Специфическую активность определяли в пробирочной реакции агглютинации с диагностическими: корпускулярным экспериментальным из бруцелл в L-форме и коммерческим бруцеллезным цветным, специфичность – с гетерологичными штаммами: *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Vibrio cholerae* 5 (Огава), *V. cholerae* 35 АЗ (Инаба), *Yersinia enterocolitica* О:9, *Y. pestis* EV НИИЭГ, *Escherichia coli* 3912/41. Содержание белка в полученном экстракте определяли по методу Лоури. **Результаты и выводы.** В результате проведенных исследований показана антигенная активность термоэкстрактов, разработаны схемы иммунизации, позволяющие получать высокоактивные и специфичные сыворотки, которые могут быть использованы для идентификации и дифференциации возбудителя бруцеллеза.

Ключевые слова: бруцеллы, термоэкстракты, S- и L-формы, сыворотки

Корреспондирующий автор: Леонид Михайлович Михайлов, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

L.M.Mikhailov, N.M.Andreevskaya, V.A.Mikhailova, N.L.Barannikova, L.E.Tokareva, K.Yu.
Yastremskaya, S.V.Balakhonov

Preparation of Hyperimmune Sera to Thermoextracts of Brucella S- and L-Forms

Irkutsk Research Anti-Plague Institute, Irkutsk, Russian Federation

Objective of the study was to prepare hyperimmune sera to *Brucella* S- and L-form thermo-extracts. **Materials and methods.** Thermo-extracts from *Brucella abortus* I-206 strain in S- and L-forms were used. Chinchilla rabbits were used as animals, sera producers. Specific activity was determined by test-tube agglutination with *Brucella* L-form corpuscular experimental and commercial *Brucella* colored diagnosticums, while specificity – with heterologous strains: *Francisella tularensis* 15 NIEG, *Vibrio cholerae* 5 (Ogawa), *V. cholerae* 35 A3 (Inaba), *Yersinia enterocolitica* O:9, *Y. pestis* EV NIEG, *Escherichia coli* 3912/41. Protein content in the obtained extract was defined using Lowry method. **Results and conclusions.** Consequently, the antigen activity of the generated thermo-extracts has been shown, the immunization schemes have been developed permitting to obtain highly active and specific sera that could be used for identification and differentiation of brucellosis causative agent.

Key words: *Brucella*, thermo-extract, S- and L-form, sera.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Leonid M. Mikhailov, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Citation: Mikhailov L.M., Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Barannikova N.L., Tokareva L.E., Yastremskaya K.Yu., Balakhonov S.V. Preparation of Hyperimmune Sera to Thermoextracts of Brucella S- and L-Forms. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 4:98–101. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-98-101

В лабораторной диагностике бруцеллеза для идентификации и дифференциации возбудителя применяют бруцеллезные поли- и моноспецифические сыворотки [4], для получения которых используют корпускулярные и растворимые антигены бруцелл вирулентных и вакцинных штаммов [5]. Известно, что иммунодоминантным антигеном бруцелл является липополисахарид, содержащийся в клеточной стенке [10, 11], который не обладает строгой специфичностью, так как содержит антигенные детерминанты, общие с другими микроорганизмами: *Francisella tularensis*, *Yersinia enterocolitica* (серовара О:9), *Vibrio cholerae* [9]. В процессе L-трансформации бруцеллы утрачивают клеточную стенку, сохраняя при этом антигенность, то есть способность вызывать анти-телообразование при введении их в макроорганизм

[2]. Термоэкстракт (ТЭ), выделенный из бруцелл в L-форме, обладает высокой антигенной активностью и специфичностью [3]. В связи с этим актуальными остаются вопросы, связанные с возможностью использования термоэкстрактов для получения бруцеллезных антисывороток.

Цель исследования – получение гипериммунных сывороток к термоэкстрактам из бруцелл в S- и L- формах.

Материалы и методы

В работе использовали S- и L-ТЭ из штамма *B. abortus* И-206. Для этого штамм *B. abortus* И-206 в S- и L-формах выращивали на печеночном агаре в термостате при температуре (37±1) °С. Культуры

смывали забуференным физиологическим раствором (ЗФР), pH 7,2±0,1. Бактериальные суспензии инактивировали добавлением формалина до конечной концентрации 2,5 % и выдерживали в течение 24 ч в термостате при температуре (37±1) °С, затем проводили контроль специфической стерильности. Концентрацию бруцелл доводили ЗФР (pH 7,2±0,1) по отраслевому стандартному образцу мутности 10 МЕ ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-85-соответствующего года выпуска) до 5·10¹⁰ м.к./мл. Взвеси дополнительно прогревали на водяной бане при температуре 100 °С в течение 45 мин и центрифугировали при 7000 об/мин в течение 50 мин. Полученные ТЭ декантировали. В качестве животных-продуцентов использовали кроликов породы Шиншилла массой 2,5–3 кг.

Специфическую активность полученных сывороток определяли в пробирочной реакции агглютинации (РА) с диагностикумами: экспериментальным корпускулярным из бруцелл в L-форме и коммерческим бруцеллезным цветным (серия 4, 10) в соответствии с методическими указаниями МУ 3.1.7.1189-03. «Профилактика и лабораторная диагностика бруцеллеза людей. Профилактика инфекционных болезней. Инфекции общие для человека и животных.», специфичность – с гетерологичными штаммами: *F. tularensis* 15 НИИЭГ, *V. cholerae* 5 (Огава), *V. cholerae* 35 АЗ (Инаба), *Y. enterocolitica* 383 (серовара О:9), *Y. enterocolitica* 628/1 (серовара О:3), *Escherichia coli* 3912/41, *Y. pestis* EV НИИЭГ, а также *B. ovis* 63/290 в R-форме.

В качестве контроля использовали коммерческую поливалентную бруцеллезную сыворотку (серия 3) (ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт») и экспериментальную кроличью сыворотку, полученную нами против бруцелл в L-форме [2]. Сыворотки консервировали добавлением борной кислоты до 2 %.

Содержание белка в полученных экстрактах определяли по методу О.Н. Lowry [12] с использованием в качестве стандарта бычьего сывороточного альбумина. Суммарное количество нуклеиновых кислот определяли спектрофотометрически по методу А.С. Спирина [6]. Определение общего содержания углеводов осуществляли в реакции с фенолом и концентрированной серной кислотой согласно методике Р. Хансон и Дж. Филлипс с использованием глюкозы в качестве стандарта [7]. Содержание 2-кето-3-дезоксиктоновой кислоты (КДО) – в реакции с тиобарбитуровой кислотой после гидролиза в 0,02 N растворе H₂SO₄ в течение 20 мин при 100 °С [7].

Результаты и обсуждение

Результаты изучения химического состава полученных S- и L-ТЭ представлены в табл. 1, из которой следует, что в процессе L-трансформации изменяется количественный показатель содержания белка. В L-ТЭ содержание белка выше в 2,8 раза, чем в S-ТЭ,

а уровень углеводов возрастает незначительно. По содержанию нуклеиновых кислот в L-ТЭ превышение составляет в четыре раза, а КДО – наоборот, в L-ТЭ ниже в три раза, чем в S-ТЭ. Это свидетельствует о том, что в процессе L-трансформации изменяется химический состав бруцелл.

Для получения гипериммунной сыворотки к S-ТЭ кроликам перед иммунизацией вводили в подушечки задних лап по 0,5 мл полного адьюванта Фрейнда (ПАФ). Через 7–10 сут кроликов иммунизировали в подколенные лимфатические узлы задних лап S-ТЭ в количестве 135 мкг (расчет по белку), растворенным в 0,5 мл ЗФР (pH 7,2±0,1), и одновременно внутримышечно 68 мкг S-ТЭ в 0,5 мл ЗФР с 0,5 мл ПАФ (смесь). На 4-е сутки кроликам вводили в подушечки передних лап и внутримышечно по 135 мкг в 1 мл смеси. Через 7 дней после последней инъекции антигена брали пробу крови и в сыворотке определяли титр специфических антител.

Через 15 сут проводили второй цикл иммунизации комплексом антиген-антитело (АГ-АТ). Для этого у животных забирали кровь в количестве 8–10 мл, необходимым для получения 3–5 мл сыворотки. Сыворотку разливали по 1,0 мл в 3 стерильные пробирки и в каждую вносили S-ТЭ в дозах 203, 270, 338 мкг соответственно. Комплекс АГ-АТ вводили внутривенно трехкратно с интервалом между инъекциями 5 дней кролику, от которого получена сыворотка. Одновременно каждому животному внутримышечно вводили по 203 мкг АГ в 1 мл смеси. Через 7–9 сут после последней инъекции комплексом АГ-АТ проводили тотальное кровопускание кроликов и получали сыворотки.

Для получения гипериммунной сыворотки к L-ТЭ кроликам перед иммунизацией вводили в подушечки задних лап по 0,5 мл ПАФ, одновременно внутримышечно – 460 мкг (расчет по белку). Через 5–7 сут кроликов иммунизировали L-ТЭ в количестве 460 мкг, растворенного в 1 мл смеси, в подколенные лимфатические узлы задних лап и одновременно внутримышечно – 820 мкг в 1 мл смеси. На 4-е сутки вводили в подушечки задних лап 325 мкг и внутримышечно – 820 мкг в 1 мл смеси. Через 7 дней после последней инъекции антигена брали пробу крови и в сыворотке определяли титр специфических антител.

Таблица 1

Химический состав термоэкстрактов из *B. abortus* И-206 в S- и L-формах

Показатели	S-ТЭ из <i>B. abortus</i> в S-форме		L-ТЭ из <i>B. abortus</i> в L-форме	
	мкг/мл	%*	мкг/мл	%*
Белок	166,7±36,5	16,7±3,6	462,6±30,5	46,2±3
Углеводы	112,7±6,9	11,2±0,7	148,0±24,7	14,8±2,5
Нуклеиновые кислоты	4,8±0,19	0,5±0,02	13,2±3,39	1,32±0,34
2-кето-3-дезоксиктоно- овая кислота	4,8±0,6	0,5±0,06	1,8±0,44	0,2±0,04

*Средняя арифметическая из 5 определений и ее средняя ошибка.

Таблица 2

Активность и специфичность кроличьей сыворотки, полученной к S-ТЭ

Антигены	Кроличья сыворотка, полученная к S-ТЭ	Диагностическая поливалентная бруцеллезная сухая сыворотка, серия 3 (контроль)
Диагностикум бруцеллезный цветной для РА (серия 4-10)	1:3200	1:1600
<i>E. coli</i> 3912/41	-	-
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ	-	-
<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	-	1:80
<i>V. cholerae</i> 5 (Огава)	-	1:40
<i>V. cholerae</i> 35 АЗ (Инаба)	-	1:40
<i>Y. enterocolitica</i> 628/1 (серовара О:3)	-	-
<i>B. ovis</i> 63/290 (R-форма)	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> 383 (серовара О:9)	1:1600	1:1600

ских антител.

Через 15 сут проводили второй цикл иммунизации комплексом АГ-АТ. Сыворотку разливали по 1,0 мл в 3 стерильные пробирки и в каждую вносили 690 мкг АГ. Комплекс АГ-АТ вводили внутривенно трехкратно кролику, от которого получена сыворотка, с интервалом между инъекциями 5 дней. Одновременно каждому животному вводили по 460 мкг антигена внутримышечно в 1 мл смеси. Через 7–9 сут после последней инъекции комплексом АГ-АТ проводили тотальное кровопускание кроликов и получали сыворотки.

Активность и специфичность бруцеллезной сыворотки, полученной к S-ТЭ, определяли в сравнении с коммерческой поливалентной бруцеллезной сывороткой (табл. 2) в пробирочной РА. Как видно из табл. 2, кроличья сыворотка, полученная к S-ТЭ, по активности практически не отличалась от коммерческой поливалентной бруцеллезной сыворотки, но была более специфична. Кроличья сыворотка к S-ТЭ не реагировала с гетерологичными штаммами, тогда как поливалентная бруцеллезная сыворотка взаимодействовала с вышеуказанными штаммами в пределах 1/10 титра, что соответствует техническим условиям на сыворотку. С *Y. enterocolitica* 383 (серовара О:9) обе сыворотки реагировали.

Активность и специфичность бруцеллезной сыворотки к L-ТЭ определяли в сравнении с экспериментальной кроличьей сывороткой, полученной против бруцелл в L-форме (табл. 3). Результаты табл. 3 свидетельствуют о том, что сыворотка, полученная против бруцелл в L-форме, высокоактивна (1:3200) и достаточно специфична (реагирует с *Y. enterocolitica* 628/1 серовара О:3 в титре 1:20). Сыворотка, полученная на L-ТЭ, обладает довольно высокой активностью (1:800) и высокой специфичностью (нет перекрестных реакций с гетерологичными штаммами), которую также можно использовать для идентификации бруцелл в L-форме.

Таким образом, кроличья сыворотка, получен-

Таблица 3

Активность и специфичность экспериментальных кроличьих сывороток, полученных на L-ТЭ и против бруцелл в L-форме в РА

Антигены	Кроличья сыворотка, полученная на L-ТЭ	Экспериментальная кроличья сыворотка, полученная против бруцелл в L-форме
Антиген корпускулярный <i>B. abortus</i> И-206 в L-форме	1:800	1:3200
<i>E. coli</i> 3912/41	-	-
<i>Y. pestis</i> EV НИИЭГ	-	-
<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	-	-
<i>V. cholerae</i> 5 (Огава)	-	-
<i>V. cholerae</i> 35АЗ (Инаба)	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> 628/1 (серовара О:3)	-	1:20
<i>B. ovis</i> 63/290 (R-форма)	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> 383 (серовара О:9)	-	-

ная к S-ТЭ, обладает более высокой активностью и специфичностью (не реагирует с гетерологичными штаммами микроорганизмов, кроме *Y. enterocolitica* 383 (серовара О:9) по сравнению с поливалентной бруцеллезной сывороткой. Кроличья сыворотка, полученная на L-ТЭ, активна (титр 1:800) и высоко-специфична (не взаимодействует с гетерологичными штаммами микроорганизмов).

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Михайлов Л.М., Калиновский А.И., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Репина Л.П. Способ получения диагностической агглютинирующей сыворотки против бруцелл в L-форме. Патент РФ 2242765, опубл. 20.12.2004. Бюл. 35.
2. Михайлов Л.М., Калиновский А.И., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Балахонов С.В., Шестопалов М.Ю., Татарникова О.Г., Репина Л.П., Болдина А.А., Капустин Ю.М. Антисыворотки к бруцеллам в L-форме. Бюл. ВСНЦ СО РАМН. 2004; 1(2):143–6.
3. Михайлов Л.М., Калиновский А.И., Баранникова Н.Л., Балахонов С.В., Марков Е.Ю., Николаев В.Б., Козулина К.Ю., Шестопалов М.Ю., Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Татарникова О.Г., Кузнецов В.И. Способ получения антигенного препарата из бруцелл в L-форме. Патент РФ 2416429, опубл. 20.04.2011. Бюл. 11.
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. Изд. 2-е. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
5. Саяпина Л.В., Комратов А.В., Храмов М.В., Торопчин М.И., Фадейкина О.В., Волкова Р.А., Русанова Д.В., Немировская Т.И., Лямкин Г.И. Аттестация отраслевого стандартного образца сыворотки бруцеллезной диагностической поливалентной для реакции агглютинации. Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. 2014; 4(52):42–7.
6. Спирин А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот. Биохимия. 1958; 23(5):656–62.
7. Хансон Р. Химический состав бактериальной клетки. В кн.: Методы общей бактериологии. Кн. 2. М.; 1984. С. 283–373.
8. Berman D.T., Kurtz R.S. Relationship of biological activities to structures of *Brucella abortus* endotoxin and LPS. Ann. Inst. Pasteur Microbiol. 1987; 138(1):98–101.
9. Chenais, E. Bagge, E. Lambert, S.T. Artursson, K. *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 cultured from Swedish sheep showing serologically false-positive reactions for *Brucella melitensis*. Infect. Ecol. Epidemiol. 2012; 2:19027. DOI:10.3402/iee.v2i0.19027.
10. Kubler-Kielb J., Vinogradov E. Reinvestigation of the structure of *Brucella* O-antigens. Carbohydr. Res. 2013; 378:144–7.
11. Kubler-Kielb J., Vinogradov E. The study of the core part and non-repeating elements of the O-antigen of *Brucella* lipopoly-

saccharide. *Carbohydr. Res.* 2013; 366:33–7.

12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193(1):265–75.

References

1. Mikhailov L.M., Kalinovsky A.I., Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Repina L.P. [Method for the production of diagnostic agglutinating serum against *Brucella* L-form]. RF Patent No 2242765, 20.12.2004.
2. Mikhailov L.M., Kalinovsky A.I., Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Balakhonov S.V., Shestopalov M.Yu., Tatarnikova O.G., Repina L.P., Boldina A.A., Kapustin Yu.M. [Anti-sera to *Brucella* L-form]. *Bulletin of the East-Siberian Scientific Center, RAMS Siberian Branch.* 2004; 1(2):143–6.
3. Mikhailov L.M., Kalinovsky A.I., Barannikova N.L., Balakhonov S.V., Markov E.Yu., Nikolaev V.B., Kozulina K.Yu., Shestopalov M.Yu., Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Tatarnikova O.G., Kuznetsov V.I. [Method for the production of antigen preparation from *Brucella* L-form]. RF Patent No 2416429, 20.04. 2011.
4. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. 2nd Edition, M.: CJSC “Shiko”, 2013. 560 p.
5. Sayapina L.V., Komratov A.V., Khramov M.V., Toropchin M.I., Fadeykina O.V., Volkova R.A., Rusanova D.V., Nemirovskaya T.I., Lyamkina G.I. [Certification of the departmental standard specimen of diagnostic polyvalent *Brucella* serum for agglutination assay]. *Biopreparaty. Profilakt. Diagnost. Lechenie.* 2014; 4(52):42–7.
6. Spirin A.S. [Spectrophotometric evaluation of the aggregate nucleic acid amount]. *Biokhimiya.* 1958; 23(5): 656–62.
7. Hanson R. [Chemical composition of bacterial cell]. In: [Methods of General Bacteriology]. Vol. 2. M.; 1984. P. 283–373.

8. Berman D.T., Kurtz R.S. Relationship of biological activities to structures of *Brucella abortus* endotoxin and LPS. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 1987; 138(1):98–101.

9. Chenais, E. Bagge, E. Lambertz, S.T. Artursson, K. *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 cultured from Swedish sheep showing serologically false-positive reactions for *Brucella melitensis*. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 2012; 2:19027. DOI:10.3402/iee.v2i0.19027.

10. Kubler-Kielb J., Vinogradov E. Reinvestigation of the structure of *Brucella* O-antigens. *Carbohydr. Res.* 2013; 378:144–7.

11. Kubler-Kielb J., Vinogradov E. The study of the core part and non-repeating elements of the O-antigen of *Brucella* lipopolysaccharide. *Carbohydr. Res.* 2013; 366:33–7.

12. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193(1):265–75.

Authors:

Mikhailov L.M., Andreevskaya N.M., Mikhailova V.A., Barannikova N.L., Tokareva L.E., Yastremskaya K.Yu., Balakhonov S.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Об авторах:

Михайлов, Л.М. Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Баранникова Н.Л., Токарева Е.Л., Ястремская К.Ю., Балахонов С.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилисера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Поступила 07.04.16.

Т.А.Костюкова, М.Н.Ляпин, К.М.Морозов

АЛГОРИТМ ЛИКВИДАЦИИ АВАРИИ ПРИ РАБОТЕ С ПАТОГЕННЫМИ БИОЛОГИЧЕСКИМИ АГЕНТАМИ В БОКСАХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ

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

Рассмотрены возможные варианты аварий при работе в БМБ с использованием патогенов. Предложены алгоритмы локализации и ликвидации аварии при работе в БМБ II класса без разбрызгивания, с разбрызгиванием в пределах рабочей камеры, с разбрызгиванием и выходом инфекционного материала за пределы рабочей камеры БМБ, аварии с нарушением целостности защитной одежды.

Ключевые слова: биологическая безопасность, бокс микробиологической безопасности, алгоритм ликвидации аварии.

Корреспондирующий автор: Татьяна Алексеевна Костюкова, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

T.A.Kostyukova, M.N.Lyapin, K.M.Morozov

Algorithm of Emergency Elimination when Working inside Bio-Safety Cabinets with Pathogenic Biological Agents

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

Considered have been possible variants of emergencies, which may arise while working in BSC with pathogenic microorganisms. Put forward have been the algorithms for localization and control of the incident when working in BSC Safety Class II without spills; with spills within the working chamber; with spills and release of infectious material beyond the BSC working chamber; and incidents with compromised personal protection equipment.

Key words: biological safety, bio-safety cabinet, algorithm for emergency elimination.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Tatiana A. Kostyukova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Kostyukova T.A., Lyapin M.N., Morozov K.M. Algorithm of Emergency Elimination when Working inside Bio-Safety Cabinets with Pathogenic Biological Agents. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2016; 4:102–104. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-102-104

Работа с микроорганизмами – возбудителями инфекционных заболеваний, несмотря на повышающийся уровень знаний в области биологической безопасности, остается источником инфицирования персонала и окружающей среды. Создание, совершенствование и внедрение в лабораторную практику боксов микробиологической безопасности (БМБ) явилось приоритетным направлением развития технологий защиты персонала микробиологических лабораторий

Проведенный предварительный анализ научной и нормативной документации по вопросам биологической безопасности не обнаружил существующего (готового) алгоритма действий сотрудников при возникновении аварии при работе в БМБ с использованием ПБА I–II групп, определения объема мероприятий по локализации и ликвидации возникшей аварии и порядка их проведения.

Цель работы – выявление отличий в порядке ликвидации аварий от существующих правил поведения при возникновении аварий во время работы за открытым лабораторным столом и в БМБ II класса, разработка алгоритма действий сотрудников при возникновении аварии во время работы в БМБ с использованием ПБА I–II групп, определение объема мероприятий по локализации и ликвидации возникшей аварии и порядка их проведения.

Алгоритм оповещения о любом виде аварии руководителя подразделения и руководителя организации, председателя комиссии по контролю соблюдения требований биологической безопасности определен в действующих санитарных правилах и остается без изменений.

Действующий на территории Российской Федерации с 2011 г. ГОСТ Р ЕН 12469-2010 «Биотехнология. Технические требования к боксам микробиологической безопасности» является первым документом, содержащим рекомендации по практической оценке защитной эффективности БМБ. О.Б.Шишкина и соавт. (2014 г.) провели оценку защитной эффективности БМБ II класса типа 2А отечественного производства. Авторы показали, что использование БМБ при выполнении манипуляций с микроорганизмами повышает степень защищенности экспериментатора и окружающей среды. Создаваемый в БМБ II класса направленный поток воздуха (воздушный экран) уменьшает вероятность выхода ПБА за пределы рабочей камеры. В то же время С.Г.Дроздов и соавт. (1987 г.) не исключают вероятность инфицирования рук сотрудника, находящихся в рабочей зоне БМБ. Поэтому в СП 1.3.3118-13 регламентировано требование работы в БМБ II класса в защитной одежде и двух парах перчаток, при этом одну пару перчаток необходимо

снимать перед извлечением рук из БМБ, а во второй – оставаться во время пребывания в помещении микробиологической комнаты. До настоящего времени отсутствует четкий нормативно закрепленный порядок ликвидации аварий при работе в БМБ.

Рассмотрим два варианта аварий без разбрызгивания: касание петлей с культурой внешней поверхности чашки Петри и касание петлей с культурой защитной одежды (рукава халата) при работе в БМБ. По объему мероприятий по ликвидации аварий эти варианты существенно различаются.

В случае касания бактериологической петлей с инфекционным материалом наружного края пробирки, чашки или падения кусочка культуры на рабочую поверхность – авария без разбрызгивания по классификации СП – следует: прекратить работу, оповестить напарника (далее напарник включает аварийную сигнализацию); провести обработку верхней пары перчаток дезсредством, находящимся в БМБ; удалить из рабочей камеры загрязненный предмет, завернув его в салфетку, смоченную дезраствором (допустимо использовать салфетку, над которой работали), перенести его в контейнер или пакет для автоклавирования; обработать руки в перчатках дезсредством; снять верхнюю пару перчаток, поместить их в контейнер для последующего автоклавирования; надеть чистую пару перчаток из имеющихся в помещении или тамбуре/предбоксе. На место удаленной салфетки поместить чистую, также смоченную дезраствором. Продолжить работу после получения разрешения на это от руководителя учреждения. По окончании работы или в конце рабочего дня следует провести текущую обработку рабочей камеры БМБ с использованием дезраствора.

Возможен другой вариант аварии без разбрызгивания: касание петлей с инфицированным материалом защитной одежды. Такая авария требует другого алгоритма действий. Сотрудник, у которого произошла авария, должен сообщить об этом напарнику, обработать верхнюю пару перчаток дезраствором, намочить тампон дезраствором и положить его на место касания, снять верхнюю пару перчаток, поместить их в емкость для дальнейшего автоклавирования, выйти в предбокс, снять защитную одежду и поместить ее в емкость для последующего обеззараживания, обработать открытые участки тела тампонами, смоченными раствором 70 % спирта, снять рабочую одежду, поместить в емкость для обеззараживания, надеть рабочую одежду из аварийного комплекта. В остальном действия аналогичны рассмотренному выше случаю.

Проанализируем два варианта аварии с разбрызгиванием инфекционного материала: авария в пределах рабочей камеры БМБ (при ликвидации аварии обработке подвергают рабочую камеру БМБ) и авария с выходом инфекционного материала за пределы БМБ (при ликвидации такой аварии обработке подвергают рабочую камеру БМБ и помещение, в котором проводилась работа).

Все известные нам источники и, в частности,

Учебное пособие по биобезопасности В.А.Дмитриевой и соавт. (2013 г.) определяют мероприятия по ликвидации аварии с разбрызгиванием без конкретизации действий в случае работы в БМБ. В данной ситуации не следует сбрасывать со счетов защиту экспериментатора и окружающего пространства, определяемых конструкцией и назначением данного оборудования.

Рассмотрим аварию с разбрызгиванием инфицированного материала в пределах рабочей камеры БМБ. В первый момент после аварии основные действия сотрудника, у которого произошла авария следующие: прекращение работы, обработка и снятие верхней пары перчаток, сообщение об аварии напарнику. Все манипуляции в пределах рабочей камеры БМБ должны выполняться плавно, чтобы не нарушить воздушный защитный экран, создаваемый в БМБ. После извлечения рук из пространства рабочей камеры, работавший в БМБ сотрудник должен закрыть рабочий проем БМБ, в зависимости от конструктивных особенностей БМБ опустив переднее стекло или подняв панель ультрафиолетового облучателя, и включить в БМБ ультрафиолетовую лампу.

Все сотрудники, находившиеся в помещении, также должны прекратить работу и выйти в предбокс, нажать кнопку аварийной сигнализации и приступить к «самообработке». Обработать открытые участки тела 70 % спиртом, смочить дезраствором защитную одежду (рукава и переднюю часть халата), снять защитную одежду, поместить ее в емкость для замачивания в дезрастворе или в пакет для автоклавирования. В последнюю очередь необходимо снять перчатки, руки обработать спиртом и вымыть с мылом.

В рассматриваемом варианте аварии (с разбрызгиванием в пределах рабочей камеры БМБ) с целью ее ликвидации дезинфекционной обработке подвергают рабочую камеру БМБ и все предметы, находившиеся в ней в момент аварии. После согласования объема мероприятий с руководителем организации под контролем прибывших на место аварии членов комиссии по контролю за соблюдением требований биобезопасности сотрудники подразделения могут вернуться в помещение и продолжить работу на других рабочих местах, а обработку БМБ, в котором произошла авария, провести после окончания работы.

Дезинфекционную обработку камеры БМБ должен проводить сотрудник, одетый в противочумный костюм I типа (или его аналог), используя свежеприготовленный раствор дезинфектанта, эффективного в отношении возбудителя, с которым проводилась работа (3 % раствор хлорамина при работе с неспоровыми микроорганизмами, 6 % раствор перекиси водорода с 0,5 % моющего средства при работе со спорообразующими микроорганизмами). Сотрудник, ликвидирующий аварию, вносит емкость со свежеприготовленным дезраствором, пакеты для автоклавирования/бак для автоклавирования с поддоном, безворсовые салфетки.

Ликвидирующий аварию сотрудник осуществляет доступ в рабочую камеру БМБ; размещает в ней необходимые для ликвидации аварии емкость с

дезраствором и пакеты для автоклавирования, емкость для автоклавирования с поддоном размещает рядом с БМБ; накрывает место разлива салфеткой (тампоном), смоченной дезраствором до полного впитывания разлившейся жидкости (примерно 10 мин); после экспозиции убирает пинцетом салфетку в пакет для автоклавирования; проводит дезинфекцию всех предметов, находящихся в рабочей камере БМБ (протирает каждый предмет салфеткой, смоченной дезраствором); переносит объекты с посевами и среды в емкость (пакет) для автоклавирования; находившиеся в БМБ инструменты, оборудование (ванночку для пипеток, стакан для инструментов и т.п.) протирает салфеткой, смоченной дезраствором, и переносит на лабораторный стол (если существует вероятность попадания на них инфицированного материала, то подвергают автоклавированию); обрабатывает, используя корнцанг, безворсовыми салфетками, смоченными дезраствором, все внутренние поверхности БМБ (заднюю, переднюю, боковые стенки, столешницу). После этого съемные фрагменты столешницы извлекает, помещает в пакет для автоклавирования, проводят обработку поддона БМБ тампонами, смоченными дезраствором. Фрагменты столешницы далее подвергают автоклавированию в соответствии с режимами, приведенными в приложении 1 СП 1.3.3118-13.

Завершив обработку, сотрудник включает УФ-лампы в БМБ и помещении, выходит в предбокс, снимает защитную одежду, помещает ее в емкость для обеззараживания; руки обрабатывает 70 % спиртом и моет с мылом. После двухчасовой экспозиции сотрудник в противочумном костюме IV типа (его аналоге) отмывает все поверхности БМБ от дезраствора, возвращает на место фрагменты столешницы, проводит влажную уборку, включает УФ-лампы в БМБ и помещении. После отключения ламп, помещение и БМБ готовы к работе.

В случае аварии с разбрызгиванием и выходом инфекционного материала за пределы рабочей камеры БМБ алгоритм действий сотрудников аналогичен порядку действий при аварии с разбрызгиванием в СП 1.3.3118-13: прекращение работы, оповещение напарника, быстрый выход из помещения всех сотрудников. Объем дезинфекционных мероприятий состоит из обработки самого помещения и рабочей камеры БМБ. Обработка сотрудников, вышедших из зоны аварии, и помещения проводится в соответствии с алгоритмом, регламентированным СП 1.3.3118-13 (пункт 2.12.4.1). Сотрудник, проводящий дезобработку комнаты, начинает с разбрызгивания дезраствора от порога помещения, орошая воздух, стены, все предметы, находящиеся в комнате, накрывает салфетками, смоченными дезраствором, места разлива инфекционного материала и осколки посуды. После экспозиции (2 ч) в комнату заходит сотрудник в противочумном костюме I типа (его аналоге), собирает салфетки, осколки, помещает их в пакет для автоклавирования и проводит обработку БМБ, как описано выше. После отмывания поверхностей от дезраствора, влажной

уборки помещения и обработки ультрафиолетовыми лампами можно возобновить работу в БМБ.

При проведении фумигации рабочей камеры БМБ следует помнить, что после обработки парами формальдегида и экспозиции необходимо провести тщательное проветривание, которое предшествует в случае БМБ II класса открыванию передней панели бокса. Если БМБ не подключен к вытяжной вентиляции, необходимо до проведения фумигации соединить гибким рукавом бокс с решеткой вытяжной системы вентиляции (ВСВ), чтобы газ поступал непосредственно в ВСВ. Все манипуляции должен проводить сотрудник, обладающий необходимыми знаниями этой процедуры и с соблюдением соответствующих предосторожностей. Кроме того, перед началом фумигации следует убедиться, что формалин не проникает в помещение, и персонал не будет подвергаться опасности воздействия газа. В качестве альтернативных дезинфекционных веществ могут использоваться пары пероксида водорода.

Авария с нарушением целостности защитной одежды при работе в БМБ чаще всего заключается в нарушении целостности перчаток. Если при выполнении каких-либо манипуляций с ПБА происходит разрыв перчатки, действия сотрудника заключаются в оповещении об аварии напарника и руководителя подразделения и далее по стандартной схеме; обработка верхней пары перчаток дезраствором, снятие перчаток, погружение их в емкость для дальнейшего автоклавирования, надевание целой пары перчаток. Вероятность разрыва защитной одежды существует, но она минимальная и требует принятия конкретных решений от прибывших на место аварии заведующего подразделением и председателя КББ. Здесь возможны варианты оценки как аварии с разбрызгиванием, аварии с ранением кожных покровов и т.д. Дать оценку/характеристику аварии должны прибывшие на место аварии руководитель подразделения и председатель КББ.

Таким образом, проведенное исследование показало, что в подвергнутых анализу литературных источниках и действующей нормативной документации отсутствует четко сформулированный порядок действий сотрудников, оказавшихся в зоне аварии с ПБА при выполнении работы в БМБ. Считаем, что рассмотренные варианты ликвидации и локализации аварий должны найти отражение в нормативных документах, в частности, санитарных правилах.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Authors:

Kostyukova T.A., Lyapin M.N., Morozov K.M. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Об авторах:

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

Поступила 26.09.16.

К 100-ЛЕТИЮ МАСГУТА АЙКИМБАЕВИЧА АЙКИМБАЕВА

31 декабря 1916 г. исполняется 100 лет со дня рождения доктора медицинских наук, профессора, ветерана Великой Отечественной войны Масгута Айкимбаевича Айкимбаева.

М.А.Айкимбаев родился в селе Знаменка Семипалатинской области Казахстана. В 1940 г. после окончания Алма-Атинского медицинского института был призван в армию. Прошел путь от рядового до старшего врача полка 5-й гвардейской стрелковой дивизии Западного фронта, главного врача танкового полка.

С 1949 по 1987 год М.А. Айкимбаев работал в Среднеазиатском научно-исследовательском противочумном институте. В 1950 г. назначен заведующим лабораторией туляремии, в 1967 г. защитил диссертацию на степень доктора медицинских наук «Туляремия в Казахстане», в 1969 г. получил звание профессора. М.А.Айкимбаевым открыт в тугайных очагах туляремии новый подвид возбудителя туляремии – *Francisella tularensis mediaasiatica Aikimb.*, который вошел в международный классификатор микроорганизмов Берджи, детально описаны природные очаги туляремии в Казахстане. М.А.Айкимбаев внес весомый вклад в изучение различных аспектов микробиологии, эпидемиологии, иммунопрофилактики особо опасных инфекций.

В течение 25 лет (1962–1987 гг.) М.А.Айкимбаев возглавлял Среднеазиатский научно-исследовательский противочумный институт. Под его руководством Среднеазиатский НИПЧИ стал одним из ведущих научно-исследовательских учреждений Казахстана. М.А.Айкимбаев организовал производство диагностических препара-



ратов по особо опасным инфекциям, строительство капитальных научных лабораторий, оснащенных современным оборудованием, обучение специалистов. В Среднеазиатском НИПЧИ проходили специализацию по особо опасным инфекциям врачи и биологи из союзных республик, стипендиаты ВОЗ из Вьетнама, Монголии, Бирмы, Китая, Кубы, Лаоса, Болгарии, Индонезии. В 1965, 1967, 1968 гг. на базе Среднеазиатского НИПЧИ проводились межрегиональные семинары ВОЗ по борьбе с чумой, в которых приняли участие специалисты из 15 стран мира. Институт осуществлял консультативно-методическое руководство противочумными станциями Казахстана, Киргизии, Узбекистана, Таджикистана.

Постановлением Правительства Республики Казахстан № 582 от 2 мая 2001 г. институт переименован в «Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций имени Масгута Айкимбаева».

Боевые и трудовые заслуги М.А.Айкимбаева отмечены Орденом Красной Звезды, Орденом Отечественной Войны 1-й степени, Орденом «Знак Почета», медалями и почетными грамотами правительства Казахской ССР, Министерства здравоохранения Казахстана и СССР, почетными званиями «Отличник здравоохранения СССР», «Заслуженный врач Казахской ССР», «Заслуженный врач МНР».

Наследие профессора М.А.Айкимбаева в науке и здравоохранении еще многие годы будет служить на благо Казахстана.

Коллектив Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций им. М.Айкимбаева

К 60-ЛЕТИЮ СЕРГЕЯ ВЛАДИМИРОВИЧА БАЛАХОНОВА

11 декабря исполнилось 60 лет Сергею Владимировичу Балахонову – директору Иркутского научно-исследовательского противочумного института Сибири и Дальнего Востока, доктору медицинских наук, профессору. Вся трудовая деятельность Сергея Владимировича связана с противочумной системой, где он прошел путь от врача в Пограничном противочумном отделении Приморской противочумной станции до директора Иркутского НИПЧИ. В институте под его руководством внедряются новые технологии в микробиологии, совершенствуются методы лабораторной диагностики, проводится изучение генетического разнообразия и изменчивости возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, клещевого энцефалита, бешенства, оптимизируются методы оценки и прогнозирования эпизоотического потенциала природных очагов опасных инфекционных болезней. Иркутский НИПЧИ обеспечивает благополучие по опасным зоонозным и природно-очаговым инфекционным болезням бактериальной и вирусной природы на востоке нашей страны.

С.В.Балахонов уделяет большое внимание подготовке научных кадров. Под его руководством подготовлены



восемь кандидатов наук, в настоящее время выполняют кандидатские и докторские работы несколько молодых ученых. Он автор (соавтор) около 400 научных публикаций, 6 монографий, 4 учебных пособий, 10 изобретений и баз данных. С.В.Балахонов является членом Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории РФ, Научного совета по медицинским проблемам Сибири и Дальнего Востока, членом редакционной коллегии журнала «Бюллетень ВСНЦ СО РАМН», редакционного совета журналов «Проблемы особо опасных инфекций» и «Эпидемиология и вакцинопрофилактика». Имеет награды Министерства здравоохранения Российской Федерации, Министерства здоровья Монголии.

Юбилейную дату Сергей Владимирович встречает в полном расцвете сил, творческой энергии и планов на будущее.

Редакционный совет и редакционная коллегия журнала «Проблемы особо опасных инфекций» поздравляют Сергея Владимировича с 60-летием и желают ему крепкого здоровья и больших творческих успехов.

О XIII Межгосударственной научно-практической конференции

1–2 ноября 2016 г. в Саратове проведены XIII Межгосударственная научно-практическая конференция «Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению Международных медико-санитарных правил (ММСП) (2005 г.) до 2016 года».

В конференции приняли участие руководители и представители ведущих учреждений санитарно-эпидемиологического профиля стран СНГ и Гвинейской Республики, представители штаб-квартиры ВОЗ (Женева), Европейского регионального бюро ВОЗ (Копенгаген), Исполнительного комитета СНГ, сотрудники органов и организаций Роспотребнадзора из 79 субъектов Российской Федерации.

Участники конференции особо отметили вклад Российской Федерации по оказанию материально-технической поддержки странам СНГ по внедрению ММСП и целесообразность продолжения содействия по укреплению регионального потенциала в сфере борьбы с инфекционными болезнями.

В ходе конференции заместитель генерального директора Национального агентства санитарной безопасности Гвинейской Республики доктор Bouna

Yattassaye выразил благодарность Российской Федерации и специалистам Роспотребнадзора, в частности, за помощь в ликвидации вспышки болезни, вызванной вирусом Эбола, и подчеркнул решающий вклад российских специалистов в усилия по противодействию эпидемии. Гвинейской стороне был передан разработанный РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора проект реконструкции лаборатории в Российско-Гвинейском научно-исследовательском центре эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней.

На конференции состоялась также презентация коллективной монографии «Ликвидация эпидемии Эбола в Гвинейской Республике: опыт работы специализированной бригады Роспотребнадзора».

В рамках конференции проведена передача Армении, Кыргызстану и Таджикистану мобильных лабораторий экспресс-диагностики, разработанных РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора в соответствии с распоряжением Правительства России № 1965 от 07.10.2014.

По результатам работы конференции принята резолюция.

Следующая Межгосударственная конференция будет проведена в 2018 г.

О XIII заседании Координационного совета по проблемам санитарной охраны территорий государств-участников Содружества Независимых Государств от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней

1 ноября 2016 г. в Саратове в рамках проведения XIII Межгосударственной научно-практической конференции состоялось XIII заседание Координационного совета по проблемам санитарной охраны территорий государств-участников Содружества Независимых Государств от завоза и распространения особо опасных инфекционных болезней. В заседании приняли участие члены Координационного совета и представители от Азербайджанской Республики, Республики Армения, Республики Беларусь, Республики Казахстан, Кыргызской Республики, Республики Молдовы, Российской Федерации, Республики Таджикистан, Республики Узбекистан, представитель Исполнительного комитета СНГ и представитель штаб-квартиры ВОЗ.

Представитель Исполкома СНГ Г.А.Нарушевич представил доклад, посвященный 25-летию СНГ. С докладом о деятельности Координационного совета в 2015–2016 гг. и задачах на 2017–2018 гг. и о реализации распоряжений Правительства Рос-

сийской Федерации № 1965-р от 07.10.2014 г. и № 1864-р от 05.09.2016 г. выступил председатель Координационного совета В.В.Кутырев.

На заседании были одобрены проекты двух документов – Положения о порядке осуществления информационного обмена между государствами-участниками СНГ о чрезвычайных ситуациях в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения и Соглашения о сотрудничестве органов, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор государств-участников СНГ при реагировании на чрезвычайные ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

Принято решение о проведении в 2018 г. XIV Межгосударственной научно-практической конференции «Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ, в том числе на территории трансграничных природных очагов чумы» и очередного заседания Координационного совета.