

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

2017

САРАТОВ

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

В.В.Кутырев, докт. мед. наук, академик РАН (Саратов)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

С.В.Балахонов, докт. мед. наук, профессор (Иркутск)
В.П.Бондарев, докт. мед. наук, профессор (Москва)
С.В.Борисевич, докт. биол. наук, профессор (Сергиев Посад)
А.Л.Гинцбург, докт. мед. наук, академик РАН (Москва)
И.А.Дятлов, докт. мед. наук, академик РАН (Оболensk)
А.Н.Куличенко, докт. мед. наук, член-корр. РАН (Ставрополь)
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)

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

С.А.Бугоркова, докт. мед. наук (Саратов)
Д.В.Викторов, докт. биол. наук (Волгоград)
О.И.Гулий, докт. биол. наук (Саратов)
Г.А.Ерошенко, докт. биол. наук (Саратов)
И.В.Жарникова, докт. биол. наук (Ставрополь)
Л.В.Карпунина, докт. биол. наук, профессор (Саратов)
В.Б.Локтев, докт. биол. наук, профессор (Кольцово)
О.В.Малецкая, докт. мед. наук, профессор (Ставрополь)
А.Н.Микеров, докт. биол. наук (Саратов)
Н.И.Микшис, докт. мед. наук (Саратов)
Н.В.Попов, докт. биол. наук, профессор (Саратов)
Ю.А.Попов, докт. биол. наук, профессор (Саратов)
Л.В.Саяпина, докт. мед. наук (Москва)
Н.И.Смирнова, докт. биол. наук, профессор (Саратов)
В.П.Топорков, докт. мед. наук, профессор (Саратов)
И.Г.Шемякин, докт. биол. наук, профессор (Оболensk)
С.А.Щербакова, докт. биол. наук (Саратов)
Т.Н.Щуковская, докт. мед. наук, профессор (Саратов)

Ответственный секретарь

Т.Б.Караваева

Тел. (845-2) 51-82-22. Факс (845-2) 51-52-12

E-mail: jour@microbe.ru

© Федеральное казенное учреждение здравоохранения
«Российский научно-исследовательский противочумный
институт «Микроб», 2017

2017, 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 Council

Balakhonov S.V., Doctor of Medical Science, Professor (Irkutsk)
Bondarev V.P., Doctor of Medical Science, Professor (Moscow)
Borisevich S.V., Doctor of Biological Science, Professor (Sergiev Possad)
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)
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 Board

Bugorkova S.A., Doctor of Medical Science (Saratov)
Victorov D.V., Doctor of Biological Science (Volgograd)
Guliy O.I., Doctor of Biological Science (Saratov)
Eroshenko G.A., Doctor of Biological Science (Saratov)
Zharnikova I.V., Doctor of Biological Science (Stavropol)
Karpunina L.V., Doctor of Biological Science, Professor (Saratov)
Loktev V.B., Doctor of Biological Science, Professor (Koltsovo)
Maletskaya O.V., Doctor of Medical Science, Professor (Stavropol)
Mikerv A.N., Doctor of Biological Science (Saratov)
Mikshis N.I., Doctor of Medical Science (Saratov)
Popov N.V., Doctor of Biological Science, Professor (Saratov)
Popov Yu. A., Doctor of Biological Science, Professor (Saratov)
Sayapina L.V., Doctor of Medical Science (Moscow)
Smirnova N.I., Doctor of Biological Science, Professor (Saratov)
Toporkov V.P., Doctor of Medical Science, Professor (Saratov)
Shemyakin I.G., Doctor of Biological Science, Professor (Obolensk)
Shcherbakova S.A., Doctor of Biological Science (Saratov)
Shchukovskaya T.N., Doctor of Medical Science, Professor (Saratov)

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 Т.А.Поршакова. Тел. (845-2) 51-82-22. Факс (845-2) 51-52-12

Пробл. особо опасных инф. 2017. Вып. 4. 1–102

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

Подписано в печать 10.12.17. Формат 60×88 1/8. Бумага мелованная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 12,49. Гарнитура Таймс. Заказ 1413
Журнал отпечатан в типографии ООО «ИППОЛит-XXI век». 410012, Саратов, Б. Казачья, 79/85

Обзоры

- Попова А.Ю., Кутырев В.В., Щербак С.А., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Топорков В.П., Попов Н.В., Сизова Я.В., Ерошенко Г.А., Бугоркова С.А., Щуковская Т.Н., Карнаухов И.Г., Осина Н.А., Поршаков А.М., Шарова И.Н., Удовиченко С.К., Иванова А.В. Вспышка легочной чумы на о. Мадагаскар в 2017 г. 5

- Шиянова А.Е., Удовиченко С.К., Дмитриева Л.Н., Иванова А.В., Топорков В.П., Куклев Е.В., Бойко А.В. Распространение инфекционных болезней, значимых для санитарной охраны территории Российской Федерации, в Восточно-Средиземноморском регионе 15

Оригинальные статьи

- Джапарова А.К., Абдикаримов С.Т., Ерошенко Г.А., Носов Н.Ю., Куклева Л.М., Адамбеков Д.А., Альджамбаева И.Ш. Оценка эффективности молекулярной диагностики *Yersinia pestis* в полевом материале из Сарыджазского очага в Кыргызстане 23

- Ефимова М.А., Хаертынов К.С., Арсланова А.Ф., Ахмадеев Р.М., Никитин А.И., Гумеров В.Г., Шуралев Э.А. Выделение, очистка и оценка серологической активности антигенов вируса бешенства 27

- Клавдиенко Е.В., Тучков И.В., Полунина Т.А., Гусева Н.П., Смирнова Н.И. Конструирование рекомбинантного штамма *Escherichia coli* продуцента основной субъединицы токсин-регулируемых пилей адгезии TcrA *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор 32

- Комиссаров А.В., Овчинникова М.В., Бадарин С.А., Бибиков Д.Н., Синицына Н.В., Костылева Н.И., Плотников И.А. Экспериментальное обоснование новой формы выпуска холерных диагностических сывороток 38

- Кузнецов А.А., Поршаков А.М., Матросов А.Н., Лопатин А.А. Применение ГИС-технологий для определения границ и площадей эпизоотических участков в природных очагах чумы 41

- Куклева Л.М., Никифоров К.А., Альхова Ж.В., Романов Н.И., Носов Н.Ю., Фадеева А.В., Малахаева А.Н., Шарапова Н.А., Девдариани З.Л., Попов Ю.А., Ерошенко Г.А. Молекулярно-генетические и фенотипические особенности штаммов возбудителя чумы, выделенных во Вьетнаме 45

- Монахова Е.В., Писанов Р.В., Титова С.В., Ежова М.И., Иванов С.А. Вариабельность генов *cef* токсигенных и нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 50

- Оглодин Е.Г., Морозов О.А., Никифоров К.А., Куклева Л.М., Шарапова Н.А., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Денисов А.В., Санаров П.П., Токмакова Е.Г., Макашова М.А., Германчук В.Г., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Видовая принадлежность, численность и динамика взаимодействия акантамеб из почв Горно-Алтайского высокогорного очага чумы со штаммами *Yersinia pestis* 56

- Попов В.П., Ватлина Т.В., Воробьева М.В., Орлов Д.С., Безсмертный В.Е. Районирование Смоленской области по степени потенциальной эпидемической опасности природных очагов туляремии 62

Reviews

- Popova A.Yu., Kutyrev V.V., Shcherbakova S.A., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakskina N.D., Toporkov V.P., Popov N.V., Sizova Ya.V., Eroshenko G.A., Bugorkova S.A., Shchukovskaya T.N., Karnaukhov I.G., Osina N.A., Porshakov A.M., Sharova I.N., Udovichenko S.K., Ivanova A.V. Outbreak of Pneumonic Plague in 2017 on Madagascar

- Shiyanova A.E., Udovichenko S.K., Dmitrieva L.N., Ivanova A.V., Toporkov V.P., Kouklev E.V., Boiko A.V. Dissemination of Infectious Diseases Significant for the Sanitary Protection of the Territory of the Russian Federation in East-Mediterranean Region

Original articles

- Dzhaparova A.K., Abdikarimov S.T., Eroshenko G.A., Nosov N.Yu., Kukleva L.M., Adambekov D.A., Al'dzhambaeva I.Sh. Evaluation of Effectiveness of *Yersinia pestis* Molecular Diagnostics in the Field Material from Sarydzhas Focus in Kyrgyzstan

- Efimova M.A., Khaertynov K.S., Arslanova A.F., Akhmadeev R.M., Nikitin A.I., Gumerov V.G., Shuralev E.A. Isolation, Purification and Evaluation of Serological Activity of Rabies Virus Antigens

- Klavdienko E.V., Tuchkov I.V., Polunina T.A., Guseva N.P., Smirnova N.I. Construction of Recombinant *Escherichia coli* Strain – Producer of Basic Subunit of Toxin-Coregulated Pilus of Adhesion (TCPA) of *Vibrio cholerae* Biovar El Tor

- Komissarov A.V., Ovchinnikova M.V., Badarin S.A., Bibikov D.N., Sinitsyna N.V., Kostyleva N.I., Plotnikov I.A. Experimental Substantiation of New Presentation Form of Cholera Diagnostic Sera

- Kuznetsov A.A., Porshakov A.M., Matrosov A.N., Lopatin A.A. Application of GIS Technologies for Determination of Boundaries and Area of Epizootic Regions within Natural Plague Foci

- Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'khova Zh.V., Romanov N.I., Nosov N.Yu., Fadeeva A.V., Malakhaeva A.N., Sharapova N.A., Devdariani Z.L., Popov Yu.A., Eroshenko G.A. Molecular-Genetic and Phenotypic Peculiarities of Plague Agent Strains Isolated in Vietnam

- Monakhova E.V., Pisanov R.V., Titova S.V., Ezhova M.I., Ivanov S.A. Variability of *cef* Genes in Toxigenic and Non-Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 Strains

- Oglodin E.G., Morozov O.A., Nikiforov K.A., Kukleva L.M., Sharapova N.A., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Denisov A.V., Sanarov P.P., Tokmakova E.G., Makashova M.A., Germanchuk V.G., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Specific Appurtenance, Numbers, and Dynamics of Interaction of Acanthamoeba from Soils of Gorno-Altai High-Mountain Plague Focus with *Yersinia pestis* Strains

- Popov V.P., Vatlina T.V., Vorob'eva M.V., Orlov D.S., Bezsmertny V.E. Zoning of the Smolensk Region by the Degree of Potential Epidemic Hazard of Natural Tularemia Foci

Попова А.Ю., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Дубянский В.М., Дёмина Ю.В., Пакскина Н.Д., Тохов Ю.М., Манин Е.А., Лазаренко Е.В., Шайхметов О.Х., Фёдорова М.В., Оробей В.Г., Юничева Ю.В., Комарова Н.С., Топорков А.В., Викторов Д.В., Гречаная Т.В., Николаевич П.Н., Куличенко О.А., Пархоменко В.В. Мероприятия по регуляции численности комаров *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus* в г. Сочи в 2016 г., результаты и пути совершенствования

66

Поршаков А.М., Кононова Ю.В., Терновой В.А., Зайковская А.В., Никифоров К.А., Агафонов Д.А., Семенцова А.О., Keita N., Яковлев С.А., Нестеров А.Е., Сергеев А.А., Toure A., Boumbaly S., Никитин П.П., Лопатин А.А., Локтев В.Б. Циркуляция лиссавирусов (*Lyssavirus*) среди мелких млекопитающих на территории Гвинейской Республики.....

72

Поступайло В.Б., Саяпина Л.В., Торопчин М.И., Далгатова А.А., Никитюк Н.Ф., Волгин А.Р., Бургасова О.А. Прогнозирование заболеваемости бруцеллезом в Российской Федерации с использованием план-графика Вальда

77

Романова Л.В., Дворцова И.В., Москвитина Э.А., Бородин Т.Н., Пичурина Н.Л., Савченко А.П., Забашта М.В., Орехов И.В., Забашта А.В. Результаты исследования методом ПЦР носителей и переносчиков на наличие возбудителей клещевых боррелиозов, моноцитарного эрлихиоза и гранулоцитарного анаплазмоза человека в природных очагах Ростовской области

81

Рыжков Ю.В., Москвитина Э.А. Особенности проведения санитарно-карантинного контроля в условиях чрезвычайной ситуации социального характера на сопредельной территории.....

86

Цимбалистова М.В., Павлович Н.В., Аронова Н.В., Чайка И.А., Чайка С.О., Водопьянов А.С. Масс-спектрометрический анализ природных и антиген-измененных штаммов туляремийного микроба

92

Краткие сообщения

Балахонov С.В., Шаракшанов М.Б., Вершинин Е.А., Махинова И.М., Ревенская Н.Г., Мошкин А.Б., Косилко С.А., Бямбажав Б., Ганхуяг Ц., Эрдэнэчимэг Л., Ууганбаяр Ц., Эрдэнэчимэг Ч., Цогбадрах Н., Цэрэнноров Д., Гандболд Д. Результаты эпизоотологического обследования монгольской части Забайкальского степного природного очага чумы в 2017 г.

97

Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Ежова М.И., Москвитина Э.А., Титова С.В. Анализ результатов мониторинга холерных вибрионов в объектах окружающей среды на административных территориях России с помощью ГИС «Холера 1989–2014»

99

Popova A.Yu., Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Dubyansky V.M., Demina Yu.V., Pakskina N.D., Tokhov Yu.M., Manin E.A., Lazarenko E.V., Shayakhmetov O.Kh., Fedorova M.V., Orobey V.G., Yunicheva Yu.V., Komarova N.S., Toporkov A.V., Viktorov D.V., Grechanaya T.V., Nikolaevich P.N., Kulichenko O.A., Parkhomenko V.V. Measures Undertaken for *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Control in 2016 in Sochi, Results and Ways of Improvement

Porshakov A.M., Kononova Yu.V., Ternovoy V.A., Zaikovskaya A.V., Nikiforov K.A., Agafonov D.A., Sementsova A.O., Keita N., Yakovlev S.A., Nesterov A.E., Sergeev A.A., Toure A., Boumbaly S., Nikitin P.P., Lopatin A.A., Loktev V.B. Circulation of Lyssaviruses (*Lyssavirus*) among the Small Mammals in the Territory of the Republic of Guinea

Postupailo V.B., Sayapina L.V., Toropchin M.I., Dalgatova A.A., Nikityuk N.F., Volgin A.R., Burgasova O.A. Forecasting of Brucellosis Morbidity Rates in the Russian Federation Using Wald Method

Romanova L.V., Dvortsova I.V., Moskvitina E.A., Borodina T.N., Pichurina N.L., Savchenko A.P., Zabashta M.V., Orekhov I.V., Zabashta A.V. PCR Results of Vector and Carrier Investigations for the Presence of Tick-Borne Borreliosis, Human Monocytic Ehrlichiosis, and Human Granulocytic Anaplasmosis Agents in Natural Foci of the Rostov Region

Ryzhkov Yu.V., Moskvitina E.A. Peculiarities of Sanitary and Quarantine Control under the Emergency Situation of Social Nature on the Adjacent Territory

Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V., Aronova N.V., Chaika I.A., Chaika S.O., Vodop'yanov A.S. Mass Spectrometric Analysis of Natural and Antigen-Modified Strains of Tularemia Agent

Brief Communication

Balakhonov S.V., Sharakshanov M.B., Verшинin E.A., Makhinova I.M., Revenskaya N.G., Moshkin A.B., Kosilko S.A., Byambazhav B., Gankhuyag Ts., Erdenechimeg L., Uuganbayar Ts., Erdenechimeg Ch., Tsogbadrakh N., Tserennorov D., Gandbold D. Results of Epizootiological Survey of the Mongolian Part of Trans-Baikal Steppe Natural Plague Focus in 2017

Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaya I.V., Ezhova M.I., Moskvitina E.A., Titova S.V. Analysis of the Results of Cholera Vibrios Monitoring in Environmental Objects in the Administrative Territories of the Russian Federation Using GIS "CHOLERA 1989–2014"

Пробл. особо опасных инф. 2017; 4:5–14. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-5-14

УДК 616.98:579.842.23(691)

А.Ю.Попова^{1,2}, В.В.Кутырев³, С.А.Щербакова³, Е.Б.Ежлова¹, Ю.В.Демина^{1,2}, Н.Д.Пакскина¹,
В.П.Топорков³, Н.В.Попов³, Я.В.Сизова⁴, Г.А.Ерошенко³, С.А.Бугоркова³, Т.Н.Щуковская³,
И.Г.Карнаухов³, Н.А.Осина³, А.М.Поршаков³, И.Н.Шарова³, С.К.Удовиченко³, А.В.Иванова³

ВСПЫШКА ЛЕГОЧНОЙ ЧУМЫ НА О. МАДАГАСКАР В 2017 г.

¹Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва;

²ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», Москва;

³ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; ⁴Посольство Российской Федерации в Республике Мадагаскар, Антананариву, Республика Мадагаскар

В статье проанализированы причины возникновения и развития вспышки легочной формы чумы на о. Мадагаскар в 2017 г. Обобщены данные литературы, характеризующие пространственную и биоценотическую структуру природного очага чумы на о. Мадагаскар, проанализированы факторы риска заражения чумой сельского и городского населения, а также свойства штаммов *Yersinia pestis*, выделенных на о. Мадагаскар в XX столетии. Отмечено, что характерный тип вспышек чумы на Мадагаскаре – сельский. Показано, что одной из основных причин широкого распространения чумы в 2017 г. является занос инфекции из центральных районов Республики Мадагаскар в крупные города с последующим формированием множественных эпидемических очагов. На острове подтверждена циркуляция штаммов *Y. pestis*, представляющих собой третью ветвь иррадиации ее восточного биовара (1.ORI3). Рассмотрены вопросы диагностики и лечения чумы в эпидемических очагах на территории Республики Мадагаскар. Обосновано, что вспышка чумы на Мадагаскаре в 2017 г. является следствием низкого уровня эпидемиологического надзора, в первую очередь недооценки возможностей специфической и неспецифической профилактики этой инфекции.

Ключевые слова: вспышка легочной чумы, возбудитель чумы, о. Мадагаскар, штаммы, противоэпидемические мероприятия.

Корреспондирующий автор: Топорков Владимир Петрович, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

A.Yu.Popova^{1,2}, V.V.Kutyrev³, S.A.Shcherbakova³, E.B.Ezhlova¹, Yu.V.Demina^{1,2}, N.D.Pakskina¹, V.P.Toporkov³,
N.V.Popov³, Ya.V.Sizova⁴, G.A.Eroshenko³, S.A.Bugorkova³, T.N.Shchukovskaya³, I.G.Karnaukhov³, N.A.Osina³,
A.M.Porshakov³, I.N.Sharova³, S.K.Udovichenko³, A.V.Ivanova³

Outbreak of Pneumonic Plague in 2017 on Madagascar

¹Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation;

²Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russian Federation; ³Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; ⁴Embassy of the Russian Federation in the Republic of Madagascar, Antananarivo, Republic of Madagascar

The causes of emergence and development of pneumonic plague outbreak in 2017 on Madagascar were analyzed. Summarized were the literature data, characterizing the spatial and biocenotic structure of natural plague focus on Madagascar, assessed were the risk factors of plague infection among rural and urban population of the island, as well as the properties of *Yersinia pestis* strains isolated there in the XX century. It is substantiated that the distinctive type of plague outbreaks on Madagascar is a rural one. It is demonstrated that one of the main causes of wide spread of plague in 2017 is importation of the infection from central regions of the Republic of Madagascar into big cities with further formation of multiple epidemic foci. Confirmed was the circulation of *Y. pestis* strains that belong to the third branch of irradiation of oriental biovar (1.ORI3). Discussed are the issues of diagnostics and treatment of plague in epidemic foci in the territory of the Republic of Madagascar. The evidence is provided to the fact that the plague outbreak in 2017 on Madagascar is the consequence of a lower surveillance level, first and foremost undervaluation of specific and non-specific prophylaxis capacities regarding this infection.

Key words: pneumonic plague outbreak, plague agent, Madagascar, strains, anti-epidemic measures.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Vladimir P. Toporkov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Popova A.Yu., Kutyrev V.V., Shcherbakova S.A., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Pakskina N.D., Toporkov V.P., Popov N.V., Sizova Ya.V., Eroshenko G.A., Bugorkova S.A., Shchukovskaya T.N., Karnaukhov I.G., Osina N.A., Porshakov A.M., Sharova I.N., Udovichenko S.K., Ivanova A.V. Outbreak of Pneumonic Plague in 2017 on Madagascar. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2017; 4:5–14. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-5-14

Начиная с последнего десятилетия XX века и по настоящее время, неблагополучная эпидемиологическая обстановка по чуме в мире формируется

за счет стран Африканского континента, на которые приходится около 96 % заболеваемости (24187 из 24993 случаев заболевания в 2000–2015 гг.). С

2010 г. Мадагаскар занимает первое место по числу заболеваний чумой в мире [10]. Случаи заболевания чумой на Мадагаскаре регистрируются ежегодно. Характерный тип вспышек чумы на Мадагаскаре – сельский, т.к. более 80 % случаев заболевания в год регистрируется у жителей сельских районов [1, 9, 12]. Сезон эпидемических проявлений чумы на Мадагаскаре начинается с октября и продолжается до конца апреля [2]. На фоне многочисленных случаев заражения сельского населения здесь ежегодно отмечают случаи осложнения бубонной формы чумы вторичной легочной [12, 16]. При заносе легочной чумы в города Республики Мадагаскар эпидемиологическая обстановка резко обостряется за счет распространения возбудителя чумы воздушно-капельным путем [29]. Все это свидетельствует о слабом эпидемиологическом надзоре, следствием чего является частое проявление легочной чумы.

В 30–50-е гг. прошлого столетия, вследствие создания на территории о. Мадагаскар эффективной системы эпидемиологического надзора за чумой уровень заболеваемости значительно снизился (с 2–4 тыс. случаев в год в 1931–1932 гг. до 200 случаев в 1941–1953 гг.). Здесь широко проводилась дератизация и дезинсекция не только в эпидемических очагах, но и непосредственно на участках обнаружения зараженных чумой грызунов и блох в природных биотопах. Существенно, что в период 1953–1978 гг. случаев заболевания чумой человека в столице Республики Мадагаскар не регистрировали. Первый случай заражения человека, после длительного перерыва, зарегистрирован в одном из самых старых районов г. Антананариву в 1979 г. В последующие годы здесь регистрировали спорадические случаи заболевания чумой. В частности, в 2014–2015 гг. в Антананариву выявлено 9 больных чумой, в том числе один случай легочной формы.

На фоне сокращения объемов профилактических работ в 80–90-х гг. прошлого столетия произошло значительное обострение эпидемической обстановки на о. Мадагаскар. С 1990 г. здесь регистрировали от 600 до 1500 случаев в год [14, 23, 24].

Подчеркнем, что основным механизмом возникновения крупных эпидемических вспышек на территории о. Мадагаскар, как и в XIX–XX веках, остается занос чумного микроба в популяции грызунов, обитающих на территории крупных населенных пунктов, в первую очередь портовых городов. В историческом плане этот процесс наиболее активно проходил в 1898–1907 гг. («портовая чума» в Таматаве в 1898–1900; Диего-Суарес – 1899; Мажунга – 1902 и 1907 гг.). Вторая волна «портовых вспышек» имела место в 1921–1947 гг. (Таматаве – 1921–1931, 1933, 1939–1946 гг.; Диего-Суарес – 1921, 1924, 1926–1927 гг., Форт-Дофин – 1924–1926 гг.; Мажунга – 1924–1928 гг.; Мананжари – 1925–1926, 1936–1940, 1947 гг.; Аналаве – 1926–1927 гг.; Ваомандри – 1928). Причем в качестве основной причины обострения эпидемической обстановки в портовых

городах Мадагаскара в 1921–1947 гг. рассматривался занос чумы из внутренних районов страны. Косвенным подтверждением этого служит развитие в 1921 г. вспышки легочной чумы и на территории Центрального плато – в г. Тананариве (современная столица Антананариву). Третья, современная волна активизации очагов чумы антропогенного типа имела место в 90-х гг. прошлого столетия (вспышки в порту Махадзанга – 1991, 1995–1999, 2013, 2017 гг.), в порту Туамасина (2017 г.) [11, 35].

В период с 2000 по 2016 год, по официальным данным ВОЗ, диагностировано 9869 случаев заболевания. В среднем ежегодно сообщалось о 580 больных чумой. Пик заболеваемости пришелся на 2000 г. (1333 случаев заболевания и 63 летальных исхода) и 2004 г. (1214 и 98 соответственно). Летальность при чуме на Мадагаскаре значительно варьирует в ходе отдельных вспышек. В последние годы наблюдается увеличение количества летальных исходов (до 23,7 %), что, вероятно, связано с участвовавшими случаями легочной формы чумы [25, 35]. Чума на Мадагаскаре встречается в двух формах – бубонной и легочной [9]. Преобладающей клинико-эпидемиологической формой является бубонная чума. Почти в половине случаев чума регистрируется у детей в возрасте до 16 лет, что объясняется большей подвижностью этой возрастной категории населения и тесным контактом с природно-очаговыми комплексами. Наибольшему риску заражения чумой подвергаются лица мужского пола в связи их пребыванием на очаговой территории при выполнении профессиональных обязанностей [12]. Доля легочной формы чумы в различные годы варьирует от 2 до 35 %. В отношении заболеваемости легочной формой возрастных и половых различий не выявлено. Наиболее высокая частота случаев регистрации первичной легочной формы чумы отмечена на Центральном плато – глубинные, более высокие и не жаркие части Мадагаскара. На побережье острова легочная чума регистрируется крайне редко.

Энзоотичная по чуме территория в основном приурочена к сухим ландшафтам, характерным для всех возвышенных районов Центрального нагорья Мадагаскара, расположенных выше 800 м над уровнем моря. В прошлом столетии здесь сформировались природные и природно-антропоургические очаги чумы, характеризующиеся высокой эпизоотической и эпидемической активностью [5]. Наибольшее эпидемиологическое значение повсеместно имеют черная крыса – *Rattus rattus* и блоха вида *Xenopsylla cheopis* [2, 5, 9]. Природная очаговость поддерживается здесь двумя подвидами черной крысы, заселяющей как прибрежные леса (*R. rattus rattus*), так и высокое плоскогорье (*R. r. alexandinus*) [6]. Наряду с *X. cheopis* здесь также зарегистрированы блохи *Synopsyllus estradei*, *Dinopsyllus brachypecten*, а также виды рода *Paractenopsyllus*. На западном побережье проявления чумы зарегистрированы только в границах портовых городов. В портовом городе

Махадзанга отдельные случаи заражения связывают с серой крысой – *R. norvegicus*. Здесь также отмечено вовлечение в эпизоотии чумы землероек вида *Suncus murinus*, в шерсти которых отмечены блохи *X. cheopis* [31]. На восточном побережье, в округе Ambositra (в административном районе Ankazomivady), штаммы *Y. pestis* выделены от черной крысы *R. rattus* и черноголового тернека – *Hemicentetes nigriceps*. В 1998 г. в округе Ikongo и в 2000–2001 гг. в округе Anosibe-Anala зарегистрированы случаи заболевания людей. Плотность населения достигает 20–49 чел. на 1 кв. км. Заболеваемость бубонной формой имеет место в годы повышенной численности блох *X. cheopis* и при наличии эпизоотий чумы среди крыс *R. rattus*.

Отмечаемый в конце XX и начале XXI веков рост заболеваемости чумой на о. Мадагаскар целиком обусловлен повышением эпидемической активности антропоургических и природно-антропоургических очагов в условиях ухудшения социально-экономических условий жизни населения [5]. Наиболее высоко эпидемически активные очаги расположены в провинциях Антананариву, Махадзанга, Фианаранцуа, Туамасина [9]. Территории с постоянной эпидемической активностью характеризуются высокой плотностью населения (более 100 чел на 1 кв. км.). Подчеркнем, что черная крыса (*R. rattus*) в условиях тропиков является полусинантропным грызуном и во влажный период (сентябрь–март) обитает в жилье человека, в сухой (май–август) – в открытых стациях. На территории Центрального плато эндемичным видом блох на черной крысе является *Synopsyllus fonquerniei*, которая на территории побережий отсутствует. В связи с широким распространением и постоянной высокой эпидемической активностью природно-антропоургических очагов чумы, они представляют реальную постоянную угрозу для распространения инфекции в другие районы о. Мадагаскар, что и имело место в 2017 г.

Первый случай заболевания легочной формы чумы связан с путешествием 31-летнего мужчины из Туамасины общественным транспортом из района Анказобе в Таматаве (через Антананариву). Во время путешествия мужчина почувствовал ухудшение состояния и скончался в госпитале Антананариву 23 августа 2017 г. Случаи заболевания зарегистрированы у большого количества контактировавших с ним лиц (вторичные случаи). В последующий период случаи легочной формы чумы были зарегистрированы в различных частях страны, в том числе и в не эндемичных районах и крупных городах. 13 сентября 2017 г. официально объявлено о начале нынешней вспышки чумы после смерти 47-летней женщины в больнице Соавинандриана (Антананариву). Проведенные посмертно лабораторные тесты подтвердили диагноз легочной формы чумы.

По данным ВОЗ, на 09.12.2017 г. общее количество больных чумой составило 2529 случаев, большую часть которых (1945 – 77,0 %) состави-

ли больные легочной формой. На указанную дату зарегистрированы 370 случаев бубонной (15 %) и 1 (0,1 %) – септической формы чумы; 213 случаев – с неустановленной формой заболевания. Зарегистрировано 215 случаев смерти (показатель летальности – 8,5 %). С начала вспышки заболел чумой 81 медицинский работник. За период вспышки выявлено 7289 контактных лиц, которым проведен курс профилактического лечения антибиотиками. Случаи легочной формы чумы выявлены в 57 районах страны из 114 (50 %), 68 % от всех случаев заболевания зарегистрированы в Антананариву. За период с 27.11.2017 по 09.12.2017 зарегистрировано 112 новых случаев чумы на Мадагаскаре, шесть из них – летальные. Из вновь зарегистрированных 91 случай предположительно легочной формы чумы. За этот период зарегистрировано три подтвержденных случая легочной и три подтвержденных случая бубонной формы чумы. Отмечена общая тенденция к снижению заболеваемости. Темпы заболеваемости легочной формой чумы имеют заметную тенденцию к снижению. Количество новых случаев болезни резко сокращается, что свидетельствует о том, что пиковая фаза вспышки завершена.

Темпы нарастания количества больных чумой, в том числе легочной формой заболевания, в ходе развития вспышки на Мадагаскаре в 2017 г., представленные в последовательно выходивших 14 докладах ВОЗ, приведены в табл. 1.

Данные табл. 1 свидетельствуют о неуклонной тенденции снижения общего количества больных и случаев легочной чумы. Учитывая, что в указанных докладах ВОЗ приведены сведения за различные промежутки времени, варьирующие от 2 до 6 дней, была проведена группировка усредненного количества больных по пятидневкам. Динамика их значений в ходе вспышки представлена на рисунке.

Приведенные на рисунке данные свидетельствуют о неуклонном уменьшении общего количества больных чумой и больных легочной формой, что свидетельствует об эффективности проводимых противоэпидемических мероприятий.

С начала вспышки чумы на Мадагаскаре 2017 г. выделено 30 штаммов *Yersinia pestis* чувствительных ко всем антибиотикам, рекомендуемым и используемым в рамках Национальной Программы по борьбе с чумой (табл. 2). Несмотря на это риск приобретения чумным микробом множественной лекарственной устойчивости достаточно высок [13], свидетельством чего является факт выделения в прошлом из клинического материала антибиотикоустойчивых штаммов *Y. pestis* на территории острова [20].

В частности, в 1995 г. в районе Антананариву от больного бубонной чумой выделен штамм *Y. pestis*, устойчивый к 8 антимикробным агентам – стрептомицину, хлорамфениколу, тетрациклину, сульфонамиду, тетрациклину, ампициллину, канамицину и спектиномицину. Устойчивость к лекарственным препаратам кодировалась конъюгативной плазмидой

Динамика заболеваемости чумой на Мадагаскаре, по данным докладов ВОЗ в 2017 г.
(<http://www.afro.who.int/health-topics/plague/plague-outbreak-situation-reports>)

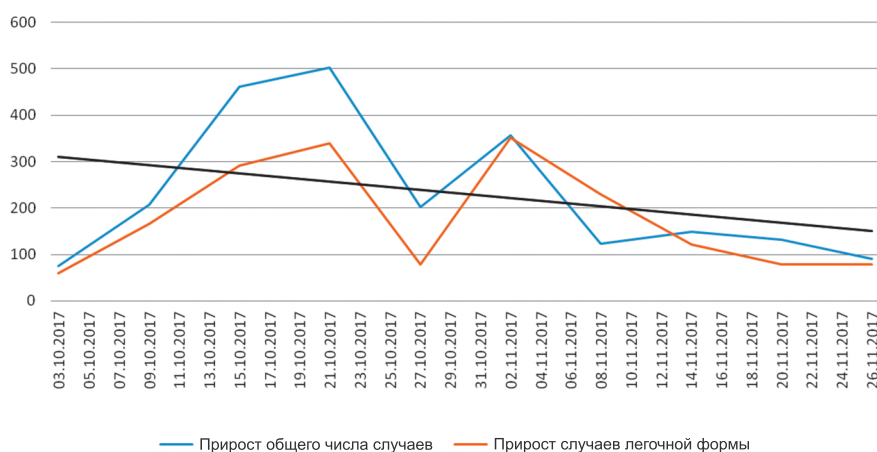
№ доклада ВОЗ, дата	Общее количество случаев заболевания	Случаи легочной формы чумы	Прирост общего числа случаев заболевания	Прирост случаев заболевания легочной формой
1 от 04.10.2017	194	124	-	-
2 от 09.10.2017	387	277	193	153
3 от 12.10.2017	684	474	297	197
4 от 17.10.2017	849	568	165	94
5 от 20.10.2017	1297	846	448	278
6 от 26.10.2017	1309	882	12	36
7 от 31.10.2017	1801	1111	492	229
8 от 06.11.2017	1947	1437	146	326
9 от 09.11.2017	2034	1565	87	128
10 от 14.11.2017	2119	1618	85	53
11 от 17.11.2017	2203	1705	84	87
12 от 20.11.2017	2267	1732	64	27
13 от 27.11.2017	2384	1828	36	37
14 от 04.12.2017	2417	1854	33	26

pIP1202 размером около 150 т.п.н. В эксперименте плазида с высокой частотой (около $1 \cdot 10^{-2}$) передавалась другим штаммам *Y. pestis* или *Escherichia coli* и, по-видимому, получена от энтеропатогенной бактерии [17, 18]. В том же году от больного бубонной чумой в районе Ampitana выделен штамм, резистентный к стрептомицину. Стрептомицинрезистентность кодировалась плазмидой pIP1203, имевшей размер около 40 т.п.н., которая также могла с высокой частотой (около $1 \cdot 10^{-1}$) передаваться другим штаммам *Y. pestis* и *Yersinia pseudotuberculosis* [17]. В дальнейшем штаммов с подобной антибиотикорезистентностью не выделено.

В 1996–1997 гг. один ампициллинустойчивый и один хлорамфениколустойчивый клинические штаммы выделены в порту Mahajanga; один тетрациклинустойчивый изолят – от крысы, два ампициллинустойчивых – от блох получены в Антананариву. Еще один антибиотикоустойчивый штамм выделен от крысы в Антананариву в 1998 г. Устойчивость к доксициклину кодировалась конъюгативной плазмидой pIP2180H, гомологичной плазмиде pB71 из

Salmonella enterica [13]. Возникновение антибиотикоустойчивого штамма *Y. pestis* с множественной лекарственной устойчивостью и его распространение может представить серьезную проблему для здравоохранения.

Особенностями эпидемических проявлений чумы на Мадагаскаре в 2017 г. является то, что начало вспышки зарегистрировано в августе, что не характерно для данной территории; наличие существенного преобладания случаев легочной чумы (70 %) при достижении практически пикового количества больных чумой за последние 17 лет за счет заболеваемости в основном в крупных городах с высокой плотностью населения (Антананариву и Туамасина), что повышает риск передачи инфекции и отчасти объясняет ее быстрое распространение. Помимо этого, заболеваемость регистрируется в Северных и Юго-Восточных регионах страны, которые ранее не считались эндемичными. В связи с этим можно предположить, что причиной возникновения вспышки послужил занос инфекции из центральных районов Республики Мадагаскар (первый случай заболе-



Динамика прироста общего числа случаев заболевания чумой и числа случаев легочной формы в ходе вспышки на Мадагаскаре в 2017 г.

Таблица 2

Чувствительность к антибиотикам штаммов *Yersinia pestis*, выделенных во время вспышки чумы на Мадагаскаре в 2017 г.

Район	Форма заболевания	Дата забора	Дата изоляции штаммов <i>Y. pestis</i>	Stx.	Tet.	Cip.	Chl.
Andramasina	Бубонная	22.09.2017	03.10.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Manalanga	Легочная	12.09.2017	23.09.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Miarinarivo	Бубонная	15.08.2017	21.09.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Miarinarivo	Бубонная	29.07.2017	21.09.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Miarinarivo	Бубонная	28.08.2017	29.09.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Moramanga	Бубонная	05.09.2017	21.09.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Tsiroanomandidy	Бубонная	17.09.2017	03.10.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Antarenivohitra	Легочная	29.09.2017	05.10.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Tsiroanomandidy	Бубонная	01.10.2017	04.10.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Manjakandriana	Бубонная	03.10.2017	04.10.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Tsiroanomandidy	Бубонная	01.10.2017	10.10.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Arivonimamo	Легочная	06.10.2017	17.10.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Ambalabao	Бубонная	19.09.2017	17.10.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Manandriana	Бубонная	20.09.2017	17.10.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Ambalabao	Бубонная	09.09.2017	17.10.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Tsiroanomandidy	Бубонная	30.09.2017	14.10.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Tsiroanomandidy	Бубонная	07.10.2017	18.10.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Tsiroanomandidy	Бубонная	08.10.2017	18.10.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Antra-renivohitra	Легочная	15.10.2017	25.10.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Ambalabao	Бубонная	09.10.2017	24.10.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Ambalabao	Бубонная	08.10.2017	25.10.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Tsiroanomandidy	Бубонная	14.10.2017	22.10.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Antra-renivohitra	Легочная	05.10.2017	30.10.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Arivonimamo	Бубонная	23.10.2017	31.10.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Miarinarivo	Бубонная	19.10.2017	01.11.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Ankazobe	Бубонная	08.10.2017	04.11.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Mandritsara	Бубонная	16.10.2017	04.11.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Tsiroanomandidy	Бубонная	22.10.2017	07.11.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Tsiroanomandidy	Бубонная	25.10.2017	09.11.2017	чув.	чув.	чув.	чув.
Andramasina	Легочная	06.11.2017	14.11.2017	чув.	чув.	чув.	чув.

Примечание: чув. – культура чувствительна к антибиоту; Stx. – стрептомицин; Tet. – тетрацилин; Cip. – ципрофлоксацин; Chl. – хлорамфеникол.

вания зарегистрирован у жителя района Анказобе в центральной части высокогорья).

Эпидемиологическое неблагополучие по чуме на Мадагаскаре обусловлено сложностью контроля заболеваемости в труднодоступных коммунах, куда можно добраться только пешком; проведением обряда отпевания умершего (по неизвестным причинам) дома, в течение двух суток с посещением всех родственников; захоронение умерших в семейных склепах с последующим ежегодным посещением родственниками для того, чтобы вынести тело из склепа. Определенное значение имеют и социально-гигиенические факторы такие, как бедность, несоблюдение санитарно-гигиенических условий жизни, недостаток питьевой воды, проблемы с канализацией. В периоды ликвидации вспышек чумы сказывается нехватка медицинского персонала, недостаток коечного фонда в госпиталях, невозможность со-

блюдения требований биологической безопасности в полной мере, о чем свидетельствует большое количество заболевших медицинских работников в 2017 г.

В целом борьба со вспышкой чумы в Республике Мадагаскар организована в соответствии со специально разработанным и одобренным 4 октября 2017 г. национальным планом. Согласно этому плану стратегия борьбы с чумой базировалась на четырех ключевых элементах: эпидемиологический надзор, ведение больных, ответные мероприятия на общинном уровне и социальная мобилизация и коммуникация с населением. Объем финансирования национального плана составил 10 млн долларов США, из которых 6,5 млн – это средства для обеспечения мер быстрого реагирования. Основными задачами плана являлись: взятие под контроль вспышки болезни, обеспечение выявления, госпитализации и лечения

больных, выявление и профилактическое лечение контактировавших, мобилизация в этом процессе всех сил оперативного реагирования с подключением местного населения.

По данным ЮНИСЕФ, основные ответные меры были сконцентрированы на информировании населения (в том числе посредством СМС-сообщений) о симптомах болезни, рисках заражения и доступном, бесплатном лечении подозрительных и подтвержденных случаев, отслеживании лиц, контактировавших с подозрительными на чуму или больными, а также о проведении ряда превентивных мероприятий по недопущению дальнейшего распространения болезни, таких как ограничение на проведение массовых мероприятий, временное прекращение занятий в школах, скрининг и контроль в аэропортах и на основных транспортных магистралях между пострадавшими областями.

Создан Координационный комитет, возглавляемый Премьер-министром, в состав которого вошли все вовлеченные в процесс министерства для обеспечения межсекторального сотрудничества в принятии решений. На оперативном уровне межведомственная поддержка со стороны участников, не входящих в сектор здравоохранения (СМИ, транспорт, оборона, образование), координировалась Национальным департаментом по управлению рисками и ЧС (BNGRС). Первичный ответ на вспышку чумы со стороны системы здравоохранения координировался Министерством общественного здравоохранения и Всемирной Организацией Здравоохранения при посредничестве Центрального оперативного штаба. Последний, в свою очередь, объединял пять комиссий по борьбе с ЧС (эпидемиологического надзора, ведения пациентов, по организации мер реагирования на общинном уровне, социальной мобилизации и коммуникации, комиссия по логистике). В их задачи входило планирование и реализация комплексных технических ответных мер. Комиссии, возглавляемые Министерством здравоохранения и партнерами, также включали в себя: Министерство водоснабжения и гигиены, Министерство образования и народонаселения, и Международные технические партнеры – ВОЗ, Фонд помощи детям ООН, Врачей без границ, Агентство США по международному развитию, Международную федерацию Красного Креста и Красного Полумесяца и др. Институт Пастера на Мадагаскаре, выступая в качестве признанного головного учреждения в мероприятиях по реагированию на чуму на глобальном уровне, оказывал дополнительную техническую поддержку.

С момента объявления о вспышке болезни региональное бюро ВОЗ (Африка) в тесном сотрудничестве с партнерами, включая партнеров по Глобальной сети предупреждения о вспышках болезней и ответных действий (GOARN), обеспечивало техническую и оперативную поддержку стране в борьбе с чумой. Региональные центры чрезвычайных операций (ЕОС) функционировали в наиболее пора-

женных районах страны – Антананариву, Маджунга, Фианарантсоа, Фенериве Эст.

При непосредственном участии международных партнеров созданы девять центров по лечению чумы, шесть из которых находились в Антананариву. Международные партнеры: IFRC (Международная федерация Красного Креста и Красного Полумесяца), MSF (Врачи без границ), UNICEF (Фонд помощи детям ООН), WHO (Всемирная Организация Здравоохранения).

Экспертные группы, состоящие из представителей ВОЗ (Женева и Браззавиль), Центра по контролю заболеваемости (CDC) США и их региональных представительств в Канаде и Африке, Службы общественного здравоохранения Англии, были направлены в пять наиболее пострадавших районов (Антананариву, Тоамасина, Маджунга, Фианарантсоа, Фенериве Эст) для усиления потенциала ответных мер.

В поддержку Министерства здравоохранения Мадагаскара и других национальных органов власти партнеры развернули группы реагирования на чрезвычайные ситуации. По состоянию на 16 октября 2017 г. в общей сложности задействовано 114 специалистов из разных стран мира (из них 17 специалистов из CDC, 11 – из GOARN, 43 – из WHO).

24 октября 2017 года группа ученых и специалистов Роспотребнадзора прибыла в Республику Мадагаскар для оказания содействия и снижения риска заболевания российских граждан, находящихся на территории этой страны, включая сотрудников Посольства Российской Федерации и членов их семей. Сотрудниками Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора в адрес российского диппредставительства на Мадагаскаре доставлены средства индивидуальной защиты (защитные комбинезоны, маски, перчатки), а также 500 доз российской противочумной вакцины, произведенных Ставропольским научно-исследовательским противочумным институтом Роспотребнадзора. Проведен инструктаж и оказано практическое и методическое содействие в обеспечении противоэпидемических мероприятий, направленных на защиту здоровья находящихся в Республике Мадагаскар российских граждан. 26 октября по просьбе органов здравоохранения Мадагаскара специалисты Роспотребнадзора провели занятия с местными медицинскими работниками и организаторами здравоохранения по вопросам осуществления противоэпидемических и профилактических мероприятий в природных очагах чумы.

Лабораторная диагностика чумы на Мадагаскаре предусматривает проведение исследований по предложенной ВОЗ схеме, согласно которой индикацию чумного микроба осуществляют на основании выявления в пробе F1-антигена с помощью иммуноферментного и иммунохроматографического анализа, определения специфических антител к F1 в сыворот-

ке крови больных в диагностическом титре, обнаружения ДНК патогена методом ПЦР, в ходе бактериологического анализа выделяют культуру возбудителя чумы на плотной питательной среде и проводят ее идентификацию по характеру роста на плотных и жидких питательных средах, тинкториальным свойствам, биохимической активности, чувствительности к диагностическим бактериофагам [37].

При организации лабораторных исследований придерживаются следующего принципа: в случае возникновения новых случаев заболевания положительными считаются пробы, в которых возбудитель чумы выявлен не менее чем двумя методами (микроскопия, наличие F1-антигена, антител специфичных к F1, ДНК *Y. pestis*), при развитии вспышки и эпидемии допускается использование только одного метода для проведения анализа. В первичных медицинских организациях Мадагаскара наибольшее распространение для этих целей получил иммунохроматографический тест, направленный на выявление в пробе F1-антигена чумного микроба – Rapid Diagnosis Test (RDT) for F1 Ag detection. Установлено, что его аналитическая чувствительность составляет 0,5 нг/мл F1-антигена, время проведения анализа – не более 15 мин. При исследовании 166 проб клинического материала (мокрота, сыворотка крови, моча, содержимое бубона) от больных диагностическая чувствительность теста «RDT for F1 Ag detection» была 100 %, также как и его специфичность – при изучении 420 проб от здоровых людей ни в одном случае положительных результатов не отмечено [15].

Аналогичные диагностические показатели для данного препарата отмечены при исследовании материала от грызунов, бактериальных суспензий штаммов возбудителя чумы, выделенных на Мадагаскаре, странах Африки и Азии. Показано, что процент ложноотрицательных результатов для «RDT for F1 Ag detection» составляет не более 5 % и во многом этот показатель определяется низким содержанием в образцах F1-антигена чумного микроба.

Специалистами отделений Института Пастера в Париже и на Мадагаскаре в 2004 г. разработан иммунохроматографический тест для выявления суммарных антител, специфичных к F1 чумного микроба, в сыворотке крови человека и мелких млекопитающих и иммуноглобулинов класса IgM в сыворотке крови человека – Rapid Diagnosis Test (RDT) for Ab anti-F1. Установлено, что при исследовании материала от человека чувствительность препарата составляет 84,6 %, специфичность – 98 %, а проб от грызунов и других мелких млекопитающих – 87,8 и 90,3 % соответственно [32]. Полученные результаты, по мнению авторов, указывают на перспективность внедрения теста «RDT for Ab anti-F1» в работу первичных организаций здравоохранения Мадагаскара.

Применение полимеразной цепной реакции (ПЦР) для выявления ДНК чумного микроба в пробах клинического материала на Мадагаскаре было осуществлено L. Rahalison *et al.* в 2000 г. [30]. Авторы

в качестве ДНК-мишени использовали участок *cafI* гена размером 501 п.н., а регистрацию результатов амплификации проводили методом электрофореза в агарозных гелях. Установлено, что предложенный подход не имел достаточной чувствительности: из 64 образцов от больных людей ДНК патогена обнаружена в 57 случаях (89 %). Совпадение результатов между ПЦР и иммунохроматографическим тестом «RDT for F1 Ag detection» составило 80,7 % (63 из 78 образцов), между ПЦР и бактериологическим методом – 50 % (25 из 50 образцов), ПЦР и выявлением F1-антигена методом ИФА – 35,2 % (19 из 54 образцов). Полученные результаты не позволили авторам на тот период времени рекомендовать использование ПЦР для первичного скрининга проб клинического и полевого материала.

Позднее предложен более чувствительный способ выявления ДНК чумного микроба методом ПЦР, который основан на детекции фрагментов генов *pla* и *cafI*, специфичных для возбудителя чумы, с регистрацией результатов в режиме реального времени [33]. Показано, что из 149 образцов, содержащих возбудитель чумы, культура патогена была выделена в 47 случаях, F1-антиген методом ИФА обнаружен в 88 случаях, а ДНК патогена с помощью разработанного подхода – в 120. Исходя из полученных данных авторы делают вывод о том, что предложенный способ может рассматриваться как один из методов исследования проб от больных людей с бубонной формой чумы.

Штаммы *Y. pestis*, завезенные в 1898 г. на Мадагаскар, относятся к восточному биоварианту возбудителя, который получил распространение во время третьей пандемии чумы, начавшейся в Китае в 1855 г. Как и другие штаммы основного подвида штаммы восточного биовара отличаются высокой вирулентностью. Мадагаскарские штаммы представляют собой третью ветвь иррадиации восточного биовара (1.ORI3). Она была завезена из Индии на Мадагаскар и укоренилась там, в то время как первая ветвь иррадиации (1.ORI1) распространилась по территории Северной Америки, а вторая (1.ORI2) получила множественное распространение в Европе, Южной Америке, Африке и Юго-Восточной Азии [28, 36].

Анализ выделенных на о. Мадагаскар штаммов *Y. pestis* был проведен с помощью различных методов молекулярного типирования. Выявлено значительное генетическое разнообразие этих штаммов [21, 34, 36]. Полногеномный SNP-анализ показал, что все мадагаскарские штаммы *Y. pestis* распадаются на два специфических для Мадагаскара кластера: 1.ORI.3.k и его производный 1.ORI.3.d. Первый кластер существовал на Мадагаскаре уже в 1926 г., когда там был выделен штамм EV76, который в дальнейшем использовали для создания аттенуированной живой чумной вакцины. Другие штаммы кластера 1.ORI.3.k выделены в разных высокогорных и прибрежных районах Мадагаскара в различные годы.

Штаммы второго кластера 1.ORI.3.d, напротив, ограничены небольшим высокогорным регионом около Fianarantsoa.

Полногеномное секвенирование 31 штамма *Y. pestis*, а также VNTR-генотипирование 773 малагасийских образцов *Y. pestis*, выделенных с 1995 по 2012 год [36], подтвердило разделение штаммов на группы I (k) и II (d), с выявлением дополнительных линий в пределах каждой группы. В целом идентифицировано 18 основных филогенетических субгрупп, включая 13 SNP-линий (субгруппы h, j, l, q-z) и 5 MLVA (субгруппы I.C, I.G, I.E, I.L и II.D.1). При этом обосновано, что стойкие эндемичные циклы трансмиссии *Y. pestis* на локальных участках ответственны за долговременное сохранение чумы на Мадагаскаре [36]. В РосНИПЧИ «Микроб» проведено полногеномное секвенирование вакцинного штамма EV НИИЭГ, который депонирован в международной базе данных NCBI GenBank.

В 2017 г. в отношении вспышки чумы на Мадагаскаре ВОЗ рекомендует внедрять проверенные стратегии по предотвращению и контролю за инфекцией: координация ответных мер, надзор и лабораторное подтверждение диагноза, выявление и наблюдение за контактными лицами, своевременное лечение пострадавших и безопасное захоронение тел умерших, контроль за переносчиками. Основные контрольно-профилактические мероприятия под руководством ВОЗ направлены на ограничение передачи инфекции от человека человеку и предупреждение разрастания масштабов эпидемии легочной чумы. Вспышка чумы на Мадагаскаре – наглядная иллюстрация реальных проблем здравоохранения в стране, обусловленных, в том числе, недооценкой возможности специфической профилактики этой инфекции. Исторический опыт применения специфической профилактики, связанный с использованием живой вакцины из штамма G.Girard и J.Robic [19] на о. Мадагаскар в период 1935–1950 гг. свидетельствует о значительном снижении количества случаев заболевания чумой и благоприятном течении инфекции у заболевших. Отказ от использования противочумных вакцин после 1959 г. на Мадагаскаре на фоне социального неблагополучия населения страны, недостаточно развитой системы здравоохранения стал причиной столь бурного распространения инфекции и сопряжен с выявлением легочной формы чумы. Ситуация обостряется ввиду слабой эффективности лечения легочной формы чумы имеющимся арсеналом антибиотиков.

До настоящего времени окончательно еще не расшифрованы молекулярные механизмы патогенности чумного микроба, реализующиеся в условиях взаимодействия с организмом человека и определяющие развитие инфекционного процесса, а также исход болезни. Высокая вирулентность возбудителя чумы обусловлена синергическим взаимопотенцирующим действием целого комплекса разнонаправленных факторов, которые позволяют ему обойти

или преодолеть иммунную защиту макроорганизма, блокируя развитие стереотипной воспалительной реакции на начальном этапе инфекционного процесса и препятствуя элиминации возбудителя из организма хозяина [7, 22, 26].

На модели бубонной чумы у крыс *R. norvegicus*, наиболее близкой к организму человека биомодели, показано, что чумной микроб достигает регионарного дренирующего лимфатического узла в интервале от 6 до 36 часов после внутрикожного введения, где интенсивно размножается, реализуя свой патогенный потенциал, что соответствует стадии развития бубонной формы чумы. Через 48–72 ч процесс может стать генерализованным, приводя к колонизации чумным микробом кровяного русла, селезенки, печени, дистальных лимфатических узлов и развитию вторичного чумного сепсиса. Аналогичная этапность в течении чумной инфекции наблюдается и в условиях моделирования легочной формы чумы на данных экспериментальных животных при интраназальном заражении 600 LD₅₀ вирулентного штамма *Y. pestis* CO92. В течение 12–24 ч после инфицирования возбудитель чумы выявлялся у зараженных животных бактериологическим методом только в легких при отсутствии у биомоделей видимых клинических симптомов болезни. Через 36–48 ч возбудитель высевался уже из всех органов в возрастающих титрах при резком ухудшении состояния биомодельных животных и последующей их гибели в интервале 48–60 ч [8].

Позднее начало этиотропного лечения антибактериальными препаратами при недостаточности патогенетической терапии, в первую очередь при легочной форме чумы, может приводить к массивному поступлению в результате гибели бактериальных клеток *Y. pestis* липополисахарида, способствующего развитию тяжелого эндотоксического шока, полиорганной недостаточности и приводящему к летальному исходу. Описанные клинические случаи легочной чумы в Китае [27] полностью подтверждают данное положение. Применение живой чумной вакцины из штамма *Y. pestis* EV линии НИИЭГ на протяжении 70 лет демонстрирует ее высокую эффективность для защиты людей [3], а многолетними генетическими исследованиями доказана невозможность реверсии в макроорганизме этого вакцинного штамма к вирулентности [4].

В заключение отметим, что основными проблемами вопросами организации противочумных мероприятий в Республике Мадагаскар в 2017 г. являлись отсутствие эпидемиологического надзора, включая эпизоотологический мониторинг природных очагов, и недооценка роли специфической и неспецифической профилактики. Министерство здравоохранения Республики Мадагаскар испытывает острую нехватку кадров по особо опасным инфекциям, госпитальных баз, средств индивидуальной защиты в условиях отсутствия собственной лабораторной базы и низкого уровня санитарно-гигиенического

просвещения населения. Отсутствие национальных лабораторий создает определенные трудности при доставке проб из отдаленных районов и проведении исследований. Для снижения риска заражения чумой в природно-антропоургических и антропоургических очагах чумы острова необходимо организовать работы по вакцинации и проведению полевой и поселковой дератизации и дезинсекции. В природно-антропоургических очагах необходимо проведение барьерной дератизации и дезинсекции вокруг населенных пунктов, расположенных на участках стойкого проявления чумы.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Арутюнов Ю.И., Москвитина Э.А., Ломов Ю.М., Мишанькин Б.Л., Волохонская Н.Л. Некоторые особенности эпидемических проявлений чумы на Мадагаскаре. *Пробл. особо опасных инф.* 2001; 2(82):61–8.
- Козакевич В.П., Варшавский С.Н., Лавровский А.А. Природная очаговость чумы на Мадагаскаре. *Пробл. особо опасных инф.* 1973; 1:26–32.
- Коробкова Е.И. Живая противочумная вакцина. М.: Медгиз; 1956. 206 с.
- Кутырев В.В., Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Виноградова Н.А. Сравнительная генетическая характеристика вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV и его предполагаемых «вирулентных производных». *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2009; 4:50–6.
- Кутырев В.В., Попов Н.В., Ерошенко Г.А., Меркулова Т.К. Чума на о. Мадагаскар. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 2(108):5–11.
- Неронов В.М., Малхазова С.М., Тикуннов В.С. Региональная география чумы. *Итоги науки и техники. Серия Медицинская география.* М.; 1991. 230 с.
- Подладчикова О.Н. Современные представления о молекулярных механизмах патогенеза чумы. *Пробл. особо опасных инф.* 2017; 3:33–40.
- Anderson D.M., Ciletti N.A., Lee-Lewis H., Elli D., Segal J., DeBord K.L., Overhaim K.A., Tretiakova M., Brubaker R.R., Schniwind O. Pneumonic plague pathogenesis and immunity in Brown Norway rats. *Am. J. Pathol.* 2009; 174(3):910–21.
- Atlas de la peste a Madagascar. Institut Pasteur de Madagascar; 2004. 53 p.
- Bertherat E. Plague around the world, 2010–2015. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2016; 8:89–104.
- Boisier P., Rasolomaharo M., Ranaivoson G., Rasoamanana B., Rakoto L., Andriamahafazafy B., Chanteau S., Urban epidemic of bubonic plague in Mahajanga, Madagascar. *Epidemiological aspects. Trop. Med. Int. Health.* 1997; 2:422–7.
- Brygoo E.R. Epidemiologie de la peste à Madagascar. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar.* 1996; 35:9–147.
- Cabanel N., Bouchier C., Rajerison M., Carniel E. Plasmid-mediated doxycycline resistance in a *Yersinia pestis* strain isolated from a rat. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2017; 10 pii: S0924-8579(17)30363-1. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2017.09.015.
- Chanteau S., Ratsifasoamanana L., Rasoamanana B., Rahalison L., Randriambeloso J., Roux J., Rabeson D. Plague, a reemerging disease in Madagascar. *Emerg. Infect. Dis.* 1998; 1(4):101–4.
- Chanteau S., Rahalison L., Ralafiarisoa L., Foulon J., Ratsitorahina M., Ratsifasoamanana L., Carniel E., Nato F. Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *Lancet.* 2003; 361(9353):211–6.
- Coulanges P., Situation de la peste à Tananarive, de son apparition en 1921 à sa résurgence en 1979. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar.* 1979; 56:9–35.
- Galimand M., Guiyoule A., Gerbaud G., Rasoamanana B., Chanteau S., Carniel E., Courvalin P. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. *N. Engl. J. Med.* 1997; 337:677–80.
- Galimand M., Carniel E., Courvalin P. Resistance of *Yersinia pestis* to antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50:3233–6.
- Girard G., Robic J. L'état actuel de la peste a Madagascar et la prophylaxie vaccinale par le virus vaccin E.V. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1942; 35(1–2):42–9.
- Guiyoule A., Gerbaud G., Buchrieser C., Galimand M., Rahalison L., Chanteau S., Courvalin P., Carniel E. Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in a clinical isolate of *Yersinia pestis*. *Emerg. Infect. Dis.* 2001; 7(1):43–8.
- Guiyoule A., Rasoamanana B., Buchrieser C., Michel P., Chanteau S., Carniel E. Recent emergence of new variants of *Yersinia pestis* in Madagascar. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35:2826–33.
- Hammamieh R., Muhie S., Borschel R., Gautam A., Miller S.-A., Chakraborty N., Jett M. Temporal Progression of Pneumonic Plague in Blood of Nonhuman Primate: A Transcriptomic Analysis. *PLoS ONE.* 2016; 11(3):e0151788. DOI:10.1371/journal.pone.0151788.
- Human Plague in 1996. *Wkly Epidemiol. Rec.* 1998; 73(47):366–9.
- Human plague: review of regional morbidity and mortality 2004–2009. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2010; 85(6):40–5.
- Institute Pasteur de Madagascar. Plague, pneumonic – Madagascar. ProMed-mail. 21 February 2011 [cited 25 Feb 2011]. Archive Number 20110221.0563. Available from: <http://www.promedmail.org>.
- Li B., Yang R. Interaction between *Yersinia pestis* and host immune system. *Infect. Immun.* 2008; 76(5):1804–11.
- Li Y., Li D., Shao H., Li H., Han Y. Plague in China 2014 – All sporadic case report of pneumonic plague. *BMC Infect. Dis.* 2016; 16:85. DOI: 10.1186/s12879-016-1403-8.
- Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J., Eppinger M., Roumagnac P., Wagner D.M., Feldkamp M., Kusecek B., Vogler A.J., Li Y., Cui Y., Thomson N.R., Jombart T., Leblois R., Lichtner P., Rahalison L., Petersen J.M., Balloux F., Keim P., Wirth T., Ravel J., Yang R., Carniel E., Achtman M. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. *Nat. Genet.* 2010; 42(12):1140–3. DOI: 10.1038/ng.7054.
- Plague, pneumonic – Madagascar (04). ProMed-mail. 01 Apr 2011 [cited 2 Apr 2011]. Archive Number 20110401.1006. Available from: <http://www.promedmail.org>.
- Rahalison L., Vololonirina E., Ratsitorahina M., Chanteau S. Diagnosis of bubonic plague by PCR in Madagascar under field conditions. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(1):260–3.
- Rahelirina S., Rajerison M., Telfer S., Savin C., Carniel E., Duplantier J.M. The Asian House shrew *Suncus murinus* as a reservoir and source of human outbreaks of plague in Madagascar. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11(11):e0006072.
- Rajerison M., Darteville S., Ralafiarisoa L.A., Bitam I., Tuyet D.T., Andrianivoarimanana V., Nato F., Rahalison L. Development and evaluation of two simple, rapid immunochromatographic tests for the detection of *Yersinia pestis* antibodies in humans and reservoirs. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2009; 3(4):e421. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000421.
- Riehlm J.M., Rahalison L., Scholz H.C., Thoma B., Pfeffer M., Razanakoto L.M., Al Dahouk S., Neubauer H., Tomaso H. Detection of *Yersinia pestis* using real-time PCR in patients with suspected bubonic plague. *Mol. Cell. Probes.* 2011; 25(1):8–12. DOI: 10.1016/j.mcp.2010.09.002.
- Torrea G., Chenal-Francisque V., Leclercq A., Carniel E. Efficient tracing of global isolates of *Yersinia pestis* by restriction fragment length polymorphism analysis using three insertion sequences as probes. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:2084–92.
- Tsuzuki S., Lee H., Miura F., Chan Y.H., Jung S.M., Akhmetzhanov A.H., Nishiura H. Dynamics of the pneumonic plague epidemic in Madagascar, August to October 2017. *Euro Surveill.* 2017; 22(46):17-00710. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.46.17-00710.
- Vogler A.J., Andrianivoarimanana V., Telfer S., Hall C.M., Sahl J.W., Hepp C.M., Centner H., Andersen G., Birdsall D.N., Rahalison L., Nottingham R., Keim P., Wagner D.M., Rajerison M. Temporal phylogeography of *Yersinia pestis* in Madagascar: insight into the long-term maintainance of plague. *PLoS Negl. Trop. Disease.* 2017; 1:27 DOI: 10.1371/journal.pntd.0005887.
- WHO/CDS/CSR/EDC/99.2. Plague Manual – Epidemiology, Distribution, Surveillance and Control. WHO; 1999.

References

- Arutyunov Yu.I., Moskvitina E.A., Lomov Yu.M., Mishan'kin B.L., Volokhonskaya N.L. [Certain peculiarities of epidemic manifestations of plague on Madagascar]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2001; 2(82):61–8.
- Kozakevich V.P., Varshavsky S.N., Lavrovsky A.A. [Natural plague focus on Madagascar]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1973; 1:26–32.
- Korobkova E.I. [Live Plague Vaccine]. M.: "Medgiz"; 1956. 206 p.
- Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Kuleva L.M., Shavina N.Yu., Vinogradova N.A. [Comparative genetic characteristics of vaccine *Yersinia pestis* strain EV and its potential "virulent derivatives"]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunol.* 2009; 4:50–6.
- Kutyrev V.V., Popov N.V., Eroshenko G.A., Merkulova T.K. [Plague in Madagascar]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 2(108):5–11.
- Neronov V.M., Malkhazova S.M., Tikunov V.S. [Regional Geography of Plague]. [Advances in Science and Technology. Medical geography series]. M.; 1991. 230 p.
- Podladchikova O.N. [Modern views on molecular mechanisms

- of plague pathogenesis]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2017; 3: 33–40. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-3-33-40.
8. Anderson D.M., Ciletti N.A., Lee-Lewis H., Elli D., Segal J., DeBord K.L., Overhaim K.A., Tretiakova M., Brubaker R.R., Schniwind O. Pneumonic plague pathogenesis and immunity in Brown Norway rats. *Am. J. Pathol.* 2009; 174(3):910–21.
9. Atlas de la peste a Madagascar. Institut Pasteur de Madagascar; 2004. 53 p.
10. Bertherat E. Plague around the world, 2010–2015. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2016; 8:89–104.
11. Boiesier P., Rasolomaharo M., Ranaivoson G., Rasoamanana B., Rakoto L., Andriamahafazafy B., Chanteau S., Urban epidemic of bubonic plague in Mahajanga, Madagascar. Epidemiological aspects. *Trop. Med. Int. Health.* 1997; 2:422–7.
12. Brygoo E.R. Epidemiologie de la peste à Madagascar. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar.* 1996; 35:9–147.
13. Cabanel N., Bouchier C., Rajerison M., Carniel E. Plasmid-mediated doxycycline resistance in a *Yersinia pestis* strain isolated from a rat. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2017; 10:pil: S0924-8579(17)30363-1. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2017.09.015.
14. Chanteau S., Ratsifasoamanana L., Rasoamanana B., Rahalison L., Randriambeloso J., Roux J., Rabeson D. Plague, a reemerging disease in Madagascar. *Emerg. Infect. Dis.* 1998; 1(4):101–4.
15. Chanteau S., Rahalison L., Ralafiarisoa L., Foulon J., Ratsitorahina M., Ratsifasoamanana L., Carniel E., Nato F. Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *Lancet.* 2003; 361(9353):211–6.
16. Coulanges P., Situation de la peste à Tananarive, de son apparition en 1921 à sa résurgence en 1979. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar.* 1979; 56:9–35.
17. Galimand M., Guiyoule A., Gerbaud G., Rasoamanana B., Chanteau S., Carniel E., Courvalin P. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferable plasmid. *N. Engl. J. Med.* 1997; 337:677–80.
18. Galimand M., Carniel E., Courvalin P. Resistance of *Yersinia pestis* to antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50:3233–6.
19. Girard G., Robic J. L'état actuel de la peste a Madagascar et la prophylaxie vaccinale par le virus vaccin E.V. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1942; 35(1–2):42–9.
20. Guiyoule A., Gerbaud G., Buchrieser C., Galimand M., Rahalison L., Chanteau S., Courvalin P., Carniel E. Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in a clinical isolate of *Yersinia pestis*. *Emerg. Infect. Dis.* 2001; 7(1):43–8.
21. Guiyoule A., Rasoamanana B., Buchrieser C., Michel P., Chanteau S., Carniel E. Recent emergence of new variants of *Yersinia pestis* in Madagascar. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35:2826–33.
22. Hammamieh R., Muhie S., Borschel R., Gautam A., Miller S.-A., Chakraborty N., Jett M. Temporal Progression of Pneumonic Plague in Blood of Nonhuman Primate: A Transcriptomic Analysis. *PLoS ONE.* 2016; 11(3):e0151788. DOI:10.1371/journal.pone.0151788.
23. Human Plague in 1996. *Wkly Epidemiol. Rec.* 1998; 73(47):366–9.
24. Human plague: review of regional morbidity and mortality 2004–2009. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2010; 85(6):40–5.
25. Institut Pasteur de Madagascar. Plague, pneumonic – Madagascar. ProMed-mail. 21 February 2011 [cited 25 Feb 2011]. Archive Number 20110221.0563. Available from: <http://www.promedmail.org>.
26. Li B., Yang R. Interaction between *Yersinia pestis* and host immune system. *Infect. Immun.* 2008; 76(5):1804–11.
27. Li Y., Li D., Shao H., Li H., Han Y. Plague in China 2014 – All sporadic case report of pneumonic plague. *BMC Infect. Dis.* 2016; 16:85. DOI: 10.1186/s12879-016-1403-8.
28. Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J., Eppinger M., Roumagnac P., Wagner D.M., Feldkamp M., Kusecek B., Vogler A.J., Li Y., Cui Y., Thomson N.R., Jombart T., Leblois R., Lichtner P., Rahalison L., Petersen J.M., Balloux F., Keim P., Wirth T., Ravel J., Yang R., Carniel E., Achtman M. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. *Nat. Genet.* 2010; 42(12):1140–3. DOI: 10.1038/ng.7054.
29. Plague, pneumonic – Madagascar (04). ProMed-mail. 01 Apr 2011 [cited 2 Apr 2011]. Archive Number 20110401.1006. Available from: <http://www.promedmail.org>.
30. Rahalison L., Vololonirina E., Ratsitorahina M., Chanteau S. Diagnosis of bubonic plague by PCR in Madagascar under field conditions. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(1):260–3.
31. Rahelinirina S., Rajerison M., Telfer S., Savin C., Carniel E., Duplantier J.M. The Asian House shrew *Suncus murinus* as a reservoir and source of human outbreaks of plague in Madagascar. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11(11):e0006072.
32. Rajerison M., Darteville S., Ralafiarisoa L.A., Bitam I., Tuyet D.T., Andrianavoaarimanana V., Nato F., Rahalison L. Development and evaluation of two simple, rapid immunochromatographic tests for the detection of *Yersinia pestis* antibodies in humans and reservoirs. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2009; 3(4):e421. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000421.
33. Riehm J.M., Rahalison L., Scholz H.C., Thoma B., Pfeffer M., Razanakoto L.M., Al Dahouk S., Neubauer H., Tomaso H. Detection of *Yersinia pestis* using real-time PCR in patients with suspected bubonic plague. *Mol. Cell. Probes.* 2011; 25(1):8–12. DOI: 10.1016/j.mcp.2010.09.002.
34. Torrea G., Chenal-Francisque V., Leclercq A., Carniel E. Efficient tracing of global isolates of *Yersinia pestis* by restriction fragment length polymorphism analysis using three insertion sequences as probes. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:2084–92.
35. Tsuzuki S., Lee H., Miura F., Chan Y.H., Jung S.M., Akhmetzhanov A.H., Nishiura H. Dynamics of the pneumonic plague epidemic in Madagascar, August to October 2017. *Euro Surveill.* 2017; 22(46):17-00710. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.46.17-00710.
36. Vogler A.J., Andrianavoaarimanana V., Telfer S., Hall C.M., Sahl J.W., Hepp C.M., Centner H., Andersen G., Birdsell D.N., Rahalison L., Nottingham R., Keim P., Wagner D.M., Rajerison M. Temporal phylogeography of *Yersinia pestis* in Madagascar: insight into the long-term maintenance of plague. *PLoS Negl. Trop. Disease.* 2017; 1:27 DOI: 10.1371/journal.pntd.0005887.
37. WHO/CDS/CSR/EDC/99.2. Plague Manual – Epidemiology, Distribution, Surveillance and Control. WHO; 1999.

Authors:

Popova A.Yu., Demina Yu.V. 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 of Continuing Professional Education; 2/1, Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russian Federation.

Ezhlova E.B., 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., Shcherbakova S.A., Toporkov V.P., Popov N.V., Eroshenko, G.A. Bugorkova S.A., Shchukovskaya T.N., Karnaukhov I.G., Osina N.A., Porshakov A.M., Sharova I.N., Udovichenko S.K., Ivanova A.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Sizova Ya.V. Embassy of the Russian Federation in the Republic of Madagascar. Antananarivo, Republic of Madagascar.

Об авторах:

Попова А.Ю., Демина Ю.В. 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 непрерывного профессионального образования; Российская Федерация, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1.

Ежлова Е.Б., 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., Щербакова С.А., Топорков В.П., Попов Н.В., Ерошенко Г.А., Бугоркова С.А., Шуковская Т.Н., Карнаухов И.Г., Осина Н.А., Поришakov А.М., Шарова И.Н., Удовиченко С.К., Иванова А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Сизова Я.В. Посольство Российской Федерации в Республике Мадагаскар. Республика Мадагаскар, Антананариву.

Поступила 12.12.17.

А.Е.Шиянова, С.К.Удовиченко, Л.Н.Дмитриева, А.В.Иванова, В.П.Топорков, Е.В.Куклев, А.В.Бойко

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ, ЗНАЧИМЫХ ДЛЯ САНИТАРНОЙ ОХРАНЫ ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, В ВОСТОЧНО-СРЕДИЗЕМНОМОРСКОМ РЕГИОНЕ

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

Цель работы. Обобщить эпидемиологические данные и проанализировать ситуацию в странах Восточно-Средиземноморского региона по инфекционным болезням, требующим проведения мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации, государств-участников СНГ, стран Евразийского экономического союза. **Материалы и методы.** Эпидемиологический анализ проведен по данным официальных сайтов и периодических изданий ВОЗ, Восточно-Средиземноморского бюро ВОЗ, Министерств здравоохранения стран, Центра по контролю и профилактике заболеваний, других международных организаций, а также материалам публикаций в открытом доступе. **Результаты и выводы.** Обобщены и систематизированы данные по заболеваемости и территориальному распространению болезней в каждой конкретной стране с позиции возможных рисков для посещающих ее лиц. Представленные данные по инфекционным болезням позволяют ориентироваться в вопросах, связанных с риском заражения инфекционными болезнями, определить факторы и сезонность повышенного риска заражения, прогнозировать возможность завоза болезней в Российскую Федерацию. Данные могут быть полезными для расчета качественной и количественной оценки потенциальной эпидемической опасности при обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия при массовых международных мероприятиях.

Ключевые слова: особо опасные инфекционные болезни, Восточно-Средиземноморский регион, обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия.

Корреспондирующий автор: Шиянова Анжела Евгеньевна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

A.E.Shiyanova, S.K.Udovichenko, L.N.Dmitrieva, A.V.Ivanova, V.P.Toporkov, E.V.Kouklev, A.V.Boiko

Dissemination of Infectious Diseases Significant for the Sanitary Protection of the Territory of the Russian Federation in East-Mediterranean Region

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

Objective of the study is to generalize epidemiological data and assess the situation in the countries of East-Mediterranean region on infectious diseases that require the measures on sanitary protection of the territory of the Russian Federation, CIS member-states, and Eurasian Economic Union. **Materials and methods.** Epidemiological analysis was carried out using the data of official websites and periodical publications of WHO, WHO East-Mediterranean Office, National Health Ministries, Center for Disease Control and Prevention, other international organizations and open-access literature sources. **Results and conclusions.** Systematized and summarized have been the data on morbidity rates and spatial dissemination of diseases in each particular country from the point of view of possible risks to visiting them individuals. The data presented on the infectious diseases allow for addressing the issues associated with the risk of infection; identification of the factors and terms of high risk of infection; for forecasting the probability of disease importation into the Russian Federation. The information may prove to be useful for quantitative and qualitative evaluation of potential epidemic hazard in the course of sanitary-epidemiological welfare provision under international mass events.

Key words: particularly dangerous infectious diseases, East-Mediterranean region, sanitary-epidemiological welfare provision.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Anzhela E. Shiyanova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Shiyanova A.E., Udovichenko S.K., Dmitrieva L.N., Ivanova A.V., Toporkov V.P., Kouklev E.V., Boiko A.V. Dissemination of Infectious Diseases Significant for the Sanitary Protection of the Territory of the Russian Federation in East-Mediterranean Region. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 4:15–22. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-15-22

В современных условиях информационно-аналитическая прогнозно-моделирующая оценка инфекционной заболеваемости в странах мира является неотъемлемой составляющей мониторинга и контроля актуальных угроз и вызовов эпидемиологического плана, рисков нарушения международных сообщений, в том числе при обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия при массовых международных мероприятиях (ММ). Ранее в публикациях были представлены данные, в основном количественные, по заболеваемости в мире инфекционными болезнями, обозначаемыми как требую-

щие проведения мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации и регламентированными Санитарно-эпидемиологическими правилами СП 3.4.2318-08 «Санитарная охрана территории Российской Федерации» [6, 8]. Данный обзор составлен на основе материалов, собранных в справочном эпидемиологическом издании (размещен на сайте РосНИПЧИ «Микроб»), где предпринята попытка дать подробную эпидемиологическую характеристику стран Ближнего Востока и Северной Африки, входящих в Восточно-Средиземноморский регион Всемирной организации здравоохранения

(ВОЗ) в период с 2000 г. по настоящее время, позволяющую ориентироваться в вопросах, связанных с риском заражения инфекционными болезнями, определить факторы и сезонность повышенного риска заражения, прогнозировать возможность завоза болезней в Российскую Федерацию. При обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия при подготовке и проведении ММ представленные данные могут быть полезными для расчета качественной и количественной оценки потенциальной эпидемической опасности ММ.

Материалы и методы

В основу обзора положены данные официальных сайтов и периодических изданий ВОЗ, Восточно-Средиземноморского бюро ВОЗ, Министерств здравоохранения соответствующих стран, Центра по контролю и профилактике заболеваний (CDC). Использована информация из публикаций и с сайтов других международных организаций (Продовольственная и сельскохозяйственная орга-

низация, Всемирная организация здравоохранения животных), электронные ресурсы сетей по сбору оперативной информации (ProMED-mail, EpiSouth, arbo-zoonet и др.). Подробный обзор электронных источников, значимых для получения оперативной и ретроспективной информации о заболеваемости, приведен ранее [9]. Для эпидемиологической характеристики стран использованы также материалы статей в рецензируемых журналах, освещающие эпидемиологические вопросы. При расчете интенсивных показателей заболеваемости (табл. 1) использованы оценочные данные Департамента по экономическим и социальным вопросам Организации Объединенных Наций (Отдел народонаселения) на 2017 г. по численности населения в странах.

Результаты и обсуждение

Регион Восточное Средиземноморье включает страны, расположенные в западной части Азии и северо-восточной Африки. Господствующая религия – ислам. Численность населения региона со-

Таблица 1

Среднегодовые показатели на 100 тыс. населения по особо опасным инфекциям в странах Восточно-Средиземноморского региона (за период 2000–2016 гг.) и эндемичность территории

Страна	Чума		Холера		Малярия		Лих-ка денге		КГЛ		ЛЗН		Полио-миелит		Менин-гокок. инф.		Лих-ка Рифт-Валли		Грипп птиц		Си-бирская язва		Бруцеллез	
	ИП	N	ИП	N	ИП	N	ИП	N	ИП	N	ИП	N	ИП	N	ИП	N	ИП	N	ИП	N	ИП	N	ИП	N
Афганистан	0,31	1	30,0"	14	433,1"	14	/ /		0,07	11			0,09	17							0,1	8	3,7	9
Бахрейн											0,1	1											0,1	1
Джибути			114,3	5	224,8	15	5,1	9	/ /		/ /								1,02	1			/ /	
Египет							0,25	1	0,003	1	0,001	2	0,005	5			0,6	1	0,04	11			4,3	3
Иордания											/ /				0,25	17							3,1	17
Ирак			4,7"	12	1,28	15			0,11	4	/ /		0,01	2					0,02	2			8,1	11
Иран			0,38"	13	1,4	16	/ /		0,1	9			0,004	1							0,23	10	22,8"	10
Йемен			27,2"	7	261,9"	15	9,9	9					0,33	9			6,1	1					19,8	11
Катар															0,75	9							2,3	9
Кувейт											/ /												3,7	8
Ливан											/ /												5,2	12
Ливия*	0,08	1									/ /						/ /						4,0	12
Марокко					0,02	5															0,06	5	0,03	12
ОАЭ																							1,83	7
Оман			0,1	5	0,1	17			0,3	6					0,2	17							5,7	17
Пакистан			0,34"	5	92,0"	16	3,5	6	0,07	6			0,06	17					0,001	1				
Саудовская Аравия					2,9	16	9,7	3					0,008	1	0,07	11	4,25	1					18,1	17
Сирия											0,01	1	0,11	2									76,3"	10
Сомали			168,3"	16	445,8"	16	0,84	2					0,3	8			0,46	2			0,01	1		
Судан			45,6	4	1730,0"	16	1,1	5	0,02	3	0,1	1	0,09	9	4,1	9	1,1	2			0,04	1	1,27	2
Тунис											0,2	6					/ /						3,5	12

Примечания: N – число лет регистрации. * Количественных данных по заболеваемости в Ливии нет.

	– наличие в стране энзоотичной территории или природных очагов, данных о заболеваемости нет;
1,4	– регистрация спорадической заболеваемости людей в отдельные годы;
	– вспышки в отдельные годы;
"	– вспышки практически ежегодно;
/ /	– только серологические данные или данные о вывозе болезни из страны;
0,01	– развитие эпидемических осложнений в результате завозов болезни.

ставляет более 630 млн человек. Плотность населения варьирует от 4 чел./км² (Ливия) до 1769 чел./км² (Бахрейн). На большей части территории региона климат аридный и семиаридный. Узкая приморская полоса отличается теплым и влажным климатом. Растительность в основном пустынная и степная. Ряд стран региона характеризуются политической нестабильностью (ирано-иракская война, перевороты в Ливии и Египте, гражданская война в Сирии).

Чума. На территории 12 стран региона – Афганистана, Ирака, Ирана, Йемена, Кувейта, Ливана, Ливии, Марокко, Пакистана, Саудовской Аравии, Сирии, Туниса – доказано существование природных очагов чумы (табл. 2).

В последние 50 лет случаи заболевания зарегистрированы в Саудовской Аравии, Афганистане, Ливии, Марокко, Иордании. В Ливии в июне 2009 г., после 25-летнего отсутствия, зарегистрировано 5 подтвержденных случаев (в том числе 1 летальный – септическая форма) в полупустынном районе недалеко от границы с Египтом (в 30–60 км от г. Тобрук). В мае 2011 г. во время революции в Ливии было сообщено

о вспышке болезни (более 20 подозрительных случаев), не получившей лабораторного подтверждения. В конце 2007 г. описана вспышка чумы с симптомами острого гастроэнтерита в провинции Нимруз на юге Афганистана: 83 случая, 17 летальных – вследствие потребления зараженного мяса верблюдов [20].

Холера эндемична в 9 странах региона. За 15 лет заболеваемость в регионе выросла в 4,8 раза (с 14534 случаев в 2000 г. до 70665 случаев в 2015 г.). Причинами неблагополучной эпидемиологической обстановки по холере являются неудовлетворительные санитарно-гигиенические условия, внутригосударственная и межгосударственная миграция, связанная с перемещением сотен тысяч беженцев, в том числе в результате военных конфликтов, слабая инфраструктура системы здравоохранения и отсутствие надлежащей медицинской помощи [4].

Высокий показатель заболеваемости людей, вспышки практически ежегодно регистрируются в Афганистане, Ираке, Иране, Йемене, Сомали, Пакистане, периодически регистрируется вспышечная заболеваемость в Джибути, Судане (табл. 1).

Таблица 2

Природные очаги чумы в регионе Восточного Средиземноморья [1, 2, 3, 5]

Природные очаги чумы	Регион	Носители чумы в природных очагах
Саудовско-Йеменский пустынный нагорно-равнинный	Приграничные территории Саудовской Аравии (Эль-Асир) и Йемена (Хавлан)	<i>Gerbillus nanus</i> , <i>G. cheesmani</i> , <i>Meriones rex</i> , <i>Rattus rattus</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>Acomys cahirinus</i> , <i>Jaculus jaculus</i> и, возможно, <i>Psammomys obesus</i>
Ливанский горно-степной	Приморская часть Сирии, горная часть Ливана (хребты Ливан и Антиливан) и Израиль	Песчанки рода <i>Meriones</i>
Сирийско-Месопотамский пустынный	Сирийское плоскогорье, Верхняя и Нижняя Месопотамия (Ирак), Кувейт (юго-запад страны и побережье)	<i>M. libycus</i> , <i>Tatera indica</i> , <i>Nesokia indica</i> , <i>R. rattus</i> , <i>R. norvegicus</i> , <i>Mus musculus</i> . Эпизоотологическое значение могут иметь <i>G. cheesmani</i> , <i>G. dasyurus</i> , <i>G. nanus</i> , <i>M. crassus</i>
Турецко-Сирийский равнинный полупустынно-пустынный	Южная часть Турции, северная Сирия	<i>Mesocricetus brandti</i> , <i>Microtus socialis</i> , <i>Tatera indica</i> , <i>M. vinogradovi</i> , <i>M. libycus</i> , <i>M. tristrami</i> , <i>Nesokia indica</i>
Курдо-Иранский (Курдистанский) горно-степной	Западная часть Иранского нагорья, юго-восток Турции, северо-восток Ирака	<i>M. libycus</i> , <i>M. persicus</i> , <i>M. vinogradovi</i> , <i>M. tristrami</i> . Присутствуют также грызуны родов <i>Microtus</i> , <i>Mesocricetus</i> , <i>Allactaga</i> и <i>Cristolus</i>
Ирано-Афганский низкогорно-пустынный	Плоскогорья Западного Афганистана, Центрально-Иранское низкогорье с бессточными депрессиями Деште-Кевир и Деште-Лут, горы Северного Ирана (Туркмено-Хорасанские, Копетдаг)	<i>Spermophilus fulvus</i> , <i>Dryomys nitedula</i> , <i>Allactaga elater</i> , <i>Pygeretmus pumilio</i> , <i>Paradipus ctenodactylus</i> , <i>Cricetulus migratorius</i> , <i>Microtus socialis</i> , <i>Tatera indica</i> , <i>M. persicus</i> , <i>M. libycus</i> , <i>M. meridianus</i> , <i>Rhombomys opimus</i> , <i>Sylvaemus uralensis</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>Nesokia indica</i>
Южно-Афганский равнинный	Песчаная пустыня Регистан, пески в нижнем течении реки Гильменд, глинисто-щебнистая пустыня Дашти-Маркох	<i>Allactaga elater</i> , <i>Tatera indica</i> , <i>M. persicus</i> , <i>M. libycus</i> , <i>Rhombomys opimus</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>Nesokia indica</i>
Афгано-Пакистанский среднегорный пустынно-степной	Центрально-восточная часть Афганистана, западные районы Пакистана	<i>Spermophilus fulvus</i> , <i>Marmota caudata</i> , <i>Dryomys nitedula</i> , <i>Allactaga elater</i> , <i>Cricetulus migratorius</i> , <i>Alticola argentatus</i> , <i>Microtus juldashi</i> , <i>Tatera indica</i> , <i>M. libycus</i> , <i>M. persicus</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>Sylvaemus uralensis</i> , <i>Nesokia indica</i>
Гиндукушский высокогорный	Горная система Гиндукуш, расположенная в Афганистане	<i>Marmota caudata</i> , <i>Dryomys nitedula</i> , <i>Cricetulus migratorius</i> , <i>Alticola argentatus</i> , <i>Microtus juldashi</i> , <i>M. persicus</i> , <i>Mus musculus</i> , <i>Sylvaemus uralensis</i>
Природные очаги Северной Африки		
Ливия	Западная Ливия (Триполитания) и северо-восток недалеко от границы с Египтом (Киренаика)	<i>G. gerbillus</i> и <i>M. Shawi</i> , <i>M. libycus</i> . В северных очагах также <i>M. caudatus</i> , <i>Psammomys obesus</i>
Марокко	Атлантическое побережье (Дуккала-Абда), северо-центральные (Мекнес-Тафилалет, Шавия-Вардига) и южные области страны (равнинные плато Хамада-Дра и Хамада-Гир)	<i>R. norvegicus</i> на севере страны, <i>R. rattus</i> и <i>R. rattus alexandrinus</i> на юге и на побережье, 9 видов песчанок – <i>M. libycus</i> , <i>G. campestris</i> , <i>G. nanus</i> и др., возможно <i>Pachyuromys duprasi</i> .
Египет	Предположительно Верхний Египет (провинция Асьют вплоть до Асуана)	<i>R. rattus</i> , <i>R. norvegicus</i> (в портах), второстепенные носители – <i>Acomys cahirinus</i> (вдоль Суэцкого канала), <i>Arvicanthis niloticus</i>
Тунис	Южные районы близ горного массива Демер и равнина Джефара, центральные и юго-западные – область обширной котловины Шотт-Джерид и северная окраина Большого Восточного Эрга	Песчанки родов <i>Gerbillus</i> и <i>Meriones</i>

Спорадические случаи отмечены в Ливане, Омане. О завозных случаях поступают сообщения из Саудовской Аравии, Омана, Кувейта, Бахрейна. Осложнение эпидемиологической обстановки в 2016–2017 гг. связано с крупными вспышками в Сомали, Йемене и Судане. В Сомали с января 2016 по сентябрь 2017 г. общее число подозрительных случаев составило 76236 чел., в том числе 1157 летальных (1,5 %). Значительный рост числа заболевших отмечен в апреле 2017 г., когда выявлено 16612 новых случаев холеры (249 летальных). Наибольшее число больных – в Вададжире (провинция Банадир), Харфо (Мудуг), Душамаребе (Гальгудуд) и Марке (Нижняя Шабелле). В августе 2016 г. началась эпидемия холеры в Судане, первые сообщения о случаях «острой водянистой диареи» поступили из штата Голубой Нил. В дальнейшем болезнь распространилась в восточную и центральную часть страны. На сентябрь 2017 г. оценочное число заболевших составило около 24 тыс. Эпидемия в Йемене, начавшаяся в сентябре 2016 г., в настоящее время является самой большой в мире. Холера охватила 22 из 23 провинций страны. По состоянию на 15 ноября 2017 г. зарегистрировано 926187 подозрительных на холеру случаев (2200 летальных – 0,23 %). Подъем заболеваемости также пришелся на апрель 2017 г., когда ежедневно сообщалось примерно о 5 тыс. заболевших. Наибольшее количество случаев заболевания (около 70000 подозрительных случаев) отмечено в западной провинции Худайда [12].

Полиомиелит. На территории двух эндемичных стран – Пакистана и Афганистана – вспышки с местной передачей дикого полиовируса регистрируются ежегодно (2015 г. – 54 и 20 случаев соответственно; 2016 г. – 20 и 13; на 28 ноября 2017 г. – 5 и 10) [17]. В странах региона, свободных от полиомиелита, сохраняется риск распространения инфекции, связанный с завозными случаями. Последние завозные случаи с последующей местной передачей полиовируса отмечены в 2014 г. в Сомали, Ираке и Сирии. В течение 2013–2014 гг. в Сирии зарегистрировано 36 случаев инфицирования диким полиовирусом 1-го типа в районах боевых действий (Алеппо, Идлиб и эпицентр вспышки – в северо-восточной провинции Дейр-Эз-Зор). Отмечена международная передача из Сирии в Ирак (2 случая). Ситуация, связанная с распространением полиомиелита в Сирии в 2014 г., объявлена чрезвычайной в области общественного здравоохранения, имеющей международное значение. Кроме того, в 2017 г. эпидемическая ситуация в Сирии осложнилась циркуляцией вакцинного штамма полиовируса 2-го типа с эпицентром вспышки в р-не Эль-Маядин (провинция Дейр-Эз-Зор), зарегистрировано 70 случаев заболевания (на 28 ноября 2017 г.) вакциноассоциированного полиомиелита [17].

Малярия. В настоящее время местная передача малярии осуществляется на территории 8 стран региона, две из них (Иран и Саудовская Аравия) находятся на стадии ликвидации болезни. В структуре заболеваемости малярией в регионе наибольшее количество случаев приходится на три страны: Судан

(36 %), Пакистан (27 %), Сомали (18 %). Высокий показатель заболеваемости и вспышки в отдельные годы отмечены также в Афганистане, Джибути, Иране, Ираке. Преимущественно тропическая форма малярии регистрируется в Джибути, Сомали, Йемене и Судане, трехдневная форма – Пакистане, Иране, Афганистане. О завозных случаях заболевания ежегодно сообщается в Саудовской Аравии (высокий показатель заболеваемости, преимущественно завозится тропическая форма), Иране, Тунисе. По оценкам ВОЗ, за последние 15 лет заболеваемость малярией в регионе снизилась на 75 % (с 9,3 млн в 2000 г. до 5,3 млн в 2015 г.), смертность – на 64 %, однако высокому риску заражения (≥ 1 на 1000 населения) продолжает подвергаться 111 млн жителей региона, низкому (< 1 случая на 1000 населения) – 291 млн.

Как и во многих эндемичных по малярии странах, основным вмешательством по борьбе с малярией в 1950–1970 гг. было опрыскивание в закрытых помещениях ДДТ, которое в последующие годы продолжалось с использованием органофосфатных инсектицидов, таких как малатион. Начавшееся в 1990-е годы использование обработанных инсектицидами сеток получило значительное распространение с 2007 г. Распределение сеток пролонгированного действия, обработанных дельтаметрином, среди домашних хозяйств в эндемичных районах в настоящее время является основной мерой по борьбе с малярией. Широкое использование пестицидов в борьбе с переносчиками болезней, а также в сельском хозяйстве, возможно, способствовало развитию их устойчивости к инсектицидам. Так, для *Anopheles stephensi*, широко распространенного в ближневосточном регионе (Иран, Ирак, Бахрейн, Саудовскую Аравию, Оман, Пакистан, Афганистан), сообщается о резистентности к ряду препаратов, включая ДДТ, дильдрин, малатион и более поздние пиретроиды [18].

Ближневосточный респираторный синдром. Случаи заболевания зарегистрированы впервые в Саудовской Аравии в июне 2012 г. После идентификации нового коронавируса ретроспективно установлено, что заражения имели место в марте–апреле 2012 г. в Иордании (13 случаев). Высокий риск заражения в Саудовской Аравии, ОАЭ, Иордании. Спорадическая заболеваемость – в Катар, Кувейте, Омане. Бессимптомные случаи заболевания выявлены при отслеживании контактных лиц в Саудовской Аравии (168 случаев), Иордании, Омане. Циркуляция возбудителя среди верблюдов по результатам серологических исследований установлена, помимо Саудовской Аравии, ОАЭ и Иордании, в Судане (98 % положительных находок среди верблюдов, импортируемых в Египет), Катар (1,8–97 %), Кувейте, а также в Египте – среди местных и импортированных преимущественно из Судана и Сомали верблюдов и в Иране среди верблюдов, незаконно ввезенных из Пакистана. Положительные серологические находки отмечались при ретроспективном исследовании сыvorоток крови верблюдов в Судане и Сомали (86,7 и 80–85,2 %, образцы отобраны в 1983–1984 гг.) и в

Тунисе (провинции Sidi Bouzid, Kebili, Sousse, 30 – 54 %, образцы отобраны в 2009 г.).

Случаи завоза болезни регистрировались из Саудовской Аравии (паломничество) в Египет, Бахрейн, Ливан, из Омана в ОАЭ – без вторичной передачи, с последующей местной передачей – в Иорданию, ОАЭ, Тунис (посещение Саудовской Аравии и Катара). Местная передача от завозных случаев отмечалась в Иране, Катаре, Йемене. Вследствие того, что завозные случаи часто проявляют себя как гриппоподобные заболевания, они остаются недиагностированными и выявляются только ретроспективно при выяснении эпидемиологического анамнеза у заразившихся от них лиц. Завозы из Восточно-Средиземноморского региона (в основном из Саудовской Аравии, а также из Иордании и ОАЭ) зарегистрированы в Германию, Францию, Великобританию, Италию, Грецию, Нидерланды, Австрию, Алжир, Турцию, Филиппины, Малайзию, США, Таиланд, Республику Корею (крупная вспышка с 186 случаями в 2015 г. и завозом в Китай).

Территорией с наибольшим риском заражения людей является Саудовская Аравия, на которую приходится более 80 % зарегистрированных случаев: лабораторно подтверждено 1743 случаев, включая 705 летальных (40,4 %). Пик заболеваемости пришелся на 2014 г., когда количество заболевших составило 679 чел. Ряд вспышек был связан с внутрибольничной передачей возбудителя: в Аль-Хасе, Джидда, Эр-Рияд, Табуке, Медине. Внутрибольничная передача отмечалась также в Иордании (госпитали акиматов Эз-Зарка и Амман), ОАЭ (Аль-Айн-Сити, эмират Абу-Даби), Иране (больницы провинции Керман и г. Кахну).

Менингококковая болезнь. В прошлом напряженная эпидемиологическая обстановка в регионе была связана с совершением паломничества в Мекку, Саудовская Аравия. Крупные вспышки заболеваний отмечены в 2000–2001 гг. с выносом инфекции в страны Европы, Америки и Азии. После 2002 г. ситуация по менингококковой болезни стабилизировалась в связи с обязательной иммунизацией паломников четырехвалентной вакциной. В настоящее время в основном регистрируется спорадическая заболеваемость, за исключением Судана, территория которого располагается в зоне «менингитного пояса». В стране осуществляется усиленный эпидемиологический надзор за менингококковой инфекцией. Заболеваемость регистрируется практически ежегодно с количеством заболевших от нескольких сотен до нескольких тысяч человек. В 2015 г. сообщалось о 353 случаях заболевания, в 2016 г. – 153.

Грипп птиц A(H5N1). Общее количество заболевших в регионе 377 чел., в том числе с летальным исходом – 123 (32,6 %). Случаи заболевания людей зарегистрированы в Египте (страна с наибольшим числом случаев в мире – 363 случая, 121 летальный), Джибути (8 случаев – в 2006 г.), Ираке (3 – в 2006 г.), Пакистане (3 – в 2007 г.). Эпизоотии среди птиц отмечены в Афганистане, Иордании, Джибути,

Ираке, Иране, Кувейте, Ливане, Ливии, Пакистане, Саудовской Аравии. В ряде стран новые эпизоотии регистрировались после восстановления страной статуса свободной от болезни.

Арбовирусные инфекции. Регион Восточного Средиземноморья включает территории, эндемичные по нескольким арбовирусным (вызываемым вирусами, передаваемыми членистоногими – комары, клещи, москиты, блохи) инфекциям, таким как лихорадка денге, желтая лихорадка, лихорадка Западного Нила, Крымская геморрагическая лихорадка, лихорадка Рифт-Валли. Присутствие комаров – основных переносчиков в странах представлено в табл. 3.

Лихорадка денге является эндемичной болезнью для 9 стран региона, циркулируют все четыре суб-типа вируса. Климатические условия способствуют распространению основных переносчиков, что вызывает вспышечная заболеваемость и эпидемии болезни в большей части региона в XIX и начале XX в. Высокий показатель заболеваемости в Саудовской Аравии, Йемене, Судане, Пакистане, где лихорадка денге после периода эпидемического благополучия получила распространение в 90-х годах XX в., наблюдается тенденция к росту количества больных. В последние годы отмечались крупные вспышки и эпидемии: в 2015 г. – в Саудовской Аравии (4312 случаев), Йемене (официально зарегистрировано свыше 3000 случаев заболевания, 27 летальных, еще около 6000 случаев считались подозрительными), с августа 2015 по февраль 2016 г. – в Судане (612 случаев, 106 летальных), с июня 2017 г. – в Пакистане (провинция Хайбер-Пахтунхва, более 87000 подозрительных случаев, из которых более 18000 получили лабораторное подтверждение, количество смертельных исходов – 58). Спорадическая заболеваемость и небольшие вспышки отмечались в Джибути и Сомали. Наличие природных очагов болезни предполагается в Афганистане, Иране, где получены положительные серологические находки среди местных жителей. В Ливане в прошлом регистрировались эпидемии болезни. По результатам серологических исследований распространенность антител к вирусу денге в регионе в среднем составила 20 %, достигая 62 % в основном в Саудовской Аравии, Судане и Пакистане [15]. На территории Египта лихорадка денге не регистрировалась с 1950-х годов, основным переносчик болезни *Ae. aegypti* полностью искоренен. Сообщения о восстановлении ареала переносчика в южной части страны появились в 2015 г. – здесь отмечалась вспышка лихорадки денге (253 подозрительных, 28 лабораторно подтвержденных случаев). Однако еще в 2010 г. были диагностированы случаи заражения туристов после посещения Египта.

Природные очаги **желтой лихорадки** находятся на территории Судана и Сомали. В Судане регистрируется вспышечная заболеваемость. Высокоэндемична по желтой лихорадке южная часть страны. Наиболее крупная вспышка описана в 2012 г., затронувшая 35 населенных пунктов штатов Центральный, Южный, Западный и Северный Дарфур с общим количеством

Встречаемость отдельных видов комаров в странах Восточно-Средиземноморского региона ВОЗ [13, 14, 15]

Страна	<i>Aedes</i>				<i>Culex</i>			<i>Anopheles</i>								
	<i>aegypti</i>	<i>albopictus</i>	<i>caspius</i>	<i>vexans</i>	<i>modestus</i>	<i>perexiguus</i>	<i>pipiens</i>	<i>superpictus</i>	<i>stephensi</i>	<i>flaviatilis</i>	<i>culicifacies</i>	<i>gambiae</i>	<i>arabiensis</i>	<i>pharoensis</i>	<i>sergenti</i>	<i>multicolor</i>
Афганистан	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
Бахрейн	-	-	+													
Джибути	+	-	+				+					+	+			
Египет	+	-	+	-	-	+	+	+						+	+	+
Иран	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+				+	+
Ирак	+	-	+	+	+	+	+	+	+							
Иордания	+	-	+	-	-	+	+	+						+	+	
Катар	-	-	+				+		+							+
Кувейт	-	-					+									
Ливан	+	+	+	-	-	+	+								+	
Ливия	+	-	+	+	-	+	+	+							+	+
Марокко	+	+	+	+	+	+	+								+	+
Оман	+	-				+			+		+				+	
Пакистан	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+				+	
Саудовская Аравия	+	+	+	+		+	+	+	+	+			+	+	+	+
Сомали	+	-										+	+	+		
Судан	+	-				+	+					+	+	+		
Сирия	+	+				+		+							+	
Тунис	+	-	+	-	-	+	+								+	+
ОАЭ	+	-							+		+				+	
Йемен	+	+	+	+			+				+		+	+	+	

заболевших 847 чел., в том числе 171 со смертельным исходом [21]. Последние данные о заболеваемости относятся к 2013 г. (48 предполагаемых случаев, 14 из которых закончились летальным исходом). С 2014 г. Министерством здравоохранения Судана совместно с ВОЗ осуществляется программа массовой профилактической вакцинации против желтой лихорадки, охватившая 14,1 млн человек (по данным на 2016 г.). При посещении Судана каждому путешественнику рекомендована вакцинация против желтой лихорадки. В Сомали эндемичность территории установлена на основании результатов серологических исследований (положительные находки у 3,7–8,5 % жителей южных и юго-центральных районов), случаи заболевания официально не зарегистрированы [16].

Лихорадка Западного Нила. По территории региона проходит один из основных путей миграции перелетных птиц из Африки на север, что послужило причиной распространения ЛЗН в регионе и дальнейшего формирования устойчивых очагов этой инфекции. В настоящее время циркуляция вируса Западного Нила отмечается на территории 13 стран. Спорадическая и вспышечная заболеваемость отмечается в Бахрейне, Иране, Марокко, Сирии, Судане, Тунисе. Ежегодно сообщения о случаях заболевания ЛЗН поступают из Туниса (пик заболеваемости пришелся на 2012 г.: в 13 из 24 акиматов Туниса подтверждено 86 случаев, 12 летальных). Наличие

природных очагов заболевания по результатам серологических исследований установлено в Джибути, Египте, Иордании, Ираке, Ливане, Пакистане. Эпизоотии среди лошадей описаны в ОАЭ, Марокко, Тунисе.

Лихорадка Рифт-Валли эндемична для Египта, Йемена, Саудовской Аравии, Сомали и Судана, на территории которых зарегистрированы эпизоотии среди домашних животных и связанные с ними вспышки заболеваний среди людей. В Тунисе предполагается существование природных очагов болезни на основании положительных серологических находок (контакт с возбудителем установлен у 7,8–8,3 % обследуемых лихорадящих больных и местных жителей из категорий риска) [11].

Эпидемические и эпизоотические проявления болезни в Восточном Средиземноморье впервые официально зарегистрированы в 1973 г. в Судане (данные о количестве заболевших отсутствуют). Самая крупная из известных эпидемических вспышек лихорадки Рифт-Валли отмечена в Египте в 1977–1978 гг., когда общее число случаев заболевания, по оценкам, достигло 200 тыс., в том числе 598 с летальным исходом. Указанная вспышка стала первой возникшей в африканской стране, расположенной к югу от Сахары. В 2000–2001 гг. инфекционная болезнь вышла за пределы Африканского континента и диагностирована в Йемене и Саудовской Аравии

(количество заболевших 1540 чел.). Сложная эпидемиологическая обстановка наблюдалась в 2006–2007 гг. в Сомали (114 случаев), а также приграничных территориях Кении и Танзании, в 2007–2008 г. – в Судане (747 случаев). Последние официально зарегистрированные случаи инфицирования вирусом лихорадки Рифт-Валли в регионе диагностированы в Судане в 2010 г. (18 чел.) [10]. Отмечаемое расширение ареала инфекционной болезни связывают с заносом возбудителя инфицированными переносчиками и импортируемыми зараженными животными (верблюды, овцы).

Крымская геморрагическая лихорадка. Спорадические случаи и вспышки КГЛ зарегистрированы в Афганистане, Ираке, Иране, Омане, Пакистане, Судане, ОАЭ, Саудовской Аравии, Египте. Наиболее неблагоприятная эпидемиологическая обстановка наблюдается в Афганистане, Пакистане, где заболеваемость высокая и имеет тенденцию к росту. В Афганистане высокоэндемичны западная и южная части страны, сообщения о заболевших в разные годы поступали из 19 провинций. В 2015 г. зарегистрирован 131 подозрительный случай, из них 30 лабораторно подтвержденных, 20 смертей, в 2016 г., по предварительным данным, выявлено 430 случаев, включая 103 лабораторно подтвержденных, 60 летальных (летальность 14 %). В Пакистане заболеваемость регистрируется преимущественно в Западном и Северо-Западном районах. В 2016 г. отмечалась вспышечная заболеваемость с распространением в традиционно неэндемические районы страны (431 случай). Существование природных очагов болезни по результатам серологических исследований предполагается в Тунисе (2,7–5,2 % положительных проб среди лихорадящих больных и работников скотобоев), Сомали (6,3–50 % находок среди животных, импортировавшихся из страны в 1990-е гг. в Саудовскую Аравию и ОАЭ).

Зоонозные инфекции. Бруцеллез. Ближний Восток традиционно считается эндемичным по бруцеллезу. Сирия, Иордания, Ирак, Иран относятся к странам с наибольшими показателями заболеваемости бруцеллезом в мире. Высокий показатель заболеваемости и вспышки регистрируются в большинстве стран региона (табл. 1), спорадические случаи – в Бахрейне и Марокко. Имеются сообщения о диагностировании заболевания в других странах (Франция, Тайвань) у лиц, возвратившихся из Марокко. Бруцеллез крупного и мелкого рогатого скота широко распространен практически во всех странах региона, встречается бруцеллез среди свиней, буйволов, верблюдов. Значительный риск заражения, помимо профессионального и бытового, связан с употреблением непастеризованного молока, в том числе верблюжьего, и сырого сыра, в том числе козьего, овечьего. В ряде стран (Египет, Ирак, Иран, Кувейт, Оман) осуществляется национальная программа борьбы с бруцеллезом, включающая вакцинацию скота, а в некоторых странах и серологическое обследование жвачных

животных, убой больных животных с выплатой компенсации владельцам. Подозрительные животные допускаются к продаже в Иордании. Распространены случаи импортирования или нелегального ввоза инфицированных животных.

Сибирская язва является эндемичной болезнью в большинстве стран. Спорадическая и вспышечная заболеваемость людей регистрируется в Афганистане, Иордании, Ираке, Иране, Марокко и Судане. Наибольшее количество случаев приходится на Афганистан и Иран, откуда сообщения о случаях заболевания поступают практически ежегодно. Последние официальные данные о случаях заболевания в Афганистане относятся к 2015 г. (10 больных кожной формой сибирской язвы без летальных исходов в провинции Khost, район Yaqobi), в Иране – 2016 г. (155 случаев), в Пакистане – 2016 г. (6). Заболеваемость среди крупного и мелкого рогатого скота, верблюдов отмечена на территории Сирии, Сомали.

Сап. Природные очаги сапа описаны в Афганистане, Ираке, Иране, Пакистане, откуда периодически поступают сообщения о вспышках среди лошадей [7]. Отмечались случаи заболевания львов и тигров (Иран), мулов, ослов (Пакистан). В прошлом сап регистрировался в Судане (последние данные в 1989 г.). Импорт инфицированных лошадей имел место в 2011 г. в Ливан из Сирии, в 2010 г. в Бахрейн предположительно из Сирии и Кувейта – завоз вызвал вспышку сапа среди лошадей и случаи заболевания среди ослов и верблюдов, в 2004 г. в ОАЭ (о стране экспорта данных нет, предположительно из Сирии) с заражением местных пород лошадей. Эндемичность Пакистана (провинция Пенджаб) показала вспышка среди лошадей (23 особи) в Лахоре (Lahore Polo Club) в 2005 г. В ходе вспышки была успешно применена экспериментальная терапия (продолжительность лечения составила 12 недель), которая показала свою оправданность в случаях с элитными лошадьми при соблюдении мер биобезопасности [19].

Мелиоидоз. Установлена эндемичность Пакистана, после посещения которого зарегистрированы заболевания людей и животных в других странах. Предполагается существование природных очагов в Иране. Импорт из Ирана инфицированных лошадей считается вероятной причиной вспышки мелиоидоза в Парижском зоопарке в 1970-е годы [7].

Представленный в статье материал позволяет дать ориентировочную оценку эпидемиологической ситуации в странах Ближнего Востока и Северной Африки, которая может быть интересна в качестве базисной основы при осуществлении санитарно-карантинного контроля и проведении эпидемиологической диагностики в случае выявления больных инфекционными болезнями, прибывшими из указанных стран.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Варшавский С.Н., Козакевич В.П. Биоценотическая структура и ландшафтные особенности зарубежных очагов чумы в Передней и Юго-Западной Азии. *Бюл. МОИП. Отд. биол.* 1984; 89(1):13–20.
2. Варшавский С.Н., Козакевич В.П., Лавровский А.А. Природная очаговость чумы в Северной и Западной Африке. *Пробл. особо опасных инф.* 1971; 3(19):149–59.
3. Лавровский А.А., Козакевич В.П., Варшавский С.Н. Природные очаги чумы в Передней и Юго-Западной Азии. *Пробл. особо опасных инф.* 1973; 2(30):9–22.
4. Москвитина Э.А., Адаменко О.Л., Кругликов В.Д., Титова С.В., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Иванова С.М., Анисимова Г.Б. Холера: эпидемиологическая обстановка в мире в 2005–2014 гг., прогноз на 2015 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2015; 1:18–25.
5. Неронов В.М., Арсеньева Л.П. Зоогеографический анализ фауны грызунов Афганистана. В кн.: *Современные проблемы зоогеографии*. М.: Наука; 1980. С. 254–72.
6. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Санитарная охрана территории Российской Федерации в современных условиях. Саратов: Буква; 2014. 460 с.
7. Топорков А.В., редактор. Мелиоидоз и сап. Волгоград: Волга-Пресс; 2016. 400 с.
8. Удовиченко С.К., Топорков А.В., Карнаухов И.Г., Куклев Е.В., Кедрова О.В., Сафронов В.А., Раздорский А.С., Попов Н.В., Князева Т.В., Топорков В.П., Кутырев В.В. Оценка потенциальной эпидемической опасности международных массовых мероприятий по актуальным инфекционным болезням. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 3:29–39.
9. Шиянова А.Е., Дмитриева Л.Н., Карнаухов И.Г. Источники информации о заболеваемости в мире инфекционными болезнями, значимыми для санитарной охраны территории Российской Федерации. Обзор интернет ресурсов. *Эпидемиол. и инф. бол. Актуальные вопросы*. 2016; 6:62–6.
10. Aradaib I.E., Erickson B.R., Elageb R.M., Khristova M.L., Carroll S.A., Elkhidir I.M., Karsany M.E., Karrar A.E., Elbashir M.I., Nichol S.T. Rift Valley fever, Sudan, 2007 and 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 2013 Feb; 19(2):246–53. DOI: 10.3201/eid1902.120834.
11. Bosworth A., Ghabbari T., Dowall S., Varghese A., Fares W., Hewson R., Zhioua E., Chakroun M., Tiouiri H., Ben Jemaa M., Znazen A., Letaief A. Serologic evidence of exposure to Rift Valley fever virus detected in Tunisia. *New Microbes New Infect.* 2015; 9:1–7. DOI: 10.1016/j.nmni.2015.10.010.
12. Cholera, diarrhea & dysentery update (130): Asia (Yemen) [Internet]. 17 Nov 2017. Archive Number: 20171117.5449946. Available from: <http://www.promedmail.org>.
13. Failloux A.B., Bouattour A., Faraj C., Gunay F., Haddad N., Harrat Z., Jancheska E., Kanani K., Kenawy M.A., Kota M., Pajovic I., Paronyan L., Petric D., Sari H., Sawalha S., Shaibi T., Sherifi K., Sulesco T., Velo E., Gaayeb L., Victor K., Robert V. Surveillance of arthropod-borne viruses and their vectors in the Mediterranean and Black Sea regions within the MediLabSecure Network. *Curr. Trop. Med. Rep.* 2017; 4:27–39. DOI: 10.1007/s40475-017-0101-y.
14. Gaffigan T.V., Wilkerson R.C., Pecor J.E., Stoffer J.A. Anderson T. Systematic Catalog of Culicidae [Internet]. Available from: <http://www.mosquitocatalog.org/default.aspx>.
15. Humphrey J.M., Cleton N.B., Reusken C.B., Glesby M.J., Koopmans M.P., Abu-Raddad L.J. Dengue in the Middle East and North Africa: a systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(12):e0005194. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005194.
16. Jentes E.S., Pomeroy G., Gershman M.D., Hill D.R., Lemarchand J., Lewis R.F., Staples J.E., Tomori O., Wilder-Smith A., Monath T.P. The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: consensus of the Informal WHO Working group on geographic risk for yellow fever. *Lancet Infect. Dis.* 2011; 11(8):622–32. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70147-5.
17. Poliomyelitis update (37): Poliomyelitis update (37): Afghanistan, Syria, global [Internet]. 28 Nov 2017. Archive Number: 20171128.5471014 Available from: <http://www.promedmail.org>.
18. Safi N.H., Ahmadi A.A., Nahzat S., Ziapor S.P., Nikookar S.H., Fazeli-Dinan M., Enayati A., Hemingway J. Evidence of metabolic mechanisms playing a role in multiple insecticides resistance in *Anopheles stephensi* populations from Afghanistan. *Malar. J.* 2017; 16(1):100. DOI: 10.1186/s12936-017-1744-9.
19. Saqib M., Muhammad G., Naureen A., Hussain M.H., Asi M.N., Mansoor M.K., Toufeer M., Khan I., Neubauer H., Sprague L.D. Effectiveness of an antimicrobial treatment scheme in a confined glanders outbreak. *BMC Veter. Res.* 2012; 8:214. DOI: 10.1186/1746-6148-8-214.
20. Shahraki A.H., Carniel E., Mostafavi E. Plague in Iran: its history and current status. *Epidemiol. Health.* 2016; 38:e2016033.
21. Yellow fever in Africa and South America, 2011–2012. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2013; 88:285–300.

References

1. Varshavsky S.N., Kozakevich V.P. [Biocenotic structure and landscape peculiarities of cross border plague foci in Western and South-Western Asia]. *Bulletin of the Moscow Society of Nature Researchers. Biology Department*. 1984; 89(1):13–20.
2. Varshavsky S.N., Kozakevich V.P., Lavrovsky A.A. [Natural plague foci in North and West Africa]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1971; 3(19):149–59.
3. Lavrovsky A.A., Kozakevich V.P., Varshavsky S.N. [Natural plague foci in West and South-West Asia]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 1973; 2(30):9–22.
4. Moskvitina E.A., Adamenko O.L., Kruglikov V.D., Titova S.V., Monakhova E.V., Pisanov R.V., Ivanova S.M., Anisimova G.B. [Cholera: epidemiological situation around the world in 2005–2014, and prognosis for 2015]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2015; (1):18–25.
5. Neronov V.M., Arsen'eva L.P. [Zoo-geographical analysis of rodent fauna of Afghanistan]. In: [Current Issues of Zoogeography]. M.: "Nauka"; 1980. P. 254–72.
6. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Sanitary protection of the Territory of the Russian Federation under Current Conditions]. Saratov: "Bukva"; 2014. 460 p.
7. Toporkov A.V., editor. [Meliodosis and Glanders]. Volgograd: "Volga-Press"; 2016. 400 p.
8. Udovichenko S.K., Toporkov A.V., Karnaukhov I.G., Kuklev E.V., Kedrova O.V., Safronov V.A., Razdorsky A.S., Popov N.V., Knyazeva T.V., Toporkov V.P., Kutyrev V.V. Assessment of the Potential Epidemic Hazard as Regards International Public Events in Terms of the Currently Important Infectious Diseases. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; (3):29–39.
9. Shiyanova A.E., Dmitrieva L.N., Karnaukhov I.G. [Sources of information on the morbidity rates around the world as regards infectious diseases significant for sanitary protection of the territory of the Russian Federation. Review of the internet sources]. *Epidemiol. Infek. Bol. Aktual. Vopr.* 2016; 6:62–6.
10. Aradaib I.E., Erickson B.R., Elageb R.M., Khristova M.L., Carroll S.A., Elkhidir I.M., Karsany M.E., Karrar A.E., Elbashir M.I., Nichol S.T. Rift Valley fever, Sudan, 2007 and 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 2013 Feb; 19(2):246–53. DOI: 10.3201/eid1902.120834.
11. Bosworth A., Ghabbari T., Dowall S., Varghese A., Fares W., Hewson R., Zhioua E., Chakroun M., Tiouiri H., Ben Jemaa M., Znazen A., Letaief A. Serologic evidence of exposure to Rift Valley fever virus detected in Tunisia. *New Microbes New Infect.* 2015; 9:1–7. DOI: 10.1016/j.nmni.2015.10.010.
12. Cholera, diarrhea & dysentery update (130): Asia (Yemen) [Internet]. 17 Nov 2017. Archive Number: 20171117.5449946. Available from: <http://www.promedmail.org>.
13. Failloux A.B., Bouattour A., Faraj C., Gunay F., Haddad N., Harrat Z., Jancheska E., Kanani K., Kenawy M.A., Kota M., Pajovic I., Paronyan L., Petric D., Sari H., Sawalha S., Shaibi T., Sherifi K., Sulesco T., Velo E., Gaayeb L., Victor K., Robert V. Surveillance of arthropod-borne viruses and their vectors in the Mediterranean and Black Sea regions within the MediLabSecure Network. *Curr. Trop. Med. Rep.* 2017; 4:27–39. DOI: 10.1007/s40475-017-0101-y.
14. Gaffigan T.V., Wilkerson R.C., Pecor J.E., Stoffer J.A. Anderson T. Systematic Catalog of Culicidae [Internet]. Available from: <http://www.mosquitocatalog.org/default.aspx>.
15. Humphrey J.M., Cleton N.B., Reusken C.B., Glesby M.J., Koopmans M.P., Abu-Raddad L.J. Dengue in the Middle East and North Africa: a systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(12):e0005194. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005194.
16. Jentes E.S., Pomeroy G., Gershman M.D., Hill D.R., Lemarchand J., Lewis R.F., Staples J.E., Tomori O., Wilder-Smith A., Monath T.P. The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: consensus of the Informal WHO Working group on geographic risk for yellow fever. *Lancet Infect. Dis.* 2011; 11(8):622–32. DOI: 10.1016/S1473-3099(11)70147-5.
17. Poliomyelitis update (37): Poliomyelitis update (37): Afghanistan, Syria, global [Internet]. 28 Nov 2017. Archive Number: 20171128.5471014 Available from: <http://www.promedmail.org>.
18. Safi N.H., Ahmadi A.A., Nahzat S., Ziapor S.P., Nikookar S.H., Fazeli-Dinan M., Enayati A., Hemingway J. Evidence of metabolic mechanisms playing a role in multiple insecticides resistance in *Anopheles stephensi* populations from Afghanistan. *Malar. J.* 2017; 16(1):100. DOI: 10.1186/s12936-017-1744-9.
19. Saqib M., Muhammad G., Naureen A., Hussain M.H., Asi M.N., Mansoor M.K., Toufeer M., Khan I., Neubauer H., Sprague L.D. Effectiveness of an antimicrobial treatment scheme in a confined glanders outbreak. *BMC Veter. Res.* 2012; 8:214. DOI: 10.1186/1746-6148-8-214.
20. Shahraki A.H., Carniel E., Mostafavi E. Plague in Iran: its history and current status. *Epidemiol. Health.* 2016; 38:e2016033.
21. Yellow fever in Africa and South America, 2011–2012. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2013; 88:285–300.

Authors:

Shiyanova A.E., Udovichenko S.K., Dmitrieva L.N., Ivanova A.V., Toporkov V.P., Kulev E.V., Boiko A.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Шиянова А.Е., Удовиченко С.К., Дмитриева Л.Н., Иванова А.В., Топорков В.П., Куклев Е.В., Боико А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 09.11.17.

А.К.Джапарова¹, С.Т.Абдикаримов¹, Г.А.Ерошенко², Н.Ю.Носов², Л.М.Куклева², Д.А.Адамбеков³,
И.Ш.Альдхамбаева³

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКИ *YERSINIA PESTIS* В ПОЛЕВОМ МАТЕРИАЛЕ ИЗ САРЫДЖАЗСКОГО ОЧАГА В КЫРГЫЗСТАНЕ

¹Республиканский центр карантинных и особо опасных инфекций Министерства здравоохранения Кыргызской Республики, Бишкек, Кыргызская Республика; ²ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; ³Кыргызская государственная медицинская академия им. И.Ахунбаева, Бишкек, Кыргызская Республика

Цель исследования. Оценка эффективности методов молекулярной диагностики и идентификации штаммов *Yersinia pestis* в полевом материале, полученном в условиях Сарыджазского высокогорного очага в Кыргызской Республике. **Материалы и методы.** Исследованы образцы полевого материала, выделенные в 2016 г. в Сарыджазском высокогорном очаге чумы, с помощью классических методов лабораторной диагностики и методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным и электрофоретическим учетом результатов. **Результаты и выводы.** Показано, что в ряде случаев молекулярно-генетический метод обладает большим разрешением по сравнению с традиционными методами лабораторной диагностики чумы. Это доказывает необходимость более широкого использования молекулярно-диагностических методов в эпизоотологическом мониторинге чумы в природных очагах в Кыргызской Республике.

Ключевые слова: возбудитель чумы, диагностика, ПЦР, штаммы.

Корреспондирующий автор: Джапарова Айгуль Кулубековна, e-mail: ai_moon74@mail.ru.

A.K.Dzhaparova¹, S.T.Abdikarimov¹, G.A.Eroshenko², N.Yu.Nosov², L.M.Kukleva², D.A.Adambekov³,
I.Sh.Al'dzhambaeva³

Evaluation of Effectiveness of *Yersinia pestis* Molecular Diagnostics in the Field Material from Sarydzhaz Focus in Kyrgyzstan

¹Republican Center on Quarantine and Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, Bishkek, Kyrgyz Republic; ²Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; ³I.Akhunbaev Kyrgyz State Medical Academy, Bishkek, Kyrgyz Republic

Objective of the study is to assess the effectiveness of the methods for molecular diagnostics and identification of *Yersinia pestis* strains in the field material obtained from Sarydzhaz high-mountain focus in Kyrgyz Republic. **Materials and methods.** Investigated were the samples of the field material, isolated in 2016 in Sarydzhaz high-mountain plague focus, using conventional methods of laboratory diagnostics and PCR with hybridization-fluorescent and electrophoretic registration of results. **Results and conclusions.** It is demonstrated that in a number of cases molecular-genetic method has a higher resolution as compared to conventional methods of laboratory diagnostics of plague. It proves the necessity of wider usage of molecular-diagnostic methods in epizootiological monitoring of plague in natural foci in Kyrgyz Republic.

Key words: plague agent, diagnostics, PCR, strains.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Aigul K. Dzhaparova, e-mail: ai_moon74@mail.ru.

Citation: Dzhaparova A.K., Abdikarimov S.T., Eroshenko G.A., Nosov N.Yu., Kukleva L.M., Adambekov D.A., Al'dzhambaeva I.Sh. Evaluation of Effectiveness of *Yersinia pestis* Molecular Diagnostics in the Field Material from Sarydzhaz Focus in Kyrgyzstan. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 4:23–26. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-23-26

В статье представлена оценка эффективности молекулярно-генетического исследования образцов полевого материала, полученных в 2016 г. в Сарыджазском автономном очаге чумы. Чума по-прежнему представляет собой угрозу для населения многих стран. По данным ВОЗ, на глобальном уровне около 13 тыс. человек были инфицированы чумой в 2004–2013 гг. В 2015 г. в США зарегистрировано 16 случаев чумы. На 31 октября 2017 г. общее число случаев чумы на Мадагаскаре составило 1838 и 64 смерти [11]. В 2014–2016 гг. три случая чумы зарегистрированы в Российской Федерации.

В Кыргызстане в 2013 г. произошел один случай чумы с летальным исходом. В последующие годы культуры возбудителя также выделены в природных очагах Кыргызской Республики от грызунов. В период 2012–2015 гг. зарегистрировано 10 культур *Y. pestis*. В 2016 г. эпизоотия чумы выявлена в ур. Караколтор на территории Сарыджазского автономного очага в Тянь-Шанском природном очаге чумы. Выделено три штамма *Y. pestis*, в том числе от трупа серого сурка, собранных с него клещей, а также группового посева сурков. В том же очаге в ур. Шакрыратма по соседству с ур. Караколтор найден

загнивший труп сурка, от которого традиционными методами культуру выделить не удалось. Однако при постановке молекулярно-генетического исследования методом ПЦР в режиме реального времени была обнаружена ДНК *Y. pestis*. Проводимый масштабный мониторинг природных очагов чумы в Кыргызской Республике требует совершенствования методов диагностики и контроля чумы с привлечением современных молекулярно-генетических методов.

Все культуры *Y. pestis* в 2013–2016 гг., включая выделенную от человека, получены в Сарыджазском высокогорном очаге чумы. Сарыджазский автономный очаг с давних пор является одним из активных и стойких очагов чумы в составе Тянь-Шаньского высокогорного очага [1, 5]. Северной частью он примыкает к сыртам систем рек Текеса и Кокжара, находящимся на территории Казахстана. На западе они граничат с Иштык-Тарагайскими сыртами Кыргызской Республики, на востоке примыкают к главному горному узлу – Хан-Тенгри, а на юге – к Синьцзяню в Китае. Впервые эпизоотии чумы на участках, расположенных в верхнем и среднем течении р. Сарыджаз, установлены в 1947 г., когда чумной микроб был изолирован от сурка, отловленного в ур. Шилун. В последующие годы эпизоотологического наблюдения были выявлены новые участки со значительным количеством эпизоотийных точек, высоким процентом зараженности сурков и их эктопаразитов (ур. Эчкилеш, Мингтур, Тюз, Шилун). Рельеф этого района отличается сильной пестротой растительного покрова. Наблюдалось факты выделения одной культуры возбудителя чумы в Сарыджазских сыртах в 1957 г. из пищевых остатков стула черного коршуна. Кроме того, по одной культуре чумного микроба выделено в 1954 г. от трупа лисицы, а в 1956 г. – через групповую биопробу от 17 узкочерепных полевок [2, 3, 6]. Для предупреждения возможности полного восстановления эпизоотийной активности Сарыджазского мезоочага в 1978–1979 гг. его территория была оздоровлена методом глубокой дезинсекции нор сурков дустом ДДТ. Дустация показала высокую эффективность, после которой индексы обилия (ИО) блох в шерсти сурков уменьшились в 8–19 раз и составили 0,04–0,13 против 0,8–1,1. В гнездах ИО составили в среднем 0,8 и оказались в 22 раза ниже доотрабочных значений в 1976–1977 гг. (14,0–24,0).

Река Койлу берет начало от слияния р. Караколтор, Ашутор и Каратор. Протяженность ее от верховья до слияния с р. Сарыджаз составляет около 46 км, при ширине между хребтами, ограничивающими ее бассейн, от 9 до 19 км. Непосредственно долина реки имеет ширину 1–2 км. Левая терраса реки узкая – от 200 до 400 м, правая – до 1–2 км, пологая. Северные склоны заняты еловым лесом. Лесные поляны покрыты субальпийским разнотравьем. Прибрежная зона нижней части занята высокогорной злаковой степью. Западные склоны многочисленных ущелий заболочены и покрыты влажными субальпийскими

лугами. Левый берег более сухой. Сухие злаковые степи чередуются с полынной растительностью и формациями с глинисто-щебнистой полупустыней. Западные склоны отходящих от р. Койлу ущелий в основном покрыты злаково-кобрезиевыми лугами. Бассейн р. Койлу обследовался в 1990, 1991, 1993, 1996 и 1997 гг. Эпизоотии чумы в популяции серых сурков не обнаружены. И только в 2016 г. 3 культуры чумного микроба выделены в районе ур. Караколтор, Сарыголот, Майсаз, Шакыратма. Эпидемиологическим отрядом РКЦиООИ летом 2016 г. обследован другой участок Сарыджазского автономного очага в районе ур. Кашкасуу. Полученный там полевой материал обследован в дальнейшем в условиях стационара.

Целью работы была оценка эффективности методов молекулярной диагностики и идентификации штаммов *Y. pestis* в полевом материале, полученном в различных участках Сарыджазского высокогорного очага в Кыргызской Республике.

Материалы и методы

Для проведения бактериологического исследования на чуму использованы: агар Хоттингера (рН 7,2), приготовленный в РКЦиООИ (серия № 2 от 31.05.2016 г.). В качестве стимулятора роста чумного микроба в питательный агар добавлялся 2,5 % раствор сульфата натрия в количестве 1 мл на 100 г агара. Для подавления посторонней микрофлоры использовался генцианвиолет в концентрации 1:800000. Лабораторные исследования проводили в соответствии с практическим руководством по лабораторной диагностике чумы [7, 8].

Параллельно с культурально-морфологическими исследованиями образцов выполняли молекулярно-генетический анализ методом ПЦР с регистрацией результатов в режиме реального времени (ПЦР-РВ), а также методом ПЦР с электрофоретическим учетом результатов (ПЦР-ЭФ) [9]. При постановке ПЦР использовали «Базовый набор для постановки ПЦР» производства SibEnzyme (Россия). Выделение ДНК проводили с помощью набора «ДНК-Сорб-В» (Амплисенс, Москва). Анализ выполняли в приборе Rotor-Gene Q (Германия). Для индикации возбудителя чумы в образцах применяли «Набор реагентов для выявления ДНК *Y. pestis* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (Ген *Yersinia pestis* – Индикация-РГФ)», Саратов, Россия. Молекулярную идентификацию методом ПЦР-ЭФ проводили в 1,5 % агарозном геле. Для определения подвижной и биоварной принадлежности применяли праймеры на ДНК-мишени «Med24» и «45», описанные ранее [4].

Результаты и обсуждение

В 2016 г. обследование в Сарыджазском высокогорном очаге проводилось на двух эпизоотий-

Результаты биологического исследования на чуму полевого материала, выделенного в Сарыджазском высокогорном очаге чумы в 2016 г.

Вид грызуна	Всего исследовано	От них поставлены биопробы						Выделено штаммов чумного микроба (<i>Y. pestis</i>)
		индивидуальные	из них павших	пассажей	групповые	из них павших	пассажей	
Сурок серый	181	14	8	10	32	3	—	2
Узкочерепная полевка	124	—	—	—	15	—	1	—
Лесная мышь	3	1	—	—	—	—	—	—
Хомячок серый	1	1	—	—	—	—	—	—
Всего:	309	16	8	10	47	3	1	2

ных участках: в районе ур. Караколтор, Сарыголот, Майсаз, Шақыратма, а также в ур. Кашкасуу. При обследовании в 2016 г. численность сурков составила 7,1 зверька на 1 кв. км площади. Более высокая численность в бассейне р. Койлу отмечалась в верховьях в ур. Каратор, Караколтор, Ашуутор – 19,2 зверька на эту же единицу площади. Сравнение с данными учетных работ предыдущих лет обследований свидетельствуют об увеличении численности сурков. В период работы отряда климат Койлу был более суровым, чем на остальной территории. Зима была продолжительной. Осадков выпало больше, чем в прошлом году на 30–40 %. Весна была затяжной с большим количеством осадков. В течение всего периода работы были также частые осадки в виде дождя и града. Большое количество осадков во время вегетации растительности дало возможность создания высокого травостоя и кормовой базы для животных.

Во время работы отряда РЦКиООИ в районе ур. Караколтор в 2016 г. всего отловлено 309 экз. грызунов, из них серых сурков – 181, узкочерепных полевок – 124, лесных мышей – 3, серых хомячков – 1, узкочерепных полевок – 2 (таблица). Собрано 498 эктопаразитов, из них 145 блох, 344 клещей и 9 вшей. Весь комплекс лабораторных исследований проводился классическим методом в полевых условиях. Собранный материал исследован бактериологическим, серологическим и биологическим методом. Три культуры чумного микроба, выделенные в ур. Караколтор, Сарыголот, были типичными по морфологическим и тинкториальным свойствам, хорошо лизировались чумным и псевдотуберкулезным бактериофагами. Они были глицерин-позитивны, не разлагали рамнозу, ДСЛ для белых мышей составил более 10^3 м.к.

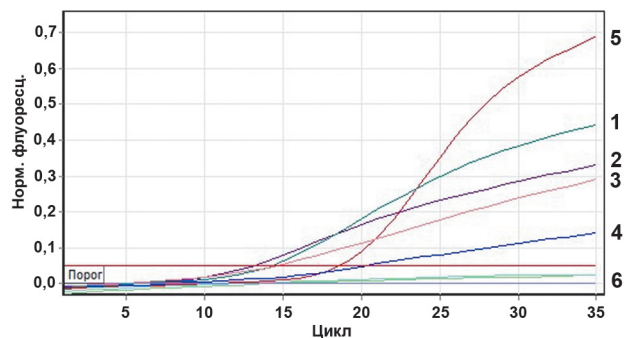
В результате проведенных исследований из 63 поставленных биопроб были выделены три культуры *Y. pestis*, которые, кроме классических методов, были также подтверждены методом ПЦР в режиме реального времени в стационарных условиях. В остальных образцах биопроб культурально-морфологическими методами и методом ПЦР-РВ возбудитель чумы не обнаружен.

На обследованной территории в секторе ур. Шақыратма обнаружен труп молодого серого сурка массой 0,4 кг, длина тела – 22 см. При визуальном осмотре увеличения лимфоузлов не отмечено. При вскрытии трупа внутренние органы были без

особых видимых патолого-анатомических изменений. Биологическим методом были заражены белые мыши подкожно и накожно по 0,5 мл. Проба доведена до трех пассажей, биопробы были вскрыты на 6-е сутки, поставлена проба с бактериофагами чумным Покровским, псевдотуберкулезным и Л-413, результат которых оказался отрицательным.

Из органов найденного трупа сурка, из которых не удалось выделить культуру возбудителя чумы, были получены взвеси тканей печени, селезенки, крови. При проведении индикации методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени с использованием набора «Ген *Yersinia pestis* – Индикация-РГФ» (Саратов, Россия) в них была выявлена ДНК *Y. pestis* (рисунок).

Для молекулярной идентификации образцов ДНК методом ПЦР-РВ и ПЦР-ЭФ по подвижной и биоварной принадлежности использованы праймеры на ДНК мишень «45» – участок ДНК, в котором у штаммов основного подвида содержится делеция в 45 п.н. У исследованных образцов сигнал по этой ДНК-мишени в ПЦР-РВ отсутствовал, что свидетельствовало об их принадлежности к основному подвиду [4]. Методом ПЦР-ЭФ с использованием праймеров на другую ДНК-мишень – «Med24», на участке которой у штаммов *Y. pestis* основного подвида средневекового биовара содержится делеция в 24 п.н., установлена принадлежность исследуемых образцов ДНК из сурков к штаммам античного биовара основного подвида, поскольку маркерная делеция штаммов средневекового биовара у них отсутствовала. Ранее нами при исследовании штам-



Выявление ДНК *Y. pestis* в образцах органов из трупов сурков, найденных в ур. Караколтор (1) и Шақыратма (2) в 2016 г., а также в ур. Кашкасуу (3, 4) в 2016 г.; 5 – положительный контроль; 6 – отрицательный контроль

мов *Y. pestis* из Сарыджазского высокогорного очага установлена их принадлежность к античному биовару основного подвида, древней филогенетической ветви 0.ANT [10].

Во время работы отряда РЦКиООИ в другом эпизоотийном участке – ур. Кашкасуу летом 2016 г. отловлено 50 экз. сурков, из них у 2 подозрительных на чуму сурков отобраны образцы тканей (печень, селезенка, кровь), которые были заморожены и далее исследованы в условиях стационара. С помощью набора для выделения ДНК «ДНК-Сорб-В» из них получена ДНК, которую анализировали методами ПЦР-РВ и ПЦР-ЭФ. С помощью ПЦР-РВ с применением тест-системы «Ген *Yersinia pestis* – Индикация-РГФ» в этих образцах выявлено наличие ДНК чумного микроба. В ПЦР с праймерами на мишени «Med24» и «45» проведена молекулярная идентификация образцов и установлена их принадлежность к штаммам основного подвида античного биовара *Y. pestis*.

Таким образом, нами показана эффективность использования методов молекулярной индикации и идентификации ПЦР-РВ и ПЦР-ЭФ для анализа на чуму полевого материала, выделенного в Сарыджазском высокогорном очаге чумы. В некоторых случаях (например, при анализе образцов тканей сурка из ур. Шакыратма) метод ПЦР оказался более чувствительным по сравнению с традиционными методами лабораторной диагностики чумы. Эти данные свидетельствуют о необходимости широкого применения методов молекулярной диагностики для повышения эффективности эпизоотологического мониторинга в природных очагах чумы Кыргызской Республики.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айкимбаев А.М., Литвак Я.И., Шварц А.В. Руководство по эпидемиологическому надзору в горных очагах чумы Тянь-Шаня и Алая. Алма-Ата; 1991. 123 с.
2. Дмитриевская М.Е., Крылов Д.Г., Тарасов П.П. Опыт выявления и некоторые особенности чумных эпизоотий в Сарыджазских сыртах. В кн.: Труды Средне-Азиатского научно-исследовательского противочумного института. Алма-Ата-Фрунзе; 1961. Т. 7. С. 61–71.
3. Дмитриевская М.Е., Тарасова Н.Е. Случай выделения культуры чумного микроба от лисицы в Центральном Тянь-Шане. В кн.: Труды Средне-Азиатского научно-исследовательского противочумного института. Алма-Ата; 1959. Т. 5. С. 271–2.
4. Ерошенко Г.А., Одинок Г.Н., Куклева Л.М., Павлова А.И., Краснов Я.М., Шавина Н.Ю., Гусева Н.П., Виноградова Н.А., Кутырев В.В. Стандартный алгоритм молекулярного типирования штаммов *Yersinia pestis*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2012; 3:25–35.
5. Кутырев В.В., Попова А.Ю., редакторы. Кадастр эпидемических и эпизоотических проявлений чумы на территории Российской Федерации и стран ближнего зарубежья (с 1876 по 2016 год). Саратов: ООО «Амрит»; 2016. 248 с.
6. Лаврентьев А.Ф., Попуха П.А. Случай обнаружения спонтанных зараженных чумой неспецифических носителей. В кн.: Труды Средне-Азиатского научно-исследовательского противочумного института. Алма-Ата; 1959. Т. 5. С. 273–7.
7. Лабораторная диагностика полевого материала на чуму. Методическое руководство. Бишкек; 2006.

8. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.

9. Организация работ лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. МУ 1.3.2569–09. М.; 2009.

10. Eroshenko G.A., Nosov N.Y., Krasnov Y.M., Oglodin Y.G., Kukleva L.M., Guseva N.P., Kuznetsov A.A., Abdikarimov S.T., Dzharparova A.K., Kutyrev V.V. *Yersinia pestis* strains of ancient phylogenetic branch 0.ANT are widely spread in the high-mountain plague foci of Kyrgyzstan. PLoS One. 2017; 12(10):e0187230. DOI: 10.1371/journal.pone.0187230.

11. Tsuzuki S., Lee H., Miura F., Chan Y.H., Sung-mok Jung S.M., Akhmetzhanov A.H., Nishiura H. Dynamics of the pneumonic plague epidemic in Madagascar, August to October 2017. Euro Surveill. 2017 Nov; 22(46). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.46.17-00710. PMID: 291622.

References

1. Aikimbaev A.M., Litvak Ya.I., Shvarts A.V. [Guidelines on Epidemiological Surveillance in the Mountain Plague Foci of Tien-Shan and Alai]. Alma-Ata; 1991. 123 p.
2. Dmitrievskaya M.E., Krylov D.G., Tarasov P.P. [Experience in detection and certain peculiarities of plague epizootics in Sarydzhaz syrtas]. In: [Works of Central-Asian Research Anti-Plague Institute]. Alma-Ata-Frunze; 1961. Vol. 7. P. 61–71.
3. Dmitrievskaya M.E., Tarasova N.E. [A case of plague microbe culture isolation from a fox in Central Tien-Shan]. In: [Works of Central-Asian Research Anti-Plague Institute]. Alma-Ata; 1959. Vol. 5. P. 271–2.
4. Eroshenko G.A., Odiokov G.N., Kukleva L.M., Pavlova A.I., Krasnov Ya.M., Shavina N.Yu., Guseva N.P., Vinogradova N.A., Kutyrev V.V. [Standard algorithm of molecular typing of *Yersinia pestis* strains]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2012; 3:25–35.
5. Kutyrev V.V., Popova A.Yu., editors. [Cadastre of Epidemic and Epizootic Manifestations of Plague in the Territory of the Russian Federation and Neighboring Countries (1876–2016)]. Saratov: "Amirit"; 2016. 248 p.
6. Lavrentiev A.F., Populyakh P.A. [A case of detection of spontaneous plague infected non-specific carriers]. In: [Works of Central-Asian Research Anti-Plague Institute]. Alma-Ata; 1959. Vol. 5. P. 273–7.
7. [Laboratory Diagnostics of Field Material for the Presence of Plague Microbe]. Methodological Recommendations. Bishkek; 2006.
8. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases]. Practice Guidelines. 2nd edition, revised and updated. M.: "Shiko"; 2013. 560 p.
9. [Management of laboratories using methods of nucleotide acids amplification when handling materials containing microorganisms of the I–IV groups of pathogenicity]. MR 1.3.2569–09. M.; 2009.
10. Eroshenko G.A., Nosov N.Y., Krasnov Y.M., Oglodin Y.G., Kukleva L.M., Guseva N.P., Kuznetsov A.A., Abdikarimov S.T., Dzharparova A.K., Kutyrev V.V. *Yersinia pestis* strains of ancient phylogenetic branch 0.ANT are widely spread in the high-mountain plague foci of Kyrgyzstan. PLoS One. 2017; 12(10):e0187230. DOI: 10.1371/journal.pone.0187230.
11. Tsuzuki S., Lee H., Miura F., Chan Y.H., Sung-mok Jung S.M., Akhmetzhanov A.H., Nishiura H. Dynamics of the pneumonic plague epidemic in Madagascar, August to October 2017. Euro Surveill. 2017 Nov; 22(46). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.46.17-00710. PMID: 291622.

Authors:

Dzharparova A.K., Abdikarimov S.T. Republican Center on Quarantine and Particularly Dangerous Infections of the Ministry of Health of the Kyrgyz Republic. 92, Skryabina St., Bishkek, Kyrgyz Republic. E-mail: ai_moon74@mail.ru.

Eroshenko G.A., Nosov N.Yu., Kukleva L.M. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@mail.ru.

Adambekov D.A., Al'dzhambaeva I.Sh. I. Akhunbaev Kyrgyz State Medical Academy. 92, Akhunbaeva St., Bishkek, Kyrgyz Republic. E-mail: kgma@land.ru.

Об авторах:

Джарпарова А.К., Абдикаримов С.Т. Республиканский центр карантинных и особо опасных инфекций Министерства здравоохранения Кыргызской Республики. Кыргызская Республика, Бишкек, ул. Скрыбина, 92. E-mail: ai_moon74@mail.ru.

Ерошенко Г.А., Носов Н.Ю., Куклева Л.М. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@mail.ru.

Адамбеков Д.А., Альджамбаева И.Ш. Кыргызская государственная медицинская академия им. И.Ахунбаева. Кыргызская Республика, Бишкек, ул. Ахунбаева, 92. E-mail: kgma@land.ru.

Поступила 22.11.17.

М.А.Ефимова¹, К.С.Хаертынов^{1,2}, А.Ф.Арсланова¹, Р.М.Ахмадеев¹, А.И.Никитин¹, В.Г.Гумеров¹,
Э.А.Шуралев^{1,2,3}

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ОЦЕНКА СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТИГЕНОВ ВИРУСА БЕШЕНСТВА

¹ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», Казань;

²Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Казань;

³ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Российская Федерация

Цель работы. Оценка серологической активности антигенов вируса бешенства, выделенных из мозговой ткани мышей и очищенных ультрацентрифугированием с предварительной дезинтеграцией на FastPrep. **Материалы и методы.** В работе использовали производственный штамм вируса бешенства «Овечий» ГНКИ. Вирус бешенства выделяли из мозговой ткани экспериментально зараженных мышей с последующим изучением электрофоретического профиля. Серологическую активность компонентов вируса оценивали иммуноблотом и ИФА с использованием специфических антирабических сывороток крови. **Результаты и выводы.** В ходе сравнения методов выделения и очистки антигена вируса бешенства наиболее оптимальным определено проведение гомогенизации на FastPrep-24 с последующим фракционированием в градиенте сахарозы. В результате фракционирования в ступенчатом градиенте плотности сахарозы с концентрацией 15–50 % при 25000 g в течение 120 мин получено пять фракций вируса бешенства. Максимально очищенной являлась белковая фракция, отобранная с зоны сахарозы 15–20 %, соответствующая молекулярной массе 67 кДа. Специфическая антигенная активность фракции в ИФА достигала титра 1:1280 (коэффициент специфичности 2,2). В результате иммуноблота антигенов, полученных с градиента сахарозы в диапазоне 40–45 и 20–35 % после ультрацентрифугирования, выявлена одна мажорная фракция полипептидов (54 кДа), проявившая наиболее высокую антигенную активность. Полученные результаты будут применимы при конструировании тест-систем для проведения скрининговых исследований на бешенство и мониторинга эффективности противоэпизоотических мероприятий.

Ключевые слова: вирус бешенства, антиген, FastPrep, электрофорез, иммуноблот.

Корреспондирующий автор: Ефимова Марина Анатольевна, e-mail: 2004r@mail.ru.

М.А.Efimova¹, K.S.Khaertynov^{1,2}, A.F.Arslanova¹, R.M.Akhmadeev¹, A.I.Nikitin¹, V.G.Gumerov¹,
E.A.Shuralev^{1,2,3}

Isolation, Purification and Evaluation of Serological Activity of Rabies Virus Antigens

¹Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russian Federation; ²Kazan State Medical Academy – Affiliated Branch of Federal State-Funded Educational Institution for Further Vocational Education “Russian Medical Academy of Continuing Education”, RF Ministry of Health, Kazan, Russian Federation; ³Kazan (Privolzhsky) Federal University, Kazan, Russian Federation

Objective of the study is to evaluate the serological activity of rabies virus antigens isolated from the brain tissue of mice by homogenization on FastPrep followed by ultracentrifugation. **Materials and methods.** Producer strain of the rabies virus “Ovechiy” GNKI. The rabies virus was isolated from the brain tissue of experimentally infected mice, followed by the study of the electrophoretic profile. The serological activity of the virus components was assessed by immunoblot and ELISA using specific anti-rabies sera. **Results and conclusions.** In the course of comparing the methods of isolation and purification of the rabies virus antigen, it was found that most optimal one is to use a homogenization on FastPrep-24, followed by fractionation in a sucrose gradient. As a result of fractionation in a graded sucrose density gradient with a concentration of 15–50 % at 25000 g for 120 min, five fractions of the rabies virus components were obtained. The maximum purified protein fraction was from 15–20 % sucrose zone, which corresponded to a molecular weight of 67 kDa. The specific antigen activity of the fraction in ELISA reached up the titers of 1:1280 (Specificity coefficient 2.2). Using immunoblot of antigens, obtained from the sucrose gradient in the range of 40–45 % and 20–35 % after ultracentrifugation, one major fraction of polypeptides (54 kDa) was detected, which showed the highest antigenic activity. The results obtained will be useful in the design of test systems for rabies screening and monitoring the effectiveness of anti-epizootic measures.

Key words: rabies virus, antigen, FastPrep, electrophoresis, immunoblot.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Marina A. Efimova, e-mail: 2004r@mail.ru.

Citation: Efimova M.A., Khaertynov K.S., Arslanova A.F., Akhmadeev R.M., Nikitin A.I., Gumerov V.G., Shuralev E.A. Isolation, Purification and Evaluation of Serological Activity of Rabies Virus Antigens. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 4:27–31. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-27-31

Несмотря на значительный прогресс в области вирусологии, иммунологии и молекулярной биологии, а также колоссальные усилия многих поколений

ученых и практиков по борьбе с бешенством, этот зооноз продолжает оставаться чрезвычайно сложной проблемой для многих стран мира, в том числе и для

Российской Федерации [2, 6]. Заболевание проявляется и у людей, приводя к летальным исходам [13].

Основу мировых программ борьбы с бешенством составляет специфическая профилактика и своевременная диагностика с использованием современных лабораторных методов исследования. В настоящее время практическое применение получили различные методы: биопроба на лабораторных животных, морфологическое исследование головного мозга, метод иммунофлуоресценции, реакция преципитации в агаровом геле [14]. Однако все они, в той или иной степени, обладают значительными недостатками: низкая чувствительность и недостаточная специфичность (световая микроскопия и реакция преципитации), длительность получения результатов экспертиз и трудоемкость (биопроба и реакция нейтрализации) [7]. Усовершенствование существующих и разработка новых молекулярно-генетических [10] и ускоренных серологических [1] методов как эффективных средств диагностики бешенства остаются актуальными вопросами до настоящего времени [8, 12]. Такого рода исследования требуют предварительной наработки определенных специфических биологических компонентов тест-систем, в том числе антигенов, иммуноглобулинов [15]. Для приготовления основы иммунизирующего материала, с целью получения антител, используют клеточные культуры животных.

Каждый этап исследований требует не только учета генетических особенностей (вариабельности) вируса [4], но и проведения дополнительного, более углубленного изучения специфичности и чувствительности отдельных компонентов. Несоблюдение этих требований может привести к низкой диагностической эффективности тест-систем на финальном этапе разработки [9].

Целью данной работы была оценка серологической активности антигенов вируса бешенства, выделенных из мозговой ткани мышей с использованием гомогенизатора FastPrep с последующим ультрацентрифугированием.

Материалы и методы

В работе использовали производственный штамм вируса бешенства «Овечий» ГНКИ (коллекция ФЦТРБ-ВНИВИ), органо-тканевого происхождения, с инфекционным титром $5,25 \lg LD_{50}/0,03$ мл.

Для наработки вирусного материала белых мышей линии BALB/c живой массой 6–7 г заражали интрацеребрально вирусом бешенства, штамм «Овечий» ГНКИ. Мышей с признаками неврологических нарушений через 5–8 сут после заражения усыпляли, декапитировали, стерильно извлекали мозг и готовили 20 % мозговую суспензию в 0,01 М фосфатно-буферном растворе.

С целью выделения вируса часть мозговой ткани подвергали дезинтеграции на приборе FastPrep®-24 Classic Instrument (MP Biomedicals), для мак-

симального извлечения вируса использовали прибор Lising Matrix B; другую часть подвергали замораживанию-оттаиванию. Прибор FastPrep-24 был использован на предварительном этапе подготовки вирусного материала для полного разрушения клеток мозговой ткани, так как, в отличие от стеклянных гомогенизаторов, данный прибор обеспечивает стабильную повторяемость результатов и не зависит от человеческого фактора. Режим обработки на приборе FastPrep: скорость вибрации 6,0 миллисекунд, время обработки 60 с в присутствии однородных частиц карбида кремния.

Мозговую ткань осаждали низкоскоростным центрифугированием, супернатант концентрировали ультрацентрифугированием при 25000 g. Очистку вируса проводили в ступенчатом градиенте сахарозы 15–50 % с использованием ультрацентрифуги Optima L-90K (Beckman) и последующим исследованием промежуточных стадий флотации. На каждом этапе очистки вируса проводили контроль при помощи аналитического электрофореза и иммуноблотинга для выявления локализации полипептидов и их серологической активности.

Концентрацию белка определяли на спектрофотометре UV5 (Mettler Toledo) при длине волны 280 нм согласно инструкции к прибору.

Электрофоретический профиль вируса бешенства изучали по методу U.K.Laemmli [11]. Методом иммуноблотинга (Bio-Rad) определяли серологическую активность полученного материала с использованием гипериммунных сывороток с высокой активностью, а также сыворотки овец, вакцинированных против бешенства антирабической инактивированной сухой культуральной вакциной из штамма «Щелково-51» (ФКП «Щелковский биокомбинат»).

Выделение иммуноглобулинов из сыворотки крови овец, иммунизированных вирусом бешенства, проводили методом высаливания насыщенным раствором 2,78 М сульфата аммония с последующим диализом против 0,025 М трис-HCl буфера, pH 7,8. Процедуру переосаждения иммуноглобулинов сульфатом аммония проводили 3 раза.

Результаты и обсуждение

На первом этапе проведено сравнительное изучение чистоты используемых иммуноглобулинов, полученных из сыворотки крови овец, иммунизированных вирусом бешенства. Иммуноглобулины овцы после первого, второго и третьего цикла осаждения сульфатом аммония и диализа очищали при помощи ионообменной хроматографии с целью получения отдельно и препаративно IgG1 и IgG2 для повышения их чувствительности и специфичности. Степень чистоты полученного гипериммунного иммуноглобулина оценивали методом электрофореза на ацетатцеллюлозной мембране, рис. 1 [5]

В супернатанте уже после первого осаждения отсутствовала зона иммуноглобулинов, что свиде-

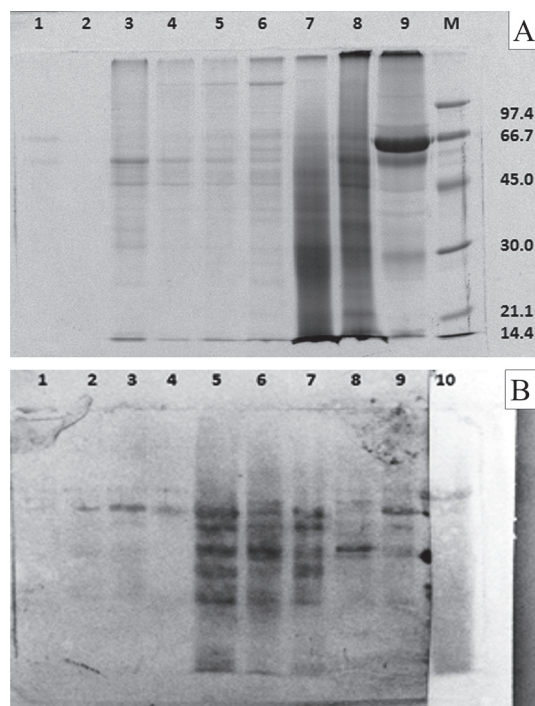


Рис. 1. Электрофорез проб в процессе получения антирабических глобулинов после осаждения сульфатом аммония с последующей ионообменной хроматографией на ДЭАЭ-целлюлозе:

1, 2, 3 – IgG1; 4, 5, 6, 7 – IgG2; 8 – препарат иммуноглобулина после третьего осаждения и 7-дневного диализа; 9 – исходная овечья гипериммунная сыворотка

тельствует о полном их осаждении. После второго и третьего осаждения отмечали наличие незначительного количества иммуноглобулинов в супернатанте. Конечный продукт после диализа характеризовался высоким содержанием иммуноглобулина и отсутствием примесей сывороточных белков.

Таким образом, метод двукратного переосаждения сульфатом аммония позволяет получить чистый препарат иммуноглобулина из гипериммунной сыворотки овец без наличия примесей сывороточных белков.

На следующем этапе проводили очистку вирусного антигена. В качестве исходного материала использовали вирусный материал с инфекционным титром $5,25 \text{ Ig LD}_{50}/0,03 \text{ мл}$, полученный на основе штамма «Овечий» ГНКИ, репродуцированного в мозговой ткани экспериментально зараженных мышей. Концентрация вирусного белка после очистки от мозговой ткани и концентрирования составила $64,7 \text{ мг/мл}$. В результате фракционирования в ступенчатом градиенте плотности сахарозы с концентрацией 15–50 % при 25000 g в течение 120 мин получено пять фракций вируса бешенства. Электрофоретическое разделение фракций методом вертикального диск-электрофореза в 12,5 % ПААГ показало, что максимально очищенной является белковая фракция, отобранная с зоны сахарозы 15–20 % и соответствующая молекулярной массе 67,0 кДа. При этом было отмечено, что данная фракция содержала также незначительную примесь других белков. Активность белковых фракций вируса бешенства подтверждена в сэндвич-ИФА (таблица).

Специфичность белковых фракций вируса бешенства после фракционирования в ступенчатом градиенте плотности сахарозы

Исследуемый материал	Титр, $\text{LD}_{50}/\text{мл}$	Концентрация белка, мг/мл	Титр антигена в ИФА, $1/\text{л}^*$
Концентрированный антиген	$10^{5,5}$	$64,7 \pm 0,22$	2560
Фракция зоны 15–20 % градиента плотности	–	$0,78 \pm 0,03$	1280
Фракция зоны 45–50 % градиента плотности	–	$0,45 \pm 0,07$	640

*Обратные значения титров антигена вируса бешенства.

Специфическая антигенная активность фракций составила $1:640$ – $1:1280$ ($K_{\text{сн}}=2,1$ – $2,2$). Высокая активность зоны 15–20 % градиента плотности, по всей видимости, связана с локализацией в данной зоне пептидов, соответствующих антигенным детерминантам вируса бешенства.

Далее специфичность и активность различных фракций антигена, после концентрирования и очистки через градиент сахарозы, проверяли в реакции иммуноблота с использованием антирабических иммуноглобулинов овцы (рис. 2).

В осадке ультрацентрифугированного антигена вируса бешенства (УЦФ-АГ) (трек 1) выявили 2 минорные фракции полипептидов в области 45–66,7 кДа. Антиген, полученный при ультрацентрифугировании при 25000 g в градиенте сахарозы 15–20 % (трек 6), содержал все основные полипептиды вируса, а антиген, полученный с градиента сахарозы 40–45 % (трек 3), содержал дополнительно две фракции полипептидов с молекулярной массой в области от 30 до 45 кДа. Обработка вируса бешенства на FastPrep-24 не обеспечивала четкой картины разделения полипептидов (трек 7). Характерная картина разделения в 12,5 % ПААГ установлена при использовании исходного вируса бешенства (трек 9). При этом обнаруживаются 2 мажорные и 8 минорных фракций полипептидов.

В результате иммуноблота антигенов, полученных с градиента сахарозы в диапазоне 40–45 и 20–35 %, выявлялась одна мажорная фракция по-

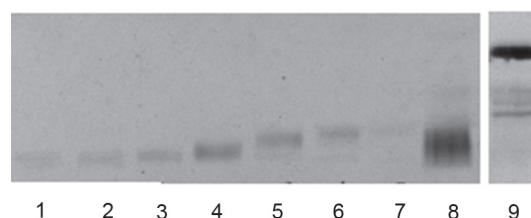


Рис. 2. Результаты электрофореза (А) и иммуноблота (В) УЦФ-АГ вируса бешенства с овечьими антирабическими глобулинами:

1 – осадок после центрифугирования в градиенте сахарозы; 2 – антиген с градиента сахарозы 45–50 %; 3 – антиген с градиента сахарозы 40–45 %; 4 – антиген с градиента сахарозы 20–35 %; 5 – антиген с градиента сахарозы 20–40 %; 6 – антиген с градиента сахарозы 15–20 %; 7 – супернатант зараженной мозговой ткани после обработки на FastPrep-24; 8 – осадок зараженной мозговой ткани после обработки на FastPrep-24; 9 – вирус бешенства штамм «Овечий» ГНКИ; М – маркеры молекулярных масс (кДа)

липептидов, соответствующая 54 кДа. При анализе результатов иммуноблота и электрофореза белков с градиента сахарозы 15–20 % и супернатанта, полученного после центрифугирования при 3000 g в течение 30 мин взвеси зараженной мозговой ткани после обработки на FastPrep-24, установлен идентичный полипептидный профиль получаемых антигенов, при этом последний способ прост в исполнении и не требует значительных затрат.

Таким образом, в ходе сравнения методов получения и очистки антигена вируса бешенства наиболее оптимальным определено проведение гомогенизации на FastPrep-24 с последующим фракционированием в градиенте плотности сахарозы. В результате иммуноблота антигенов, полученных с градиента сахарозы в диапазоне 40–45 и 20–35 % после ультрацентрифугирования, выявлена одна мажорная фракция полипептидов, соответствующая 54 кДа. Показано, что максимально очищенной является белковая фракция с молекулярной массой 67 кДа, отобранная с зоны сахарозы 15–20 %. Высокая специфическая антигенная активность данной фракции подтверждена в ИФА и иммуноблоте. В последующем, будет оценена возможность использования выделенной фракции антигена вируса бешенства в качестве иммунизирующего антигена для получения иммуноглобулинов с высокой активностью, что позволит повысить диагностическую чувствительность и специфичность совершенствуемых тест-систем на основе ИФА и РИФ для проведения скрининговых исследований на бешенство и мониторинга эффективности противоэпизоотических мероприятий.

Биоэтика. Все стадии исследования соответствовали законодательству РФ, международным этическим нормам и нормативным документам ФЦТРБ-ВНИВИ.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамова Е.Г., Генералов С.В., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Никифоров А.К., Комиссаров А.В. Экспериментальное обоснование внедрения культуральных технологий в производство антирабического иммуноглобулина. *Проб. особо опасных инф.* 2016; 2:95–101. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-95-101.
2. Бельчихина А.В., Караулов А.К. Ретроспективный анализ эпизоотической ситуации по бешенству животных на территории Российской Федерации. *Ветеринария сегодня.* 2016; 1(16):64–70.
3. Генералов С.В., Абрамова Е.Г., Матвеева Ж.В., Жулидов И.М., Савицкая Л.В., Лобовикова О.А. Оптимизация условий масштабированного культивирования фиксированного вируса бешенства штамма «Москва 3253» в культуре клеток Vero. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 2:101–3.
4. Гулюкин А.М., Шабейкин А.А., Зайкова О.Н., Полякова И.В., Забережный А.Д., Хисматуллина Н.А., Самерханов И.И. Особенности эпизоотического процесса и молекулярно-генетических характеристик изолятов вируса бешенства в Республике Татарстан. *Ветеринарный врач.* 2015; 6:3–11.
5. Кондрахин И.П., Курилов Н.В., Малахов А.Г., Архипов А.В., Белов А.Д., Беляков И.М., Блинов Н.И., Коробов А.В., Фролова Л.А., Севастьянова Н.А. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии: справочное издание. М.: Агропромиздат; 1985. 287 с.
6. Шабейкин А.А., Зайкова О.Н., Гулюкин А.М. Обзор эпизоотической ситуации по бешенству в Российской Федерации за

- период с 1991 по 2015 год. *Ветеринария Кубани.* 2016; 4:4–6.
7. Chacko K., Parakadavathu R.T., Al-Maslamani M., Nair A.P., Chekura A.P., Madhavan I. Diagnostic difficulties in human rabies: A case report and review of the literature. *Qatar Med. J.* 2017; 2016(2):15. DOI: 10.5339/qmj.2016.15.
 8. Duong V., Tarantola A., Ong S., Mey C., Choeung R., Ly S., Bourhy H., Dussart P., Buchy P. Laboratory diagnostics in dog-mediated rabies: an overview of performance and a proposed strategy for various settings. *Int. J. Infect. Dis.* 2016; 46:107–4. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.03.016.
 9. Eggerbauer E., de Benedictis P., Hoffmann B., Mettenleiter T.C., Schlottau K., Ngoepe E.C., Sabeta C.T., Freuling C.M., Müller T. Evaluation of six commercially available rapid immunochromatographic tests for the diagnosis of rabies in brain material. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(6):e0004776. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004776.
 10. Faye M., Dacheux L., Weidmann M., Diop S.A., Loucoubar C., Bourhy H., Sall A.A., Faye O. Development and validation of sensitive real-time RT-PCR assay for broad detection of rabies virus. *J. Virol. Methods.* 2017; 243:120–30. DOI: 10.1016/j.jviromet.2016.12.019.
 11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5.
 12. Léchêne M., Naïssengar K., Lepelletier A., Alfaroukh I.O., Bourhy H., Zinsstag J., Dacheux L. Validation of a rapid rabies diagnostic tool for field surveillance in developing countries. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(10):e0005010. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005010.
 13. Manoj S., Mukherjee A., Johri S., Kumar K.V. Recovery from rabies, a universally fatal disease. *Mil. Med. Res.* 2016; 3:21. DOI: 10.1186/s40779-016-0089-y.
 14. Maxwell M.J., Freire de Carvalho M.H., Hoet A.E., Vigilato M.A., Pompei J.C., Cosivi O., Del Rio Vilas V.J. Building the road to a regional zoonoses strategy: A survey of zoonoses programmes in the Americas. *PLoS One.* 2017; 12(3):e0174175. DOI: 10.1371/journal.pone.0174175.
 15. Tekki I.S., Ponfa Z.N., Nwosuh C.I., Kumbish P.R., Jonah C.L., Okewole P.A., Shamaki D., Ahmed S.M. Comparative assessment of seller's staining test (SST) and direct fluorescent antibody test for rapid and accurate laboratory diagnosis of rabies. *Afr. Health Sci.* 2016; 16(1):123–7. DOI: 10.4314/ahs.v16i1.16.

References

1. Abramova E.G., Generalov S.V., Matveeva Z.V., Zhulidov I.M., Nikiforov A.K., Komissarov A.V. [Experimental substantiation of cultural technologies introduction into manufacturing of anti-rabies immunoglobulin]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 2:95–101. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-95-101.
2. Belchikhina A.V., Karaulov A.K. [Retrospective analysis of rabies epizootic situation in animals in the territory of the Russian Federation]. *Veterinariya Segodnya.* 2016; 1(16):64–70.
3. Generalov S.V., Abramova E.G., Matveeva Zh.V., Zhulidov I.M., Savitskaya L.V., Lobovikova O.A. [Optimization of specifications for scaled-up fixed rabies virus cultivation ("Moscow 3253" strain) in Vero cell culture]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 2:101–3.
4. Gulyukin A.M., Shabeikin A.A., Zaikova O.N., Polyakova I.V., Zaberezhnyy A.D., Khismatullina N.A., Samerkhanov I.I. [Epidemiological features and molecular-genetic characterization of rabies virus isolates in the Republic of Tatarstan]. *Veterinarny Vrach.* 2015; 6:3–11.
5. Kondrakhin I.P., Kurilov N.V., Malakhov A.G., Arkhipov A.V., Belov A.D., Belyakov I.M., Blinov N.I., Korobov A.V., Frolova L.A., Sevast'yanova N.A. [Clinical laboratory diagnostics in veterinary medicine: reference edition]. Moscow: "Agropromizdat"; 1985. 287 p.
6. Shabeikin A.A., Zaikova O.N., Gulyukin A.M. [Overview of epizootic situation on rabies between 1991 and 2015 in the Russian Federation]. *Veterinariya Kubani.* 2016; 4:4–6.
7. Chacko K., Parakadavathu R.T., Al-Maslamani M., Nair A.P., Chekura A.P., Madhavan I. Diagnostic difficulties in human rabies: A case report and review of the literature. *Qatar Med. J.* 2017; 2016(2):15. DOI: 10.5339/qmj.2016.15.
8. Duong V., Tarantola A., Ong S., Mey C., Choeung R., Ly S., Bourhy H., Dussart P., Buchy P. Laboratory diagnostics in dog-mediated rabies: an overview of performance and a proposed strategy for various settings. *Int. J. Infect. Dis.* 2016; 46:107–4. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.03.016.
9. Eggerbauer E., de Benedictis P., Hoffmann B., Mettenleiter T.C., Schlottau K., Ngoepe E.C., Sabeta C.T., Freuling C.M., Müller T. Evaluation of six commercially available rapid immunochromatographic tests for the diagnosis of rabies in brain material. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(6):e0004776. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004776.
10. Faye M., Dacheux L., Weidmann M., Diop S.A., Loucoubar C., Bourhy H., Sall A.A., Faye O. Development and validation of sensitive real-time RT-PCR assay for broad detection of rabies virus. *J. Virol. Methods.* 2017; 243:120–30. DOI: 10.1016/j.jviromet.2016.12.019.
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5.
12. Léchêne M., Naïssengar K., Lepelletier A., Alfaroukh I.O., Bourhy H., Zinsstag J., Dacheux L. Validation of a rapid rabies diagnostic tool for field surveillance in developing countries. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(10):e0005010. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005010.
13. Manoj S., Mukherjee A., Johri S., Kumar K.V. Recovery from ra-

bies, a universally fatal disease. *Mil. Med. Res.* 2016; 3:21. DOI: 10.1186/s40779-016-0089-y.

14. Maxwell M.J., Freire de Carvalho M.H., Hoet A.E., Vigilato M.A., Pompei J.C., Cosivi O., Del Rio Vilas V.J. Building the road to a regional zoonoses strategy: A survey of zoonoses programmes in the Americas. *PLoS One*. 2017; 12(3):e0174175. DOI: 10.1371/journal.pone.0174175.

15. Tekki I.S., Ponfa Z.N., Nwosuh C.I., Kumbish P.R., Jonah C.L., Okewole P.A., Shamaki D., Ahmed S.M. Comparative assessment of seller's staining test (SST) and direct fluorescent antibody test for rapid and accurate laboratory diagnosis of rabies. *Afr. Health Sci.* 2016; 16(1):123–7. DOI: 10.4314/ahs.v16i1.16.

Authors:

Efimova M.A., Arslanova A.F., Akhmadeev R.M., Nikitin A.I., V.G. Gumerov. Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Nauchny Gorodok-2. Kazan, Tatarstan, 420075, Russian Federation. E-mail: vnivi@mail.ru.

Khaertynov K.S. Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety; Nauchny Gorodok-2, Kazan, Tatarstan, 420075, Russian Federation. Kazan State Medical Academy – Affiliated Branch of Federal State-Funded Educational Institution for Further Vocational Education “Russian Medical Academy of Continuing Education”; 36 Butlerova St., Kazan, Tatarstan, 420012, Russian Federation. E-mail: ksma.rf@tatar.ru.

Shuralev E.A. Federal Center for Toxicological, Radiation and Biological Safety, Nauchny Gorodok-2; Kazan, Tatarstan, 420075, Russian Federation. Kazan State Medical Academy – Affiliated Branch of Federal State-Funded Educational Institution for Further Vocational Education

“Russian Medical Academy of Continuing Education”; 36 Butlerova St., Kazan, Tatarstan, 420012, Russian Federation. Kazan (Privolzhsky) Federal University; 18, Kremlyovskaya St., Kazan, Tatarstan, 420008, Russian Federation. E-mail: ecology@kpfu.ru.

Об авторах:

Ефимова М.А., Арсланова А.Ф., Ахмадеев Р.М., Никитин А.И., Гумеров В.Г. Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности. Российская Федерация, 420075, Татарстан, Казань, Научный городок-2. E-mail: vnivi@mail.ru.

Хаертынов К.С. Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности; Российская Федерация, 420075, Татарстан, Казань, Научный городок-2. Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России; Российская Федерация, 420012, Татарстан, Казань, ул. Бутлерова, 36. E-mail: ksma.rf@tatar.ru.

Шуралев Э.А. Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности; Российская Федерация, 420075, Татарстан, Казань, Научный городок-2. Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России; Российская Федерация, 420012, Татарстан, Казань, ул. Бутлерова, 36. Казанский (Приволжский) федеральный университет; Российская Федерация, 420008, Татарстан, Казань, ул. Кремлевская, 18. E-mail: ecology@kpfu.ru.

Поступила 04.10.17.

Е.В.Клавдиенко, И.В.Тучков, Т.А.Полунина, Н.П.Гусева, Н.И.Смирнова

КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* ПРОДУЦЕНТА ОСНОВНОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ТОКСИН-КОРЕГУЛИРУЕМЫХ ПИЛЕЙ АДГЕЗИИ ТСРА *VIBRIO CHOLERAЕ* БИОВАРА ЭЛЬ ТОР

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

Цель работы. Конструирование рекомбинантного штамма *E. coli*, продуцента белка ТсрА возбудителя холеры Эль Тор, несущего в геноме ген *tcpA^{CIRS}*, и его использование для получения антигена. **Материалы и методы.** В работе использовали нетоксигенный штамм геноварианта *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор из ГКПБ ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», а также коммерческие штаммы *Escherichia coli* и плазмиды для клонирования фирмы Invitrogen, США. Хромосомную ДНК из клеток *V. cholerae* выделяли с помощью набора Charge Smitch gDNA Mini Bacteria Kit методом нуклеосорбции. Для выделения плазмидной ДНК из клеток *E. coli* использовали набор PureLink Quick Plasmid DNA MiniprepKits. Присутствие гена *tcpA^{CIRS}* определяли в ПЦР, используя рассчитанные нами праймеры. Фрагменты ДНК выделяли из агарозного геля с помощью набора PCR Clear-Up-System. SDS-PAGE проводили по методу U.K.Laemmli. Концентрацию белка в пробах измеряли методом М.М.Брадфорда. Для очистки рекомбинантного белка ТсрА применяли набор для аффинной хроматографии. **Результаты и выводы.** Сконструирован безопасный штамм *E. coli* – продуцент рекомбинантного белка ТсрА – основной субъединицы токсин-коррегулируемых пилей адгезии возбудителя холеры Эль Тор. Участок гена *tcpA V. cholerae* биовара Эль Тор был клонирован в составе векторной плазмиды pET302 по сайтам рестрикции XhoI-BamHI в штамм *E. coli* BL21(DE3)Star. В этой конструкции биосинтез протеина находится под транскрипционным контролем промотора фага Т7 и индуцируется с помощью изопропил-β-тиогалактопиранозидом (ИПТГ). Отработаны условия оптимальной продукции белка ТсрА и схема его очистки с помощью аффинной хроматографии. Показано, что ТсрА присутствует в клетках кишечной палочки как в нативной форме, так и в виде телец включения. Общая продукция белка ТсрА составляет 60 мкг/мл. Полученный очищенный белок ТсрА может быть использован для изучения его иммуногенных и физико-химических свойств, а также для разработки иммунодиагностических препаратов с целью оценки уровня продукции ТсрА у различных штаммов *V. cholerae* и определения антигенного состава холерных вакцинных препаратов.

Ключевые слова: холерный вибрион, белок ТсрА, клонирование генов, рекомбинантная плаزمид, штамм-продуцент, аффинная хроматография.

Корреспондирующий автор: Клавдиенко Елена Владимировна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

E.V.Klavdienko, I.V.Tuchkov, T.A.Polunina, N.P.Guseva, N.I.Smirnova

Construction of Recombinant *Escherichia coli* Strain – Producer of Basic Subunit of Toxin-Coregulated Pilus of Adhesion (TCPA) of *Vibrio cholerae* Biovar El Tor

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Objective of the study is to construct recombinant *E. coli* strain – producer of TcpA protein of cholera agent El Tor, carrying *tcpA^{CIRS}* gene in its genome, and use the strains for antigen production. **Materials and methods.** Utilized was non-toxicogenic genovariant strain of *Vibrio cholerae* biovar El Tor from the “State Collection of Pathogenic Bacteria” at the premises of RusRAPI “Microbe”, as well as commercial *E. coli* strains and plasmids for cloning (Invitrogen, USA). Chromosomal DNA from *V. cholerae* cells was extracted using Charge Smitch gDNA Mini Bacteria Kit applying nucleosorption. To extract plasmid DNA from *E. coli* cells PureLink Quick Plasmid DNA MiniprepKits were used. The presence of *tcpA^{CIRS}* gene was assayed by PCR, using designed through our own efforts primers. DNA fragments were isolated from agarose gel with the help of PCR Clear-Up-System panel. SDS-PAGE was performed according to U.K.Laemmli method. Protein content of samples was measured by M.M.Bradford method. The panel for affinity chromatography was applied for recombinant TcpA protein purification. **Results and conclusions.** Constructed safe strain of *E. coli* is the producer of recombinant TcpA protein, basic subunit of toxin-coregulated pilus of adhesion of cholera agent biovar El Tor. The region of *tcpA* gene of *Vibrio cholerae* biovar El Tor was cloned as part of vector plasmid pET302 by the restriction sites XhoI-BamHI in *E. coli* strain BL21(DE3)Star. In the stated design protein biosynthesis is under transcriptional control of phage promoter T7 and induced by isopropyl-β-thiogalactoside (IPTG). Tested were the conditions for optimum TcpA protein production and the layout of its purification using affinity chromatography. It was demonstrated that TcpA is present in cells of intestinal bacterium, both in native form and as inclusion bodies. Overall TcpA protein production amounted to 60 mcg/ml. Obtained purified TcpA protein can be used for studies of its immunogenic and physical-chemical properties, as well as development of immune-diagnostic preparations to evaluate the level of TcpA production in various *V. cholerae* strains, and identification of antigen composition of cholera vaccine preparations.

Key words: cholera vibrio, TcpA protein, gene cloning, recombinant plasmid, producer-strain, affinity chromatography.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Elena V. Klavdienko, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Klavdienko E.V., Tuchkov I.V., Polunina T.A., Guseva N.P., Smirnova N.I. Construction of Recombinant *Escherichia coli* Strain – Producer of Basic Subunit of Toxin-Coregulated Pilus of Adhesion (TCPA) of *Vibrio cholerae* Biovar El Tor. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2017; 4:32–37. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-32-37

Холера – особо опасная инфекция, эпидемии которой регистрируются на территориях многих стран Азии, Африки, Южной Америки. Возникновение эпидемических осложнений по холере в России связано с ее заносами из зарубежных стран, неблагополучных по этой инфекции. Возбудителем текущей седьмой пандемии холеры, с 1961 г. по настоящее время, является *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор. К ключевым факторам, определяющим патогенный потенциал возбудителя холеры, относятся холерный токсин (СТ, *cholerae toxin*), вызывающий основной клинический симптом – профузную диарею, а также токсин-корегулируемые пили (TCP, *toxin-coregulated pilus*), ответственные за колонизацию холерными вибрионами тонкого кишечника человека. Основной субъединицей TCP является белок ТсрА, кодируемый геном *tcpA* [2]. Структурные гены СТ и TCP локализованы в геноме возбудителя на двух мобильных элементах – профаге CTXφ и острове патогенности VPI-1 (*Vibrio pathogenicity island*) [3].

TCP представляют собой пучки из тонких и гибких нитей длиной несколько микрометров и диаметром менее 10 нм, образующих на поверхности клетки длинные тяжи. Каждая нить состоит из гомополимерных повторяющихся белковых субъединиц ТсрА с молекулярной массой 20,5 кДа, которые относятся к IV типу пилей, встречающихся у большинства патогенных грамотрицательных бактерий. С-терминальный регион белка ТсрА образует одну дисульфидную связь, необходимую для стабилизации структуры [6, 15]. Установлено, что TCP являются не только ключевым фактором патогенности возбудителя холеры, но относятся также к протективным антигенам, ответственным за формирование антиколонизирующего иммунитета при холере. Вследствие иммуногенности этот белок включен в состав многих рекомбинантных холерных вакцин [13, 14]. К настоящему времени установлено, что у возбудителя холеры Эль Тор нуклеотидная последовательность гена *tcpA* представлена двумя основными аллелями: *tcpA^{El}* и *tcpA^{CIRS}*. Аллель *tcpA^{El}* характерна для типичных штаммов возбудителя, а также геновариантов, вызывавших эпидемии холеры с 1961 по 2002 год. Измененная структура гена *tcpA* (аллель *tcpA^{CIRS}*) обнаружена у высокопатогенных штаммов, изолированных в эндемичных по холере регионах в последующие годы – с 2003 г. и по настоящее время [10]. В отличие от аллели *tcpA^{El}*, аллель *tcpA^{CIRS}* несет одну несинонимичную нуклеотидную замену аденина на гуанин (A/G) в положении 266, что приводит к изменению аминокислотной последовательности в белке ТсрА: в позиции 89 аспарагин заменен на серин. Функциональная значимость указанной замены в этом белке пока точно не определена. Тем не менее, широкое распространение геновариантов возбудителя с такой измененной структурой *tcpA* в разных регионах мира за счет вытеснения ими других штаммов возбудителя, а также их занос на территорию России в последние годы определили наш вы-

бор аллели *tcpA^{CIRS}* для создания штамма-продуцента кодируемого ей белка.

К настоящему времени известно о конструировании рекомбинантных штаммов *E. coli* – продуцентов белка ТсрА – рядом зарубежных исследователей для последующего создания на их основе холерных вакцин [9, 12, 13, 14]. Однако в РФ до сих пор отсутствует подобный штамм-продуцент ТсрА, который необходим не только для получения отечественных рекомбинантных холерных вакцин нового поколения, но и для создания иммунодиагностической тест-системы, предназначенной для оценки продукции этого фактора патогенности эпидемически опасными штаммами, поскольку ген *tcpA* относится к генетическим маркерам таких штаммов. Все это указывает на актуальность исследований, направленных на создание эффективных штаммов-продуцентов протективного белка ТсрА.

В настоящее время в основу таких исследований положены достижения генной инженерии, позволяющие использовать экспрессирующие векторные системы, которые определяют возможность получения значительного количества белка с заданными структурно-функциональными характеристиками [12].

Целью нашей работы явилось конструирование рекомбинантного штамма *E. coli*, продуцента белка ТсрА возбудителя холеры Эль Тор, несущего в геноме ген *tcpA^{CIRS}*, и его использование для получения этого антигена.

Материалы и методы

Донором гена *tcpA^{CIRS}* служил штамм *V. cholerae* M1430 биовара Эль Тор, полученный из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», выделенный от больного холерой на территории России (Тверь, 2005 г.). Для трансформации полученных рекомбинантных плазмид использовали коммерческие штаммы *E. coli* TOP10 (Invitrogen, США) и *E. coli* BL21 Star™(DE3) (Invitrogen, США). Вектором для клонирования служили плазмиды pCR2.1 и pET302 (Invitrogen, США).

Бактериальные штаммы *V. cholerae*, *E. coli* TOP10 (Invitrogen, США) и *E. coli* BL21 Star™ (DE3) культивировали на жидкой и агаризованной среде LB (pH 7,4) без антибиотиков или с добавлением ампициллина (50 мкг/мл). В качестве индуктора экспрессии клонированного гена *tcpA^{CIRS}* использовали изопропил-β-D-тиогалактозид (ИПТГ) (Invitrogen, США).

Хромосомную ДНК из клеток *V. cholerae* M1430 выделяли с помощью коммерческого набора Charge Smitch gDNA Mini Bacteria Kit (Invitrogen, США) методом нуклеосорбции. Для выделения плазмидной ДНК из клеток *E. coli* использовали коммерческий набор PureLink Quick Plasmid DNA Miniprep Kits (Invitrogen, США).

Компьютерный анализ нуклеотидных и аминокис-

кислотных последовательностей и конструирование праймеров для амплификации клонируемого фрагмента ДНК осуществляли с помощью пакета программ Vector NTI Suit 9 (Invitrogen, США).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили как описано ранее [3]. Продукты визуализировали под УФ-светом и фотографировали на геледокументирующей системе VersaDoc фирмы (Bio-Rad, США) с использованием программы Quantity One v.4.6.9 (Bio-Rad, США). В качестве контроля молекулярной массы использовали коммерческие маркеры GenRuler™ 100 пн DNALadder (MBI Fermentas, Литва). Присутствие гена *tcpA* определяли в ПЦР, используя рассчитанные нами праймеры (F full ca-
caaatggtggaggtatat и R full gcttaactgtaccaaaagc), фланкирующие фрагмент длиной 701 п.н.

Плазмидный состав штаммов изучали методом скрининг-электрофореза в агарозном геле [8]. Фрагменты ДНК выделяли из агарозного геля с помощью набора PCR Clear-Up-System (Promega, США).

Секвенирование проводили с использованием автоматического секвенатора ABI3500xl (Applied Biosystems, США) с использованием наборов для секвенирования BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. SDS-PAGE электрофорез проводили по методу U.K.Laemmli [10].

Двумерный гель-электрофорез осуществляли в ячейках Protean II xi и Protean II xi 2D (Bio-Rad Laboratories, США) согласно инструкции производителя с модификациями [4]. Гели анализировали в мультифункциональной системе геледокументирования Syngene с помощью программного обеспечения Dymension (G:BOX Chemi XT4, Великобритания).

Для получения лизатов клеток штамма-продуцента, выращенных в бульоне LB при 37 °C в объеме 50 мл, клетки осаждали центрифугированием при 10000 g в течение 10 мин. Осадок промывали и обрабатывали на ультразвуковом гомогенизаторе циклом озвучивания: 30 с ON, 30 с OFF, 10 раз при частоте 60 кГц на ледяной бане. Для разделения растворимой и нерастворимой фракций белка TsrA образовавшийся клеточный дебрис осаждали при 10000 g в течение 10 мин. Наличие белка в полученных образцах клеточного лизата, осадка и супернатанта контролировали с помощью SDS-PAGE электрофореза.

Концентрацию белка в пробах измеряли методом М.М. Bradford [5].

Для очистки рекомбинантного белка TsrA применяли набор для аффинной хроматографии (Bio-Rad, США), содержащий Ni-NTA агарозу (Qiagen, Германия).

Результаты и обсуждение

Конструирование штамма-продуцента белка TsrA осуществляли в два этапа. На первом был получен безопасный штамм *E. coli*, содержащий пол-

норазмерный хромосомный ген *tcpA*^{CIRS} возбудителя холеры в составе вектора для клонирования. Для этого вначале амплифицировали ген *tcpA*^{CIRS}, используя праймеры (F full и R full), фланкирующие его полную нуклеотидную последовательность со старт- и стоп-кодонами. Матрицей ДНК для амплификации гена *tcpA*^{CIRS} служил штамм *V. cholerae* M1430 биовара Эль Тор. Далее ПЦР-продукты подвергали электрофорезу в 1,5 % агарозном геле. Ампликон размером 701 п.н., соответствующий по молекулярной массе полноразмерному гену *tcpA*^{CIRS}, вырезали и очищали от агарозы на колонках (Centri-Sep Spin Columns Applied Biosystems, США). Далее очищенный ПЦР-продукт клонировали в плазмидном векторе pCR2.1. Плазмидную ДНК и ампликон гена *tcpA*^{CIRS} лигировали с использованием ДНК-лигазы T4 (Thermo Fisher Scientific, Германия) согласно рекомендациям изготовителя, затем методом электропорации лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* TOP10, которые высевали на селективную среду, содержащую ампициллин, хромогенный субстрат X-gal и индуктор ИПТГ для «синей-белой селекции». В отобранных белых колониях *E. coli* TOP10 наличие специфических вставок нуклеотидной последовательности гена *tcpA*^{CIRS} в плазмиде, содержащейся в клетках, подтверждали методом ПЦР с использованием указанных выше праймеров. Последующее секвенирование клонированного участка ДНК в четырех отобранных колониях штамма *E. coli* TOP10 pCR2.1 показало идентичность его нуклеотидной последовательности с таковой *V. cholerae* M1430 лишь у одного клона, который был отобран для дальнейшей работы и обозначен как *E. coli* TOP10 pCR2.1 *tcpA*. Таким образом, получен рекомбинантный штамм *E. coli* TOP10 pCR2.1 *tcpA* IV группы патогенности, содержащий векторную плазмиду с полноразмерным геном *tcpA*^{CIRS} указанного патогена (рис. 1).

На втором этапе работы путем переклонирования гена *tcpA* из плазмиды pCR2.1 *tcpA* в экспрессирующую векторную систему pET302 создан штамм-продуцент этого белка. Вначале получили укороченный фрагмент клонированного гена *tcpA*^{CIRS}, лишённого лидерного пептида, состоящего из 25 аминокислот и альфа-спирали, характерной для всех пилей адгезии IV типа. Для этого использовали метод ПЦР с рассчитанными нами праймерами, имеющими сайты для эндонуклеаз рестрикции *XhoI* и *BamHI* (рис. 1). В результате получили ампликон, который соответствовал фрагменту гена *tcpA*^{CIRS} размером 534 п.н. Далее ДНК выбранной экспрессирующей плазмиды pET302 и ампликон укороченного гена *tcpA*^{CIRS} одновременно расщепляли эндонуклеазами рестрикции *XhoI* и *BamHI* (Thermo Fisher Scientific, Германия) в течение 15 мин, рестриктонные фрагменты лигировали, и смесью лигированных молекул осуществляли трансформацию методом электропорации компетентных клеток *E. coli* BL21 Star™(DE3) согласно стандартным протоколам.

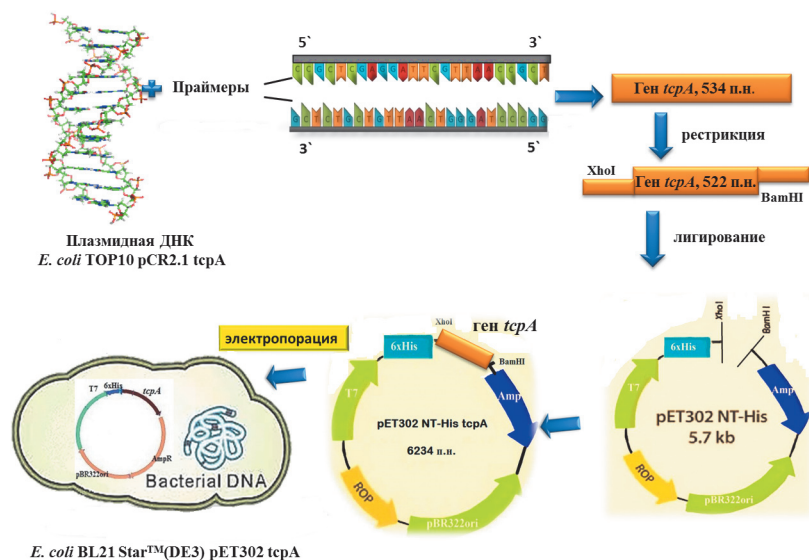


Рис. 1. Схема конструирования рекомбинантного штамма *E. coli* BL21 Star™(DE3) pET302 *tcpA*

Выбор штамма *E. coli* BL21 Star™(DE3) для экспрессии ТсрА обусловлен тем, что в хромосоме этого штамма присутствуют мутации по гену рибонуклеазы (*rne131*), что снижает уровень деградации мРНК и увеличивает выход белка за счет стабильности процесса транскрипции (синтеза мРНК). Кроме того, мутация гена *ompT* устраняет мембранную протеазу OmpT и уменьшает деградацию экспрессируемых белков. Также в геном этого штамма интегрирован ген РНК-полимеразы фага Т7 для экспрессии с сильного Т7 промотора [7]. Полученные трансформанты культивировали на LB-агаре, содержащем 50 мкг/мл ампициллина при 37 °С в течение 18–24 ч. Нуклеотидная последовательность гена *tcpA* шести отобранных клонов была секвенирована. Для дальнейшей работы взяли один клон, обозначенный как *E. coli* BL21 Star™(DE3) pET302 *tcpA*. Таким образом, был сконструирован штамм *E. coli* BL21 Star™(DE3) pET302 *tcpA*, несущий в плазмиде pET302 *tcpA* клонированный участок гена *tcpA*^{CIRS} (534 п.н.), который поставлен под контроль промотора фага, узнаваемого РНК-полимеразой фага Т7. Добавление в среду выращивания рекомбинантного штамма индуктора ИПТГ обеспечивало эффективную продукцию белка ТсрА.

Для изучения экспрессии клонированного фрагмента гена *tcpA*^{CIRS} клетки клона *E. coli* BL21 Star™(DE3) pET302 *tcpA* выращивали на агаре LB в присутствии ампициллина (50 мкг/мл) при 37 °С. Затем две петли ночной культуры ресуспендировали в 2,0 мл бульона LB, культивировали до OD₆₀₀ = 0,6 и вносили в колбы с 50,0 мл LB-бульона (рН 7,4) с добавлением ИПТГ. Для увеличения продукции целевого белка провели ряд экспериментов по выбору условий культивирования штамма-продуцента по следующим параметрам: концентрация ИПТГ (0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1 мМ), время после индукции (2 ч, 3 ч, 4 ч, 6–18 ч) и температура выращивания (30 и 37 °С). Присутствие рекомбинантного белка ТсрА в клетках штамма кишечной палочки оценивали с помощью

12,5 % SDS-PAGE электрофореза. В результате показано, что при выращивании штамма *E. coli* BL21 Star™(DE3) pET302 *tcpA* в жидкой среде LB (рН 7,4) в условиях усиленной аэрации (200 об/мин) при температуре 37 °С в течение 2 ч после индукции 0,1 мМ ИПТГ на электрофореграммах в клеточном лизате штамма *E. coli* BL21 Star™(DE3) pET302 *tcpA* присутствовала белковая полоса с молекулярной массой ~19,0–20,5 кДа (рис. 2, дорожка 2), которая отсутствовала в лизате клеток, выращенных без индукции, а также у контрольного штамма, содержащего векторную плазмиду. При нанесении отдельно осадка и надосадка определено, что белок ТсрА в клетках штамма-продуцента присутствует как в нативной растворимой, так и в нерастворимой фракции в виде телец включения (рис. 2, дорожки 3, 4).

На следующем этапе работы получили очищенный белок ТсрА. Наличие в плазмиде pET302 полигистидиновой метки (His-tag) дает возможность

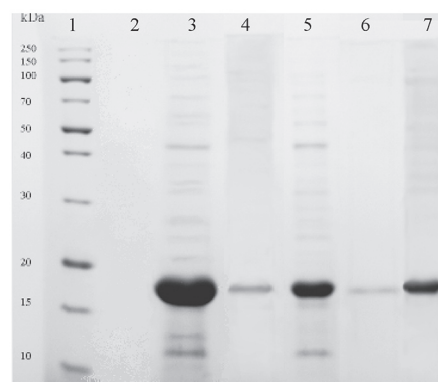


Рис. 2. Анализ продукции белка ТсрА рекомбинантным штаммом методом электрофореза:

1 – маркер молекулярного веса (Invitrogen, США); 2 – отрицательный контроль, штамм *E. coli* BL21 Star™(DE3) pET302; 3 – суммарный клеточный лизат штамма *E. coli* BL21 Star™(DE3) pET302 *tcpA* с оптимальной индукцией ИПТГ; 4 – растворимая фракция рекомбинантного белка ТсрА до очистки на колонке; 5 – нерастворимая фракция штамма *E. coli* BL21 Star™(DE3) pET302 *tcpA*; 6 – первичная элюция нативной формы белка ТсрА с Ni-NTA агарозы Native Binding Buffer с 250 мМ имидазола; 7 – первичная элюция белка ТсрА после рефолдинга

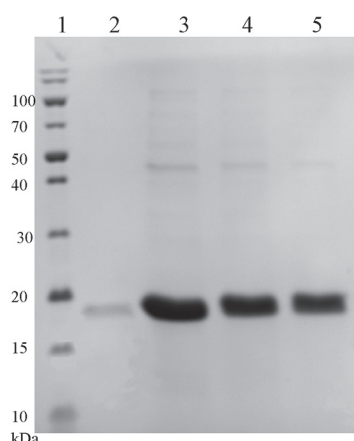


Рис. 3. Электрофореграмма ренатурированной формы рекомбинантного белка ТсрА, полученного из штамма продуцента *E. coli* BL21 Star™(DE3) pET302 *tsrA* комбинированным никель-хелатным методом:

1 – маркер молекулярной массы (Invitrogen, США); 2 – образец белка ТсрА, полученный нативным методом; 3–5 – первые три элюции ренатурированного белка ТсрА после очистки комбинированным методом

выделения и очистки фракций рекомбинантного белка ТсрА с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии [1]. Подготовку колонки для металл-хелатной аффинной хроматографии (Bio-Rad, США), а также выделение и очистку фракций белка ТсрА в нативных и денатурирующих условиях проводили согласно протоколам.

Для получения растворимой фракции белка ТсрА в нативных условиях его супернатант наносили на колонку. Отмывку проводили с помощью буфера Native Wash Buffer, ступенчато повышая в нем концентрацию имидазола: 30 mM (10,0 мл), 50 mM (10,0 мл), 100 mM (10,0 мл) для уменьшения неспецифического связывания с сорбентом загрязняющих белков и повышения чистоты белка ТсрА. Элюцию осуществляли с помощью буфера Native Elution Buffer с 250 mM имидазола. Фракции собирали в стерильные пробирки «Эппендорф» и анализировали на наличие белка с помощью SDS-PAGE электрофореза. Такая очистка позволила получить электрофоретически гомогенный белок ТсрА (рис. 2, дорожки 5, 6).

После оптимизации уровня экспрессии ТсрА показано, что этот рекомбинантный белок синтезировался в клетках штамма-продуцента в растворимой форме. Однако основное его количество находилось в осадке в виде телец включения, на что указывали результаты SDS-PAGE электрофореза. Тельца включения представляют собой частицы, состоящие из агрегатов рекомбинантного белка в денатурированном неактивном состоянии, что осложняет его последующее выделение и очистку. Для устранения этой проблемы и восстановления присущей белку конформации осадок подвергли процессу рефолдинга.

Для получения белка ТсрА из телец включения использовали комбинированный метод очистки на колонках с никелем согласно протоколу набора ProBond (Invitrogen, США). Суть метода заключалась в приго-

товлении лизата и колонок в денатурирующих условиях, а проведение отмывки и элюции с использованием буферов – для нативного метода. Фракции белка после очистки собирали в стерильные пробирки и анализировали с помощью SDS-PAGE электрофореза (рис. 3, дорожки 3–5). Исследования полученных растворимых фракций рекомбинантного белка ТсрА в нативных и комбинированных условиях показали, что все образцы целевого продукта идентичны и представляют собой электрофоретически гомогенный белок. Изучение белка ТсрА 2D-электрофорезом на коммерческих IPG-стрипах (BioRad, США) показало, что белок ТсрА фракционировался в пределах градиента pH 5–7 в виде группы белковых пятен с молекулярной массой 17,0–20,5 кДа.

Общая продукция рекомбинантного белка ТсрА, определенная методом М.М.Брадфорд [5], составляла 60 мкг/мл.

Таким образом, сконструирован безопасный штамм *E. coli* – продуцент рекомбинантного белка ТсрА (60 мкг/мл) – основной субъединицы ТСП-геновариантов возбудителя холеры Эль Тор. Отработаны условия оптимальной продукции белка ТсрА и схема его очистки с помощью аффинной хроматографии на колонках с никель-хелатным сорбентом. Этот метод позволяет получать очищенный препарат рекомбинантного белка ТсрА, который может быть использован для изучения его иммуногенных и физико-химических свойств, а также для последующей разработки на его основе иммунодиагностических препаратов с целью оценки уровня продукции ТсрА у различных штаммов *V. cholerae* и определения антигенного состава холерных вакцинных препаратов.

Авторы приносят глубокую благодарность лаборанту-исследователю отдела микробиологии Н.В.Котовой за помощь в работе.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кельдиева О.А., Гладилов В.Д., Подольская Е.П. Металл-аффинная хроматография. Основы и применение. *Научное приборостроение*. 2013; 23(1):74–85.
2. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Кутырев В.В. Эволюция генома возбудителя холеры в современный период. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2010; 4:11–9.
3. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Агафонов Д.А., Шашкова А.В., Челдышова Н.Б., Черкасов А.В. Сравнительный молекулярно-генетический анализ мобильных элементов природных штаммов возбудителя холеры. *Генетика*. 2013; 49(9):1036–47. DOI: 10.7868/S0016675813090087.
4. Полунина Т.А., Варшавская Ю.С., Заднова С.П., Краснов Я.М. Применение 2D-электрофореза для получения «белковых портретов» лизатов бактериальных культур возбудителей особо опасных инфекций. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 1:97–101.
5. Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72:248–54.
6. Craig L., Taylor R.K., Pique M.E., Adair B.D., Arvai A.S., Singh M., Lloyd S.J., Shin D.S., Getzoff E.D., Yeager M., Forest K.T., Tainer J.A. Type IV pilin structure and assembly: X-ray and EM analyses of *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus and *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin. *Mol. Cell*. 2003; 11(5):1139–50. DOI: 10.1016/S1097-2765(03)00170-9.
7. Grunberg-Manago M. Messenger RNA Stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annu. Rev.*

Genet. 1999; 33:193–227.

8. Kado C.I., Liu S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 1981; 145(3):1365–73.

9. Kiaie S., Abtahi H., Mosayebi G., Alikhani M.Y., Pakzad I. Recombinant toxin-coregulated pilus A (TcpA) as a candidate subunit cholera vaccine. *Iran. J. Microbiol.* 2013; 6(2):68–73.

10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5.

11. Matreja A., Kim D.W., Thomson N., Connor T.R., Lee J.H., Kariuki S. Evidence for multiple waves of global transmission within the seventh cholera pandemic. *Nature.* 2013; 477(7365):462–5. DOI: 10.1038/nature10392.

12. Molaee N., Mosayebi G., Amozande-Nobaveh A., Soleyman M.R., Abtahi H. Evolution of the immune response against recombinant proteins (TcpA, TcpB and FlaA) as a candidate subunit cholera vaccine. *J. Immunol. Res.* 2017;2412747. DOI: 10.1155/2017/2412747.

13. Price G.A., Holmes R.K. Immunizing adult female mice with a TcpA-A2-CTB chimera provides a high level of protection for their pups in the infant mouse model of cholera. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(12):e3356. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003356.

14. Rollenhagen J.E., Kalsy A., Cerda F., Manohar J., Harris J.B., LaRocque R.C., Qadri F., Calderwood S.B., Taylor R.K., Ryan E.T. Transcutaneous immunization with toxin-coregulated pilin A induces protective immunity against *Vibrio cholerae* O1 El Tor challenge in mice. *Infect. Immun.* 2006; 74:5834–9. DOI: 10.1128/IAI.00438-06.

15. Sun D., Lafferty M.J., Peek J.A., Taylor R.K. Domains within the *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilin subunit that mediate bacterial colonization. *Gene.* 1997; 192(1):79–85. DOI: 10.1016/S0378-1119(97)00007-3.

References

1. Kel'tsiyeva O.A., Gladilovich V.D., Podol'skaya E.P. [Metal-affinity chromatography. Fundamentals and application]. *Nauch. Priborostroenie.* 2013; 23(1):74–85.

2. Smirnova N.I., Goryaev A.A., Kutuyev V.V. [Evolution of cholera agent genome in the modern period]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2010; 4:11–9.

3. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Agafonov D.A., Shashkova A.V., Cheldyshova N.B., Cherkasov A.V. [Comparative molecular-genetic analysis of mobile elements of natural cholera agent strains]. *Genetika.* 2013; 49(9):1036–47. DOI: 10.7868/S0016675813090087.

4. Polunina T.A., Varshavskaya Yu.S., Zadnova S.P., Krasnov Ya.M. [Application of 2-D electrophoresis for the construction of "protein profiles" of bacterial cultures lysates of particularly dangerous infections agents]. *Probl. Osobo opasn. Infek.* 2016; 1:97–101. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-97-101.

5. Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72:248–54.

6. Craig L., Taylor R.K., Pique M.E., Adair B.D., Arvai A.S., Singh M., Lloyd S.J., Shin D.S., Getzoff E.D., Yeager M., Forest K.T., Tainer J.A. Type IV pilin structure and assembly: X-ray and EM analyses of *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus and *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin. *Mol. Cell.* 2003; 11(5):1139–50. DOI: 10.1016/S1097-2765(03)00170-9.

7. Grunberg-Manago M. Messenger RNA Stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annu. Rev. Genet.* 1999; 33:193–227.

8. Kado C.I., Liu S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 1981; 145(3):1365–73.

9. Kiaie S., Abtahi H., Mosayebi G., Alikhani M.Y., Pakzad I. Recombinant toxin-coregulated pilus A (TcpA) as a candidate subunit cholera vaccine. *Iran. J. Microbiol.* 2013; 6(2):68–73.

10. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature.* 1970; 227(5259):680–5.

11. Matreja A., Kim D.W., Thomson N., Connor T.R., Lee J.H., Kariuki S. Evidence for multiple waves of global transmission within the seventh cholera pandemic. *Nature.* 2013; 477(7365):462–5. DOI: 10.1038/nature10392.

12. Molaee N., Mosayebi G., Amozande-Nobaveh A., Soleyman M.R., Abtahi H. Evolution of the immune response against recombinant proteins (TcpA, TcpB and FlaA) as a candidate subunit cholera vaccine. *J. Immunol. Res.* 2017;2412747. DOI: 10.1155/2017/2412747.

13. Price G.A., Holmes R.K. Immunizing adult female mice with a TcpA-A2-CTB chimera provides a high level of protection for their pups in the infant mouse model of cholera. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(12):e3356. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003356.

14. Rollenhagen J.E., Kalsy A., Cerda F., Manohar J., Harris J.B., LaRocque R.C., Qadri F., Calderwood S.B., Taylor R.K., Ryan E.T. Transcutaneous immunization with toxin-coregulated pilin A induces protective immunity against *Vibrio cholerae* O1 El Tor challenge in mice. *Infect. Immun.* 2006; 74:5834–9. DOI: 10.1128/IAI.00438-06.

15. Sun D., Lafferty M.J., Peek J.A., Taylor R.K. Domains within the *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilin subunit that mediate bacterial colonization. *Gene.* 1997; 192(1):79–85. DOI: 10.1016/S0378-1119(97)00007-3.

Authors:

Klavdienko E.V., Tuchkov I.V., Polunina T.A., Guseva N.P., Smirnova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Об авторах:

Клавдиенко Е.В., Тучков И.В., Полунина Т.А., Гусева Н.П., Смирнова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Поступила 22.05.17.

А.В.Комиссаров, М.В.Овчинникова, С.А.Бадарин, Д.Н.Бибиков, Н.В.Синицына, Н.И.Костылева,
И.А.Плотников

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ НОВОЙ ФОРМЫ ВЫПУСКА ХОЛЕРНЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СЫВОРОТОК

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

Цель исследования: экспериментальное обоснование возможности производства новой формы выпуска холерных диагностических сывороток – лиофилизат во флаконах. **Материалы и методы.** Холерные диагностические сыворотки. Лيوфилизацию проводили на установке Martin Christ Epsilon 2-6D. Остаточную влажность сухих сывороток определяли с использованием влагомера Sartorius MA 150. Определение растворимости экспериментальных образцов проводили визуально. pH определяли потенциометрически с использованием измерителя pH/ОВП/концентрации ионов/проводимости/концентрации PK SevenExcellence-475 Mettler Toledo. Специфическую активность и специфичность определяли в развернутой реакции агглютинации, используя соответствующие контрольные штаммы холерного вибриона. **Результаты и выводы.** Экспериментально обоснована возможность сублимационного высушивания холерных диагностических сывороток во флаконах. Определены оптимальные параметры лиофилизации. Установлено, что лиофилизация не приводит к ухудшению свойств холерных диагностических сывороток, так как по показателям качества они соответствуют требованиям нормативной документации. С использованием теста ускоренного старения показано, что новая форма выпуска холерных диагностических сывороток – лиофилизат во флаконах – сохраняет их специфическую активность в течение пяти лет (установленный срок годности), что полностью соответствует требованиям нормативной документации.

Ключевые слова: холерные диагностические сыворотки, лиофилизат, флаконы, стабильность.

Корреспондирующий автор: Комиссаров Александр Владимирович, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

A.V.Komissarov, M.V.Ovchinnikova, S.A.Badarin, D.N.Bibikov, N.V.Sinitsyna, N.I.Kostyleva, I.A.Plotnikov

Experimental Substantiation of New Presentation Form of Cholera Diagnostic Sera

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

Objective of the study is experimental substantiation of possibility to produce new presentation form of cholera diagnostic sera – lyophilizate in bottles. **Materials and methods.** Cholera diagnostic sera. Lyophilization was performed in Martin Christ Epsilon 2-6D. Residual moisture of dry sera was determined using humidity meter Sartorius MA 150. Solubility of experimental samples was assessed visually. pH was evaluated by potentiometry with the help of PK SevenExcellence-475 Mettler Toledo device, measuring pH/ORP/Ion content/conductivity/concentration. Specific activity and specificity was analyzed through expanded agglutination reaction, using relevant control strains of cholera vibrio. **Results and conclusions.** Experimentally justified is the possibility to lyophilize cholera diagnostic sera in flasks. Specified are the optimum parameters of lyophilization. It is determined that lyophilization does not result in deterioration of properties, as judging by the quality indicators they meet the requirements of regulatory documentation. Using accelerated aging test, it is demonstrated that the new presentation form of cholera diagnostic sera – lyophilizate in flasks – maintains their specific activity within five years term (the set out shelf life), which fully conform to normative standards.

Key words: cholera diagnostic sera, lyophilizate, flasks, stability.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Alexander V. Komissarov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Komissarov A.V., Ovchinnikova M.V., Badarin S.A., Bibikov D.N., Sinitsyna N.V., Kostyleva N.I., Plotnikov I.A. Experimental Substantiation of New Presentation Form of Cholera Diagnostic Sera. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 4:38–40. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-38-40

В РосНИПЧИ «Микроб» для идентификации *Vibrio cholerae* O1 серогруппы производятся пять наименований диагностических холерных сывороток для постановки реакции агглютинации: сыворотка диагностическая холерная O1 адсорбированная сухая, сыворотки диагностические холерные Огава и Инаба адсорбированные сухие, сыворотка диагностическая холерная RO адсорбированная сухая, сыворотка диагностическая холерная не O1 группы O139. Данные медицинские изделия производятся в лиофилизированной форме в ампулах.

Существующая технология предусматривает, в том числе, выполнение следующих технологических операций: замораживание разлитого в ампулы препарата в низкотемпературном холодильнике; перенос замороженного материала на полки сублимационной установки; непосредственно лиофилизация; герметизация ампул их запаиванием с использованием горючих газов (пропана, бутана, кислорода).

Во время выполнения вышеперечисленных стадий производственного процесса не исключено возникновение ситуаций, ухудшающих качество конеч-

ного продукта. Так, во время переноса замороженного материала на полки сублимационной установки может произойти его частичное оттаивание, приводящее к развитию коллапса и снижению активности сухого биопрепарата. При выгрузке ампул после лиофилизации и в процессе их запаивания может произойти контаминация образцов. При применении горючих газов для герметизации ампул, в случае их неконтролируемого выхода в производственные помещения, существует риск отравления персонала и возможного взрыва.

Предотвратить появление подобных ситуаций представляется возможным разработкой технологии лиофилизации холерных диагностических сывороток во флаконах на сублимационном сушильном оборудовании, позволяющем производить операции замораживания препарата и герметизации первичной упаковки непосредственно в камере лиофилизатора. Современный рынок предлагает достаточно широкий спектр такого оборудования [4].

Все вышеперечисленное определило перспективность экспериментального обоснования новой формы выпуска холерных диагностических сывороток в лиофилизированной форме во флаконах.

Материалы и методы

Лиофилизация экспериментальных образцов проводилась на сублимационной сушильной установке Martin Christ Epsilon 2-6D (Германия). Препараты четырех наименований сывороток разливали по 1 мл в пенициллиновые флаконы вместимостью 10 мл, закрывали специальными колпачками для лиофилизации и замораживали до минус 50 °С в камере сублимационной установки. Нагрев препаратов осуществляли таким образом, чтобы в процессе сушки показатель LyoRx, характеризующий электрическое сопротивление материала и контролируемый средствами измерения сушильной установки, не превышал 96–97 %. Данный методический прием успешно апробирован при оптимизации процесса сушки иммуногенов холерной химической вакцины [2]. Одновременно производили препараты по традиционной технологии.

Остаточную влажность определяли с использованием влагомера Sartorius MA 150 (Германия). Растворимость экспериментальных образцов оценивали визуально. Определение pH проводили потенциометрическим методом с помощью измерителя pH/ОВП/концентрации ионов/проводимости/концентрации PK SevenExcellence-475 Mettler Toledo. Специфическую активность и специфичность оценивали в развернутой реакции агглютинации, используя контрольные тест-штампы холерного вибриона. Растворимость лиофилизатов определяли путем растворения в 1 мл очищенной воды при встряхивании ампулы или флакона.

Для подтверждения срока годности экспериментальных образцов препаратов требованиям норма-

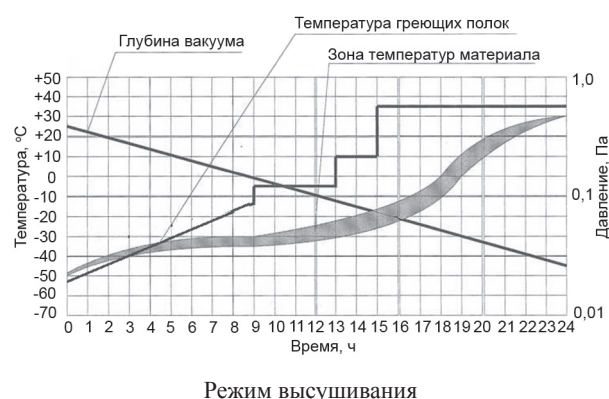
тивной документации применяли метод ускоренного старения, заключающийся в выдерживании испытуемого препарата при температурах, превышающих более чем на 10 °С температуру его хранения [3]. Данный метод успешно применен для установления срока годности отраслевого стандартного образца активности вакцины против краснухи [5] и стабилизированной формы альфа-интерферона [1].

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований по лиофилизации препаратов во флаконах определены параметры технологического процесса, показанные на рисунке. Выявлено отсутствие необходимости стадии досушивания (выдерживания материала при температуре 25–30 °С) в силу того, что высушенные препараты имели остаточную влажность от 0,4 до 0,8 % (при норме не более 2 %). Это приводило к снижению продолжительности процесса до 5 ч в сравнении с регламентной технологией.

Проведенный контроль основных характеристик диагностических холерных сывороток, изготовленных по традиционной и предлагаемой технологиям, выявил их подобие (таблица). Установлено, что растворимость лиофилизатов во флаконах не превышала 30 с (норма не более 10 мин). Кроме того следует отметить, что значения таких контролируемых показателей, как специфическая активность и pH аналогичны у всех четырех препаратов до и после их лиофилизации.

Соответствие срока годности экспериментальных образцов препаратов требованиям нормативной документации устанавливали, применяя метод ускоренного старения, при этом сыворотки выдерживали при температурах 37, 50 и 65 °С. Срок наблюдения составлял 30 сут. При хранении всех сывороток при температуре 37 °С снижения специфической активности не зафиксировано. Выдержка препаратов при температуре 50 °С выявила, что значение исследуемого показателя на 30-е сутки составляло 90 % от исходного. Хранение сывороток при температуре 65 °С дало следующие результаты: на 25-е сутки активность у всех препаратов снизилась на 10 %, на 30-е сутки зафиксировано снижение данного показателя



Сравнительная характеристика основных контролируемых показателей диагностических холерных сывороток, изготовленных по традиционной и предлагаемой технологии

Наименование препарата	Контролируемые показатели производственных серий			Контролируемые показатели экспериментальных серий		
	Специфическая активность, величина обратная разведению	pH	Потеря в массе при высушивании, %	Специфическая активность, величина обратная разведению	pH	Потеря в массе при высушивании, %
Сыворотка диагностическая холерная O1 адсорбированная сухая, для реакции агглютинации	≥1600 / 2000	7,2–8,8 / 8,4±0,2	≤2,0 / 0,64±0,2	≥1600 / 2000	7,2–8,8 / 8,5±0,3	≤2,0 / 0,8±0,1
Сыворотка диагностическая холерная RO адсорбированная сухая, для реакции агглютинации	≥800 / 1600	7,2–8,8 / 8,6±0,1	≤2,0 / 0,39±0,2	≥800 / 1600	7,2–8,8 / 8,5±0,2	≤2,0 / 0,42±0,2
Сыворотка диагностическая холерная Огава адсорбированная сухая, для реакции агглютинации	≥400 / 800	7,2–8,8 / 8,5±0,2	≤2,0 / 0,55±0,3	≥400 / 800	7,2–8,8 / 8,5±0,2	≤2,0 / 0,6±0,2
Сыворотка диагностическая холерная Инаба адсорбированная сухая, для реакции агглютинации	≥400 / 800	7,2–8,8 / 8,4±0,1	≤2,0 / 0,54±0,1	≥400 / 800	7,2–8,8 / 8,3±0,1	≤2,0 / 0,55±0,3

Примечание. В числителе приведены нормируемые значения показателей, в знаменателе – результаты контроля.

у сывороток O1 и RO до 70 % и у сывороток Инаба и Огава до 80 %.

По полученным данным, в соответствии с алгоритмом, предложенным Петуховым В.Г. [1], вычислили константы скорости инактивации K_T для каждого из препаратов, значения которых составили: для сывороток диагностических холерных O1 и RO – $4,57 \cdot 10^{-6}$; для сывороток диагностических холерных Огава и Инаба – $4,44 \cdot 10^{-6}$.

На заключительном этапе определили время хранения препаратов по формуле:

$$t = 2,303 \frac{\log \frac{100}{99}}{K_T},$$

где t – время хранения препаратов, K_T – скорость инактивации.

При допуске снижении активности не более чем на 1 % предполагаемое время хранения составило: для сывороток диагностических холерных O1 и RO – 2177 дней или 5,96 года; для сывороток диагностических холерных Огава и Инаба – 2263 дней или 6,2 года.

Учитывая, что нормируемый срок хранения каждой из сывороток составляет 5 лет, можно говорить о том, что примененные технологические процедуры позволяют получать препараты, соответствующие требованиям нормативных документов.

Таким образом, в результате проведенных исследований экспериментально обоснована новая форма выпуска холерных диагностических сывороток – лиофилизат во флаконах, проверена стабильность их свойств в тесте ускоренного старения, что позволяет приступить к этапу технических испытаний препаратов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Губайдуллина А.А., Бобкова Е.В., Мелентьев А.И. Метод ускоренного старения для прогнозирования срока годности стабилизированной формы альфа-интерферона. *Труды БГУ*. 2010; 4(2):1–6.
2. Комиссаров А.В., Кочкалова Н.Н., Синицына Н.В., Бадарин С.А., Костылева Н.И., Волох О.А., Клокова О.Д., Никифоров А.К. Исследование процесса сублимационного высушивания иммуногенов холерной химической вакцины. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 1:90–3. DOI: 10.21055/0307-1069-2016-1-90-93.
3. Петухов В.Г. Определение стабильности стандартных образцов ускоренным методом. *Биопрепараты. Профилактикт., диагн., лечение*. 2006; 4:5–8.
4. Технология лиофилизации – наука, искусство и люди, или как добиться безупречной лиофилизации. *Фармацевтические технологии и упаковка*. 2010; 4:72–3.
5. Юнасова Т.Н., Фадейкина О.В., Сидоренко Е.С., Суханова С.М., Шитикова О.Ю., Саркисян К.А., Ильясова Т.Н., Бинятова А.С., Терешкина Н.В., Устинникова О.Б., Волкова Р.А., Мовсесянц А.А., Шведов Д.В. Разработка и изучение отраслевого стандартного образца активности вакцины против краснухи. *Биопрепараты. Профилактикт., диагн., лечение*. 2015; 3(55):49–53.

References

1. Gubaidullina A.A., Bobkova E.V., Melent'ev A.I. [Method of accelerated aging for forecasting date of expiry of stabilized alfa-interferon]. *Works of Belorussian State University*. 2010; 4(2):1–6.
2. Komissarov A.V., Kochkalova N.N., Sinitsyna N.V., Badarin S.A., Kostyleva N.I., Volokh O.A., Klokova O.D., Nikiforov A.K. [Studies of freeze-drying of cholera chemical vaccine immunogens]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 1:90–3. DOI: 10.21055/0307-1069-2016-1-90-93.
3. Petukhov V.G. [Determination of stability of standard samples using acceleration method]. *Biopreparaty. Profilakt. Diagnost. Lechenie*. 2006; 4:5–8.
4. [Lyophilization technology – science, art and people, or how to achieve flawless lyophilization]. *Farmatsevt. Tekhnol. i Upakovka*. 2010; 4:72–3.
5. Yunasova T.N., Fadeikina O.V., Sidorenko E.S., Sukhanova S.M., Shitikova O.Yu., Sarkisyan K.A., Il'yasova T.N., Binyatova A.S., Tereshkina N.V., Ustinnikova O.B., Volkova R.A., Movsesyants A.A., Shvedov D.V. [Development and studies of departmental standard sample of rubella vaccine activity]. *Biopreparaty. Profilakt. Diagnost. Lechenie*. 2015; 3(55):49–53.

Authors:

Komissarov A.V., Ovchinnikova M.V., Badarin S.A., Bibikov D.N., Sinitsyna N.V., Kostyleva N.I., Plotnikov I.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Комиссаров А.В., Овчинникова М.В., Бадарин С.А., Бибииков Д.Н., Синицына Н.В., Костылева Н.И., Плотников И.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Получена 05.04.17.

А.А.Кузнецов¹, А.М.Поршаков¹, А.Н.Матросов¹, А.А.Лопатин²

ПРИМЕНЕНИЕ ГИС-ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГРАНИЦ И ПЛОЩАДЕЙ ЭПИЗООТИЧЕСКИХ УЧАСТКОВ В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ ЧУМЫ

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов;²ФКУЗ «Противочумный центр», Москва, Российская Федерация

Пространственные параметры эпизоотий в природных очагах чумы используют для обоснованного планирования и проведения комплекса профилактических мероприятий по обеспечению эпидемиологического благополучия населения, проживающего на энзоотичной территории. Параметры пораженных чумой участков определяют по реальным географическим координатам эпизоотических точек. **Цель исследования.** Разработка цифровых методов определения границ и площади эпизоотического участка по результатам эпизоотологического мониторинга. **Материалы и методы.** В работе использовали цифровые карты природных очагов чумы, данные о размещении эпизоотических точек, компьютерное программное обеспечение. **Результаты и выводы.** С помощью компьютерного приложения «ArcGIS 10.x» создавали буферные зоны вокруг каждой эпизоотической точки в виде окружностей радиусом 5 км как цифровой аналог метода круговой экстраполяции. Итоговый эпизоотический участок за конкретный сезон образовывался из нескольких налегающих друг на друга окружностей. Оценке подлежали протяженность и площадь участка, а также наличие в его пределах эпидемиологически важных объектов. Фактическое расположение участка, визуализируемое на карте очага, используют для постановки конкретных задач по проведению различных профилактических мероприятий в той или иной его части.

Ключевые слова: природный очаг чумы, эпизоотический участок, ГИС-картографирование.

Корреспондирующий автор: Кузнецов Александр Александрович, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

A.A.Kuznetsov¹, A.M.Porshakov¹, A.N.Matrosov¹, A.A.Lopatin²

Application of GIS Technologies for Determination of Boundaries and Area of Epizootic Regions within Natural Plague Foci

¹Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; ²Plague Control Center, Moscow, Russian Federation

Spatial indicators of epizooties in natural plague foci are used for justified planning and carrying out measures on epidemiological welfare provision for the population residing in enzootic territories. Plague affected regions are identified by real geographical coordinates of epizootic sites. **Objective** of the study is to develop numerical methods for determination of boundaries and area of epizootic regions according to the results of epizootiological monitoring. **Materials and methods.** Utilized are the digital maps of the natural plague foci, the data on epizootic points, and computer software. **Results and conclusions.** Buffer zones in the form of circumference of 5 km radius were established around each epizootic point with the help of computer application "ArcGIS 10.x" as a counterpart of circular extrapolation method. Resultant epizootic region over a certain season was generated by several overlapping circumferences. Evaluated were the area and extension of the region, as well as the presence of epidemiologically significant objects within its bonds. Actual positioning of the region, visualized on the focus map, is used for specified task assignment as regards carrying out of various preventive measures in this or that part of the area.

Key words: natural plague focus, epizootic region, GIS-mapping.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Alexander A. Kuznetsov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Kuznetsov A.A., Porshakov A.M., Matrosov A.N., Lopatin A.A. Application of GIS Technologies for Determination of Boundaries and Area of Epizootic Regions within Natural Plague Foci. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 4:41–44. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-41-44

Оценка пространственных параметров эпизоотий чумы, регистрируемых в природных очагах этой инфекции, необходима для обоснованного планирования и проведения комплекса профилактических мероприятий по обеспечению эпидемиологического благополучия населения, проживающего в зоне эпизоотии или находящегося там временно. В этих целях противочумные учреждения осуществляют регулярный эпизоотологический мониторинг закрепленных за ними энзоотичных территорий. Положительным результатом мониторинга служит обнаружение за-

раженных чумным микробом носителей (грызунов и других мелких млекопитающих) и/или переносчиков (блох, клещей и других кровососущих членистоногих). Важнейшим условием регистрации факта выявления возбудителя является точное указание координат (широты и долготы) места обнаружения зараженных животных. В практике мониторинга эти места принято называть эпизоотическими точками. Территория, на которой происходит циркуляция возбудителя в популяциях носителей и переносчиков, называется эпизоотическим участком. Во время и

по завершении обследовательского сезона, который продолжается в течение всего периода обострения эпизоотического процесса (1–2, реже 3 месяца), определяют конфигурацию и площадь территории, где этот процесс протекает. По сути, нанесение эпизоотических точек и участков на карту следует оценивать как элемент картографирования очаговых территорий. Если при этом используются цифровые карты и технологии, то это уже элемент ГИС-картографирования.

Одной из важнейших характеристик эпизоотического участка является дислокация его границ. Однако именно правила проведения границ участка на карте природного очага всегда являлись наименее разработанными в теоретическом плане. Обычно такой границей служила линия, соединяющая крайние эпизоотические точки, хотя количественные критерии такого соединения однозначно никогда не определялись. Проблема ограничения эпизоотических участков наиболее остро стоит для обширных равнинных очагов чумы, где трудно вычленить отдельные поселения или популяции носителей возбудителя. В горных очагах, где участки обитания соответствующих животных-носителей легко оконтурить по ландшафтному и орографическим критериям, проблема решается поиском зараженных животных в конкретных поселениях и приданием статуса эпизоотического участка всему такому поселению с установленными границами и площадью. В настоящее время необходимо провести крупномасштабное ландшафтно-эпизоотологическое ГИС-картографирование высокогорных очагов чумы Кавказа, Горного Алтая и Тувы на современной топографической основе.

Для пространственного анализа эпизоотических проявлений в равнинных очагах чумы наиболее приемлемым, на наш взгляд, является разработанный нами способ круговой экстраполяции по каждой точке с положительным на чуму результатом [1, 2, 4]. При этом способе каждая эпизоотическая точка получает статус «центра» определенного участка местности, где в популяциях норовых млекопитающих и их эктопаразитов мог циркулировать возбудитель. Сложность однозначной оценки реальных (топологических) критериев ограничения элементарного эпизоотического участка в конкретных и весьма разнообразных условиях природного очага чумы вынуждает использовать формализованный вариант его границы в виде стандартной окружности. Важным обстоятельством является определение радиуса этой окружности, соответствующего средним параметрам пространственной реализации эпизоотического процесса в период его обострения. Предлагаемый радиус экстраполяции величиной в 5 км достаточно условен, но приблизительно соответствует среднему расстоянию между точками эпизоотологического обследования в течение одного сезона и не противоречит представлениям о размерах поселений и дистанциях беспрепятственных

паразитарных контактов зверьков между собой. Контакты могут быть как прямыми, так и многоэтапными эстафетными. Несколько эпизоотических кругов, все или часть из которых могут соприкасаться и перекрываться, образуют общий эпизоотический участок за конкретный год (сезон), представленный либо единым территориальным массивом, либо областью, разделенной на несколько изолированных фрагментов.

Материалы и методы

В данном сообщении более подробно рассмотрено использование метода круговой экстраполяции в программной среде географических информационных систем (ГИС). Оработка методических приемов проведена с помощью приложения ArcGIS 10.x на материалах эпизоотии чумы среди носителей и переносчиков в Прикаспийском песчаном очаге за весну 2014 г. [3].

Все манипуляции с эпизоотическими участками проводили на интерактивной электронной карте, имеющейся на сервере ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» и представленной в специализированном веб-приложении. В процессе эпизоотологического мониторинга на электронную карту наносили эпизоотические точки по координатам (широта и долгота), получаемым с помощью приемников спутниковых сигналов (навигаторов) непосредственно на местах сбора полевого материала.

Результаты и выводы

Очерчивание границ эпизоотического участка за конкретный сезон или год заключалось в построении окружностей (буферных зон) с помощью инструмента «Буфер», с центрами в точках с положительными результатами. Буферная зона (buffer zone) – это область, находящаяся внутри окружности заданного радиуса. В ГИС-приложениях буферная зона представляет собой векторный полигон (vector polygon), охватывающий в нашем случае точечный объект. Буферное расстояние (радиус) определяется в любых единицах измерения в масштабе карты. Радиус буферной зоны, построенной вокруг эпизоотической точки, равен 5 км. При построении буферных зон выбирали тип их слияния (None, All, List), что определяет, будет ли выполнено слияние с удалением внутренних границ перекрывающихся зон или с сохранением полных окружностей всех зон, независимо от наложения. В тех случаях, когда буферные зоны выходят за известные границы природного очага чумы, выступающие части полигона следует удалять. В процессе буферизации создавали слой для каждого анализируемого эпизоотического периода (сезона).

Эпизоотический участок весны 2014 г. в Прикаспийском песчаном очаге чумы, сформировавшийся в результате слияния перекрывающихся об-

ластей (All), оказался разделенным на восемь фрагментов, крайние из которых удалены друг от друга на 90–120 км, а их суммарная площадь составила 1235 км² (рис. 1).

Площадь выявленного эпизоотического участка (как сумма отдельных его фрагментов) измерена с помощью инструмента «Измерить объект», запускаемого на панели инструментов. В открывшемся окне выбрано действие «Измерить площадь полигонального объекта» (+) и по щелчку левой кнопкой мыши внутри измеряемого полигона получен результат измерения в автоматическом режиме, отображаемый в том же окне (рис. 1).

В практике работы противочумных учреждений оперативное определение величины эпизоотического участка осуществляется приближенно по сумме условных площадей секторов, где обнаружен возбудитель, приравниваемых к 100 км². Для объективного сравнения и оценки различий, получаемых разными методами, значений мы здесь приводим формализованную площадь эпизоотического участка, разместившегося на 15 секторах, равную 1365 км² при использовании реальных размеров секторов (рис. 1). Площадь участка, получаемая при округлении площади сектора, составляет 1500 км². Такой упрощенный подсчет традиционно применяется как для ускоренной (предварительной), так и для окончательной оценки размеров пораженных чумой территорий.

Различия результатов измерения площадей не критичны, что не препятствует применению формально-территориального способа для экстренного определения площадей эпизоотических участков при оперативном эпизоотологическом обследовании даже при использовании округленного (стандартного) размера сектора. Теоретически же раз-

личия формализованной и буферной оценок могут оказаться более существенными, причем как в одну, так и в другую сторону. Покажем это на следующем гипотетическом примере, где форма и размер эпизоотического участка поставлены в зависимость от дислокации мест выявления возбудителя (рис. 2).

На рис. 2, А показано значительное превышение формализованного участка над буферным, а рис. 2, Б – значительная недооценка формализованного участка. Хотя в реальных условиях столь различающиеся варианты дислокации эпизоотических точек маловероятны, мы все же рекомендуем в практических целях всегда применять метод круговой экстраполяции, обеспечивающий организацию экстренных профилактических мероприятий на объективной основе.

Практические цели достигаются следующим образом: при обнаружении эпизоотии чумы на территории природного очага, помимо установления эпизоотического участка на основе кругов с 5-километровым радиусом, определяют дислокацию более широкого участка экстренной профилактики без измерения его площади. Для этого вокруг всех выявленных эпизоотических точек очерчивают окружности радиусом 10 км. В этом случае реализуется давно существующее правило проводить барьерные обработки против носителей и переносчиков возбудителя вокруг населенных пунктов, расположенных на удалении до 10 км от эпизоотических точек, а также поселковую дератизацию в них. Следовательно, все жилые объекты, попавшие в буферные зоны с 10-километровым радиусом, подлежат защитным обработкам по типу экстренных профилактических мероприятий (рис. 3). Все эти манипуляции можно проводить на интерактивной цифровой карте, являющейся компонентом электронного паспорта природного очага чумы, на практике реализуя использование ГИС-технологий в противоэпидемической работе. Просмотр эпизоотических и профилактических участков следует вести в наиболее крупном доступном масштабе, чтобы избежать пропуска мелких населенных пунктов, подлежащих профилакти-

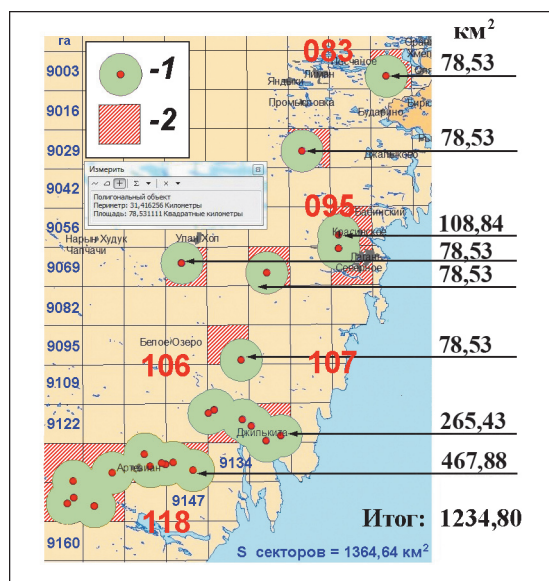


Рис. 1. Фрагментированный эпизоотический участок в Прикаспийском песчаном очаге чумы весной 2014 г.:

1 – места обнаружения возбудителя чумы и эпизоотические участки; 2 – сектора, в которых обнаружен возбудитель

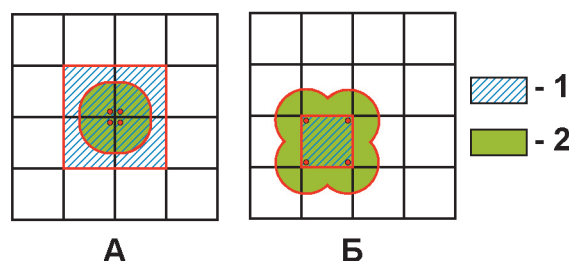


Рис. 2. Зависимость различий в оценке размера эпизоотического участка от гипотетического расположения четырех точек с положительными результатами:

А – превышение формализованного участка над буферным; Б – значительная недооценка формализованного участка при определении границ участка формально-территориальным способом (1) и методом круговой экстраполяции (2)

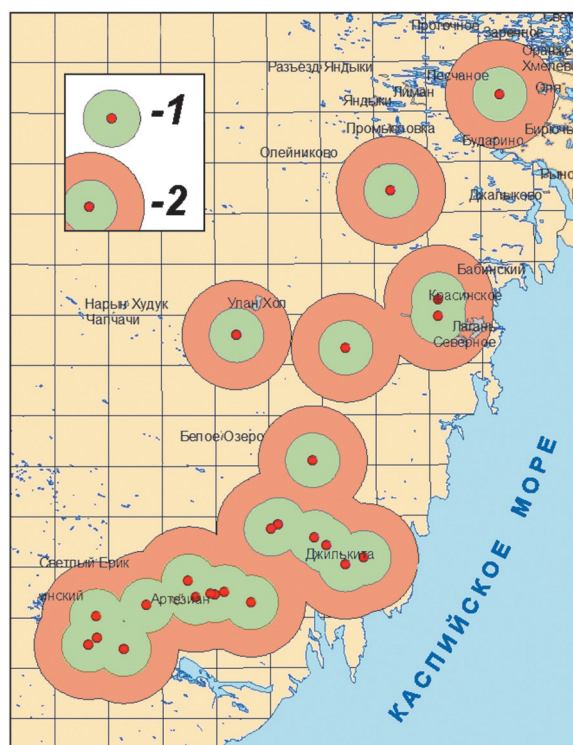


Рис. 3. Формирование профилактического участка методом круговой экстраполяции в радиусе 10 км на примере весенней эпизоотии чумы 2014 г. в Прикаспийском песчаном очаге:

1 – эпизоотические точки и участки; 2 – территории, где проводят экстренные профилактические мероприятия

ческим обработкам. Необходимость полноценного проведения экстренных профилактических мероприятий повышает также роль эпидемиологического картографирования.

Возможности пространственного анализа складывающейся эпизоотической ситуации средствами ГИС на основе метода круговой экстраполяции по своей оперативности, точности и наглядности не оставляют никакой альтернативы другим способам анализа. Поэтому считаем целесообразным закрепить представленную методику в нормативно-методических документах, регламентирующих профилактические противочумные мероприятия.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кузнецов А.А., Кутырев В.В., Матросов А.Н., Топорков В.П. Совершенствование мониторинга за природными очагами чумы на основе анализа эколого-эпизоотологических закономерностей их функционирования. *Пробл. особо опасных инф.* 2004; 2(88):12–6.
2. Кузнецов А.А., Поршаков А.М., Матросов А.Н., Синцов В.К., Осипов В.П., Санджиев В.Б.-Х., Слудский А.А. Дифференциация Прикаспийского песчаного очага чумы по кратности эпизоотических проявлений. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 3(113):15–9.
3. Матросов А.Н., Синцов В.К., Манджиева В.С., Голосовский С.М., Ким Т.С., Лещук В.А., Кузнецов А.А., Поршаков А.М., Яковлев С.А., Удовиков А.И., Лейнерт А.Ю., Чекашов В.Н., Шилов М.М., Шарова И.Н., Куклев В.Е., Казорина Е.В., Гражданов А.К., Лопатин А.А., Скаленко С.Ю., Князева Т.В., Троицкая А.А., Давыдова Т.П., Агапов Б.Л., Кабин В.В., Санджиев В.Б.-Х., Яшкуллов К.Б., Халидов А.Х., Хасаев С.М., Бамматов Д.М., Попов Н.В., Кутырев В.В. Условия активизации эпизоотий чумы в Прикаспийском песчаном природном очаге в 2014 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2015; 4:30–5.
4. Поршаков А.М., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Булычев В.П., Ларин В.В. Дифференциация Волго-Уральского песчаного очага чумы по кратности эпизоотических проявлений методом круговой экстраполяции. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 4:33–6.

References

1. Kuznetsov A.A., Kutyrev V.V., Matrosov A.N., Toporkov V.N. [Improvement of monitoring of natural plague foci based on the analysis of ecologic and epizootologic regularities of their functioning]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2004; 2(88):12–5.
2. Kuznetsov A.A., Porshakov A.M., Matrosov A.N., Sintsov V.K., Osipov V.P., Sandzhiev V.B.-Kh., Sludsky A.A. [Differentiation of the Pre-Caspian sandy plague foci on the basis of the frequency of epizootic manifestations]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 3(113):15–9.
3. Matrosov A.N., Sintsov V.K., Mandzhieva V.S., Golosovsky S.M., Kim T.S., Leshchuk V.A., Kuznetsov A.A., Porshakov A.M., Yakovlev S.A., Udovikov A.I., Leinert A.Yu., Chekashov V.N., Shilov M.M., Sharova I.N., Kuklev V.E., Kazorina E.V., Grazhdanov A.K., Lopatin A.A., Skalenko S.Yu., Knyazeva T.V., Troitskaya A.A., Davydova T.P., Agapov B.L., Kabin V.V., Sandzhiev V.B.-Kh., Yashkullov K.B., Khalidov A.Kh., Khasaev S.M., Bammатов D.M., Popov N.V., Kutyrev V.V. [Factors that predetermined activation of plague epizooties in the Pre-Caspian sandy natural focus in 2014]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2015; 4:30–5.
4. Porshakov A.M., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Bulychyev V.P., Larin V.V. [Volga-Ural sandy plague focus differentiation against epizootic manifestations by means of circular extrapolation]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 4:33–6.

Authors:

Kuznetsov A.A., Porshakov A.M., Matrosov A.N. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Lopatin A.A. Plague Control Center. 4, Musorgskogo St., Moscow, 127490, Russian Federation. E-mail: protivochym@nln.ru.

Об авторах:

Кузнецов А.А., Поршаков А.М., Матросов А.Н. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Лопатин А.А. Противочумный центр. Российская Федерация, 127490, Москва, ул. Мусоргского, 4. E-mail: protivochym@nln.ru.

Получила 13.04.17.

Пробл. особо опасных инф. 2017; 4:45–49. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-45-49

УДК 616.98:579.842.23(597)

Л.М.Куклева, К.А.Никифоров, Ж.В.Альхова, Н.И.Романов, Н.Ю.Носов, А.В.Фадеева,
А.Н.Малахаева, Н.А.Шарапова, З.Л.Девдариани, Ю.А.Попов, Г.А.Ерошенко

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ, ВЫДЕЛЕННЫХ ВО ВЬЕТНАМЕ

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

Цель работы состояла в изучении фенотипических, молекулярно-генетических особенностей и полногеномном секвенировании штаммов *Y. pestis*, выделенных во Вьетнаме. **Материалы и методы.** В работе изучены фенотипические и генотипические особенности 20 штаммов возбудителя чумы, выделенных в разных провинциях Вьетнама. Проведен SNP-анализ этих штаммов, секвенированы геномы 8 штаммов *Y. pestis*. **Результаты и выводы.** По результатам изучения дифференциальных биохимических признаков все изученные штаммы отнесены к восточному биовару основного подвида возбудителя чумы, что подтверждено наличием маркерной для восточного биовара indel мутации – делеции размером 93 п.н. в гене *glpD*. Изучен плазмидный состав штаммов. На основании проведенного секвенирования геномов и SNP-анализа установлена принадлежность 19 из 20 изученных штаммов к филогенетической линии 1.ORI2v, родственной штаммам, выделенным в провинции Юньнань в Китае, что свидетельствует об их общем происхождении. Найден маркерный SNP и разработан способ SNP-типирования штаммов 1.ORI2v из Вьетнама.

Ключевые слова: возбудитель чумы, очаги чумы Вьетнама, штаммы, филогения.

Корреспондирующий автор: Куклева Любовь Михайловна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

L.M.Kukleva, K.A.Nikiforov, Zh.V.Al'khova, N.I.Romanov, N.Yu.Nosov, A.V.Fadeeva, A.N.Malakhaeva,
N.A.Sharapova, Z.L.Devdariani, Yu.A.Popov, G.A.Eroshenko

Molecular-Genetic and Phenotypic Peculiarities of Plague Agent Strains Isolated in Vietnam

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

Objective of the study is to investigate phenotypic and molecular-genetic features and perform whole genome sequencing of *Y. pestis* strains isolated in Vietnam. **Materials and methods.** Studied were phenotypic and genotypic peculiarities of 20 plague agent strains isolated in different prefectures of Vietnam. Carried out was SNP-analysis of the strains, sequenced were genomes of 8 *Y. pestis* strains. **Results and conclusions.** Based on the results of studies of differential biochemical characteristics all the investigated strains were attributed to oriental biovar of the main subspecies of plague agent, which was confirmed by the presence of marker indel mutation – deletion of 93 bps in *glpD* gene. Investigated was also the plasmid composition of the strains. On the basis of the conducted genome sequencing and SNP-analysis appurtenance of 19 out of 20 strains under examination was determined. They belong to 1.ORI2v phylogenetic branch, relative to the strains isolated in Yunnan Province, China, which points to their common origin. Identified was a marker SNP and developed the method of SNP-typing for 1.ORI2v strains from Vietnam.

Key words: plague agent, plague foci of Vietnam, strains, phylogeny.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Lubov M. Kukleva, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'khova Zh.V., Romanov N.I., Nosov N.Yu., Fadeeva A.V., Malakhaeva A.N., Sharapova N.A., Devdariani Z.L., Popov Yu.A., Eroshenko G.A. Molecular-Genetic and Phenotypic Peculiarities of Plague Agent Strains Isolated in Vietnam. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 4:45–49. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-45-49

Третья пандемия чумы началась в Китае в провинции Юньнань в 1855 г. и к концу XIX – началу XX веков охватила более 80 крупнейших морских и речных портов мира, а во многих странах проникла вглубь континентов [11]. Хотя Вьетнам имеет на севере границу с провинцией Юньнань в Китае, все же предполагается, что во Вьетнам возбудитель чумы попал морским путем с синантропными крысами. Впервые чума была зарегистрирована во Вьетнаме в 1898 г. в порту г. Нячанга. Далее происходило распространение чумы вдоль морского побережья и закрепление ее в глубинных районах страны [11, 18]. В 1943 г. возбудитель проник вглубь страны на плато

Тайнгуен, расположенном в центральном высокогорном районе.

Особенностью чумы во Вьетнаме было проявление болезни в виде спорадических случаев или острых кратковременных вспышек, причем в подавляющем большинстве случаев болезнь протекала в бубонной форме. Редко отмечали вторично-легочную и септическую формы. Вспышки чумы во Вьетнаме регистрировали с некоторыми перерывами с 1898 по 2002 год [2, 5]. Случаи легочной чумы отмечали в 1911, 1915, 1925 и 1965 гг. [5, 18]. В северной части страны спорадические заболевания и вспышки чумы отмечали с 1909 по 1922 год. После 1922 г. информации о новых

заболеваниях на севере страны не поступало.

С 1997 по 2002 год в стране зарегистрировано 472 случая заболевания чумой, из которых 24 (5,1 %) – летальные. В это время основной очаг чумы был в Центральном высокогорном районе [16]. Пики заболеваемости наблюдали во время сухих сезонов, 63 % случаев происходило с февраля по апрель. Начиная с 2003 г. данные о заболеваемости чумой во Вьетнаме отсутствуют.

Изучение чумных эпизоотий во Вьетнаме позволило сделать заключение, что очаги чумы Вьетнама относятся к антропогенным, сформировавшимся в населенных пунктах в процессе хозяйственной деятельности людей. Сельскохозяйственная зона вокруг населенных пунктов является тем местом, где может происходить перенос возбудителя блохами *Xenopsylla cheopis* из популяции синантропных крыс диким млекопитающим [7].

Штаммы возбудителя чумы, изолированные на территории Вьетнама, принадлежат к восточному биовару основного подвида *Y. pestis*, к филогенетической ветви 1.ORI, которая появилась более 200 лет назад. Ветвь 1.ORI получила широкое распространение в результате многочисленных независимых волн иррадиации во время третьей пандемии чумы [14]. В процессе эволюции ветвь 1.ORI, ведущая свое начало от более древней ветви античного биовара 1.ANT, разделилась на три подветви: 1.ORI1, 1.ORI2 и 1.ORI3. Штаммы 1.ORI1 достигли США. Штаммы 1.ORI2 посредством множественных иррадиаций достигли Европы, Южной Америки, Африки, Юго-Восточной Азии. Третья подветвь 1.ORI3 сформировалась на о. Мадагаскар. Недавно было высказано предположение, что ветвь античного биовара 1.ANT во время второй пандемии чумы «Черная смерть» могла прокатиться по Европе до Азии и дать начало штаммам *Y. pestis* 1.ORI, вызвавшим текущую пандемию чумы [17].

Отличительной особенностью штаммов восточного биовара является отсутствие у них ферментации глицерина, что вызвано делецией в гене *glpD* глицерол-3-фосфатдегидрогеназы [15]. Следует отметить, что есть сведения о выделении на территории Вьетнама штаммов, ферментирующих глицерин, а также лишенных денитрифицирующей активности [2, 3, 6]. При изучении питательных потребностей вьетнамских штаммов установлено, что, помимо потребностей в фенилаланине, метионине и цистеине, характерных для подавляющего большинства штаммов основного подвида, они дополнительно нуждаются в глицине, аргинине и валине [2, 6]. Для вьетнамских штаммов *Y. pestis* свойственна высокая вирулентность: LD₅₀ для белых мышей составляла от 3 до 32 КОЕ, для морских свинок – 10⁶ КОЕ [2]. Показано, что эти штаммы имеют типичный плазмидный состав, хотя у ряда изолятов выявлены криптические плазмиды различной молекулярной массы [9, 10]. A.Guiyoule *et al.* [12] установили принадлежность штаммов к двум разным риботипам. Штаммы,

выделенные до 1956 г., имели риботип E, а более поздние изоляты (1963–1996 гг.) принадлежали риботипу G независимо от региона и источника выделения (человек, грызуны, блохи). Авторы высказали предположение, что наличие двух различных риботипов у этих штаммов может свидетельствовать о нескольких эпидемических этапах распространения инфекции.

Для оценки степени генетического родства штаммов возбудителя чумы, выделенных на территории Вьетнама в 1985–1987 гг., проведено изучение их генетического полиморфизма методом MLVA [8]. Штаммы исследовали по девяти VNTR-локусам и выявили наличие среди них 16 геновариантов. Полученные данные послужили основанием для предположения о близком родстве штаммов, вызвавших эпизоотию синантропных грызунов и болезни людей во Вьетнаме в 1985–1987 гг.

В целом сведения о генетических и фенотипических особенностях штаммов *Y. pestis* из Вьетнама остаются фрагментарными. В международных генетических базах данных отсутствуют полногеномные последовательности штаммов *Y. pestis* из Вьетнама, что значительно осложняет проведение филогенетического анализа этих штаммов.

Цель настоящей работы состояла в изучении фенотипических, молекулярно-генетических особенностей и полногеномном секвенировании штаммов *Y. pestis*, выделенных во Вьетнаме.

Материалы и методы

В работе изучено 20 штаммов *Y. pestis*, выделенных в 1964–1988 гг. на территории Вьетнама. Все штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб», где их хранили в лиофильно высушенном состоянии. Культивирование штаммов проводили в бульоне и на агаре LB (pH 7,2) при 28 °C в течение 24–48 ч.

Изучение культурально-морфологических и биохимических свойств штаммов, а также признаков, ассоциируемых с вирулентностью возбудителя чумы (пигментсорбция, зависимость от ионов Ca²⁺ при 37 °C), проводили в соответствии с методами лабораторной диагностики возбудителя чумы [4]. Плазмидный состав определяли по методу C.Kado, S.Liu [13].

Выделение ДНК штаммов осуществляли с помощью набора AxyPrep bacterial genomic DNA kit (AXYGEN Biosciences, China) по инструкции производителя. Секвенирование ПЦР-фрагментов штаммов *Y. pestis* выполняли на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500XL (Applied Biosystems, США). Полногеномное секвенирование проводили в системе Ion PGM System (Life technologies, США). Обработку данных полногеномного секвенирования осуществляли с помощью пакета программ Ion Torrent Suite software версии 5.2 и Newbler gsAssembler версии 2.6. В анализ брали нуклеотидные последо-

вательности штаммов с не менее чем 30-кратной средней глубиной прочтения.

Полногеномный SNP-анализ и поиск маркерных SNPs осуществляли в программе Wombac 2.0 на базе операционной системы BioLinux 8.0. Специфичность найденных мишеней определяли при помощи алгоритма BLAST по базе данных полногеномных последовательностей NCBI GenBank. Расчет праймеров на специфические SNPs проводили, используя программу Vector NTI v.10. Построение филогенетических деревьев по алгоритму Maximum Likelihood выполняли в программе PhyML 3.1. с использованием модели HKY85. Визуализацию результатов построения осуществляли в программе FigTree 1.4.3.

Результаты и обсуждение

Фенотипические особенности штаммов *Y. pestis*. Всего в работе использовано 20 штаммов, выделенных в 1964–1988 гг. на территории Вьетнама. Изученные штаммы выделены преимущественно от людей и грызунов, а также от блох в провинциях Южного Вьетнама (Кхань Хоа, Дак Лак, Лам Донг, Кыу Лонг, Донг Най) и г. Хошимин (таблица).

Для всех использованных в работе штаммов *Y. pestis* получена характеристика по дифференциальным биохимическим признакам, что позволило определить их систематическую принадлежность в соответствии с используемыми фенотипическими схемами классификации. У всех изученных штаммов выявлено отсутствие способности к ферментации рамнозы и глицерина. Эти данные, наряду с наличием у изученных штаммов *Y. pestis* денитри-

фицирующей активности, свидетельствуют об их принадлежности к восточному биовару основного подвида. Среди изученных штаммов не выявлено изолятов, способных к ферментации глицерина и лишенных денитрифицирующей активности. У всех исследованных штаммов установлена зависимость роста от ионов кальция при 37 °С (кроме штаммов *Y. pestis* P-13229 и 78054) и способность к синтезу пестицина (за исключением штамма 78054). Все штаммы были также способны к формированию пигментированных колоний на среде с геминном, хотя гетерогенность популяций исследованных изолятов по признаку пигментсорбции варьировала от 10 до 100 % клеток. Таким образом, определение факторов вирулентности методами *in vitro* подтвердило вирулентность вьетнамских штаммов, за исключением двух изолятов, которые могли утратить признак кальцийзависимости, кодируемый плазмидой pCad, в процессе их хранения.

Генетические особенности штаммов *Y. pestis*. Для подтверждения принадлежности изученных штаммов к восточному биовару проведено определение наличия у них маркерной *indel* мутации – делеции размером 93 п.н. в гене *glpD* глицерол-3-фосфатдегидрогеназы с использованием ранее рассчитанных праймеров [1]. Выявление маркерной делеции в гене *glpD* у всех изученных нами штаммов подтвердило их принадлежность к восточному биовару.

При изучении плазмидного состава вьетнамских штаммов возбудителя чумы установлено, что подавляющее большинство из них (85 %) содержали три типичные для возбудителя чумы плазмиды – pFra (синтез капсульного антигена и мышино-

Штаммы возбудителя чумы из Вьетнама, изученные в работе

Штамм	Источник, год выделения	Филогенетическая принадлежность
P-14720 [P-27]	Человек (бубон), г. Хошимин, 7 р-н, 1989	1.ORI2v
Saigon 64-1198	Получен от проф. А. Молляре, 1964	1.ORI2v
78046	Провинция Лам Донг, г. Далат, 1977	1.ORI2v
KM 751 (79005)	Человек, провинция Лонг Ань, 1978	1.ORI2v
78054	Человек, Тхан Най, 1978	1.ORI2v
79052	Человек, г. Хошимин, 11 р-н, 1979	1.ORI2v
KM761 (76RR)	Черная крыса (<i>R. rattus</i>), провинция Донг Най, Ан Кунс, 1981	1.ORI1
164A	Человек, провинция Донг Най, деревня Онг, 1981	1.ORI2v
KM 715 (R.ex. 490)	Малая крыса (<i>R. exulans</i>), провинция Донг Най, Куби, 1981	1.ORI2v
371	Человек, провинция Донг Най, Ан Кунс, 1981	1.ORI2v
XC 84	Блоха <i>X. cheopis</i> , 1981	1.ORI2v
129 (745)	Человек (бубон), г. Хошимин, 6 р-н, 1981	1.ORI2v
203 (706)	Человек (бубон), Гекуан, 1981	1.ORI2v
C-453	Малая крыса (<i>R. exulans</i>), г. Хошимин, 6 р-н, 1981	1.ORI2v
RN 69	Серая крыса (<i>R. norvegicus</i>), 1981	1.ORI2v
P-13229	Малая крыса (<i>R. exulans</i>), провинция Кхань Хоа, г. Нячанг, 1985	1.ORI2v
P-13226	Человек, провинция Кхань Хоа, уезд Камрань, 1985	1.ORI2v
P-13273 [Tn770]	Человек, провинция Дак Лак, плато Тай Нгуен, 1986	1.ORI2v
140 Dalat	Провинция Лам Донг, г. Далат	1.ORI2v
P-14713 [C-778]	Серая крыса (<i>R. norvegicus</i>), провинция Кыу Лонг, 1988	1.ORI2v

токсина), pCad (синтез V-антигена, белков YOPs) и pPst (синтез пестицина и активатора плазминогена). Исключение составил штамм *Y. pestis* KM761, лишенный плазмиды pFra, и штаммы P-13229 и 78054, у которых отсутствовала плазида pCad. В штамме *Y. pestis* 78054 отсутствовала также плазида пестициногенности. Утрата плазмид коррелирует с отсутствием фенотипических признаков, детерминируемых этими репликационными.

Для установления филогенетического положения штаммов из Вьетнама нами проведено полногеномное секвенирование восьми из 20 исследованных штаммов – *Y. pestis* 78046, KM751, 78054, KM761, C-453, P-13229, P-13226 и P-13273, выделенных в разных провинциях Вьетнама в период 1977–1986 гг. преимущественно от больных людей, а также от крыс. В филогенетический анализ при построении дендрограммы включены также 22 штамма восточного биовара из различных регионов мира, полногеномные последовательности которых находятся в NCBI GenBank (рисунок).

Как следует из полученной дендрограммы, семь из восьми секвенированных штаммов вошли в подветвь 1.ORI2 восточного биовара, образовав в ней собственный подкластер, отдельный от других штаммов ветви 1.ORI2. Мы обозначили эту отдельную популяцию восточного биовара как 1.ORI2v (Vietnam). Еще один исследованный штамм – *Y. pestis* KM761, выделенный в провинции Донг Най в 1981 г., вошел в подветвь 1.ORI1 вместе со штаммом India 195, нуклеотидная последовательность которого представлена в базе данных NCBI GenBank.

Для выяснения филогенетической принадлежности остальных взятых в исследование 12 штаммов из Вьетнама нами проведен поиск полиморфных нуклеотидов и найден SNP, маркерный для штаммов популяции 1.ORI2v. Выявленный SNP расположен в

гене YPO1896 (G → A в позиции 2133712 по геному референтного штамма CO92). На участок SNP рассчитаны праймеры, имеющие следующий состав: YPO1896-S cca-tcg-ggt-tgt-ggc-aaa-t-S; YPO1896-As aac-acc-atc-gcc-aca-cca-t. Условия проведения ПЦР: 1 цикл 95 °C – 10 мин; 35 циклов: 95 °C – 15 с, 60 °C – 30 с, 72 °C – 15 с. Полученные в ПЦР фрагменты секвенировали и определяли наличие в полученной последовательности нуклеотидной замены. В результате установлено, что все 12 штаммов содержали маркерную SNP, специфичную для популяции 1.ORI2v. Таким образом, из 20 исследованных штаммов, выделенных за период 1964–1988 гг. во Вьетнаме, 19 принадлежали к одной популяции штаммов восточного биовара – 1.ORI2v. Это означает, что в этот временной промежуток в разных провинциях Вьетнама были распространены штаммы одной филогенетической линии 1.ORI2v. Штамм *Y. pestis* KM761, вошедший в подветвь 1.ORI1 вместе со штаммом *Y. pestis* India 95, может представлять однократный завоз чумы из другого региона.

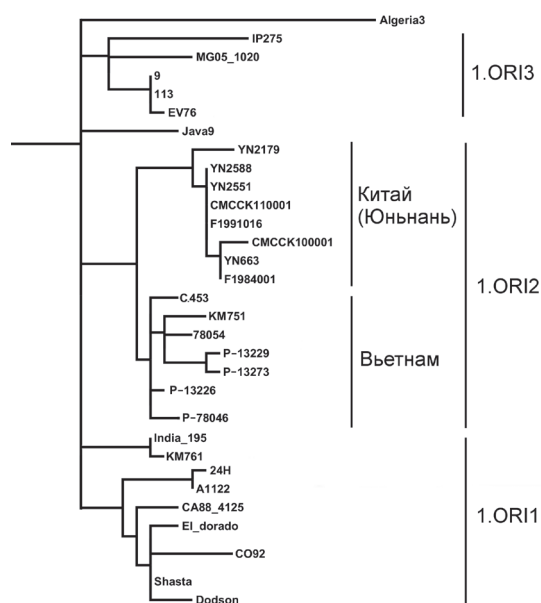
Анализ дендрограммы показал, что штаммы популяции 1.ORI2v филогенетически наиболее близки к штаммам из провинции Юньнань в Китае. Обе популяции представляют два родственных, но отдельных кластера подветви 1.ORI2 и, следовательно, имеют общее происхождение. Это означает, что чума могла быть завезена во Вьетнам в начале третьей пандемии из провинции Юньнань в Китае.

Таким образом, полученные результаты изучения фенотипических и молекулярно-генетических особенностей штаммов *Y. pestis* из Вьетнама свидетельствуют об их принадлежности к восточному биовару основного подвида. Нами впервые проведен филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* из Вьетнама, по данным полногеномного секвенирования этих штаммов. Установлено, что штаммы, циркулировавшие во Вьетнаме в 1964–1988 гг., принадлежали к одной филогенетической ветви, обозначенной нами как 1.ORI2v, близкородственной штаммам из провинции Юньнань в Китае. Разработан способ SNP-типирования штаммов этой ветви, который может быть использован при дальнейшем анализе популяционной структуры и филогении штаммов из Вьетнама, а также других штаммов ветви 1.ORI2.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Куклева Л.М., Павлова А.И., Краснов Я.М., Шавина Н.Ю., Гусева Н.П., Виноградова Н.А., Кутырев В.В. Стандартный алгоритм молекулярного типирования штаммов *Yersinia pestis*. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2012; 3:25–35.
- Касьян А.Ф., Дао Суан Винь, Бобров А.Г. Характеристика некоторых биологических свойств штаммов возбудителя чумы, циркулирующих во Вьетнаме. В кн.: Экологические и эпизоотологические аспекты чумы во Вьетнаме. М.-Хошимин-Буонматхуот; 2003. С 96–8.
- Куклев Е.В., Куклева Л.М., До Тхунг. Характеристика штаммов чумного микроба, выделенных на плато ТайНгуен (Вьетнам) в 1990 году. В кн.: Тропцентр-91. М.; 1992. С. 253–5.



Филогенетический анализ изученных штаммов *Yersinia pestis*, выделенных на территории Вьетнама

4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика особо опасных инфекционных болезней. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.

5. Слудский А.А., Ли Тхи Ви Хыонг, Касьян А.Ф., Данг Туан Дат, Матросов А.Н., Дао Суан Винь, Майоров Н.В., Сунцов В.В. Современная эпидемическая активность антропогенных очагов чумы на плато Тайнгунг. В кн.: Экологические и эпизоотологические аспекты чумы во Вьетнаме. М.-Хошимин-Буонматхуот; 2003. С. 10–2.

6. Сулейменов Б.М., Дао Суан Винь, Касьян А.Ф., До Тхунг, Нгуен Ай Фюнг. Энзоотия и эпизоотия чумы. Алматы: Эверо; 2015. 514 с.

7. Сунцов В.В., Сунцова Н.И., Матросов А.Н., Кузнецов А.А., Данг Туан Дат, Лыонг Тхи Мо, Слудский А.А., Куклев Е.В., Тарасов М.А., Касьян И.А., Майоров Н.В., Астахова Т.С. Антропоургические очаги чумы во Вьетнаме: прошлое и настоящее. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 4:29–35.

8. Сучков И.Ю., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Арутюнов Ю.И., Шишияну М.В., Мишанькин Б.Н. VNTR-генотипы в коллекции природных штаммов *Yersinia pestis* из республики Вьетнам. В кн.: Современные технологии в диагностике особо опасных инфекционных болезней. Саратов; 2003. С. 177–80.

9. Филиппов А.А., Солодовников Н.С., Куклева Л.М., Проценко О.А. Изучение плазмидного состава штаммов возбудителя чумы из разных природных очагов. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1992; 3:10–3.

10. Шведун Г.П., Савостина Е.П., Можаров О.Т., Плотников О.П. Плазмидный спектр штаммов чумного микроба из Вьетнама. В кн.: Актуальные проблемы профилактики особо опасных и природно-очаговых инф. болезней. Саратов; 1994. С. 173.

11. Cavanaugh D., Dangerfield H., Hunter D., Joy J., Marshall J., Quy D., Vivona S., Winter E. Some observations on the current plague outbreak in the Republic of Vietnam. *Amer. J. Public. Health.* 1968; 58(4):42–52.

12. Guiyoule A., Grimont F., Iteman I., Grimont P., Lefèvre M., Carniel E. Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32(3):634–41.

13. Kado C., Liu S. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 1981; 145(3):365–73.

14. Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J., Eppinger M., Roumagnac P., Wagner D.M., Feldkamp M., Kusecek B., Vogler A.J., Li Y., Cui Y., Thomson N.R., Jombart T., Leblois R., Lichtner P., Rahalison L., Petersen J.M., Balloux F., Keim P., Wirth T., Ravel J., Yang R., Carniel E., Achtman M. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. *Nat. Genet.* 2010; 42(12):1140–3. DOI: 10.1038/ng.705.

15. Motin V., Georgescu A., Elliott J., Hu P., Worsham P., Ott L., Slezak T., Sokhansanj B., Regala W., Brubaker R., Garcia E. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (glpD). *J. Bacteriol.* 2002; 184(4):1019–27.

16. Pham H., Dang D., Tran Minh N., Nguyen N., Nguyen T. Correlates of environmental factors and human plague: an ecological study in Vietnam. *Intern. J. Epidemiol.* 2009; 38(6):1634–41. DOI: 10.1093/ije/dyp244.

17. Spyrou M., Tukhbatova R., Feldman M., Drath J., Kacki S., Beltrán de Heredia J., Arnold S., Sitdikov A., Castex D., Wahl J., Gazimzyanov I., Nurgaliev D., Herbig A., Bos K., Krause J. Historical *Y. pestis* Genomes Reveal the European Black Death as the Source of Ancient and Modern Plague Pandemics. *Cell Host Microbe.* 2016; 19(6):874–81. DOI: 10.1016/j.chom.2016.05.012.

18. Velimirovic B. Investigations on the epidemiology and control of plague in South Vietnam. *Zentralbl. Bakteriол. Orig. A.* 1974; 228(4):482–532.

References

1. Eroshenko G.A., Odnokov G.N., Kukleva L.M., Pavlova A.I., Krasnov Ya.M., Shavina N.Yu., Guseva N.P., Vinogradova N.A., Kutyrev V.V. [Standard algorithm of molecular typing of *Yersinia pestis* strains]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2012; 3:25–35.

2. Kas'yan A.F., Dao Xuan Vinh, Bobrov A.G. [Characteristics of certain biological properties of plague agent strains circulating in Vietnam]. In: [Ecological and Epizootiological Aspects of Plague in Vietnam]. M. - Ho Chi Minh - Buôn Ma Thuôt; 2003. P. 96–8.

3. Kouklev E.V., Kukleva L.M., Do Thung. [Characteristics of plague agent strains isolated on Tây Nguyên Plateau, Vietnam in 1990]. In: [Tropcenter-91]. M.; 1992. P. 253–5.

4. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory diagnostics of particularly dangerous infectious diseases]. M.: “Shiko”; 2013. 560 p.

5. Sludsky A.A., Li Thi Vi Hyong, Kas'yan A.F., Nadg Tuan Dat, Matrosov A.N., Dao Xuan Vinh, Mayorov N.V., Suntsov V.V. [Modern epidemic activity of anthropogenic plague foci on Tây Nguyên Plateau, Vietnam]. In: [Ecological and Epizootiological aspects of Plague in Vietnam]. M. - Ho Chi Minh - Buôn Ma Thuôt; 2003. P. 10–2.

6. Suleimenov B.M., Dao Xuan Vinh, Kas'yan A.F., Do Thung, Nguyen Ai Fyong. [Enzooty and Epizooty of Plague]. Almaty: “Evero”; 2015. 514 p.

7. Suntsov V.V., Suntsova N.I., Matrosov A.N., Kuznetsov A.A., Dang Tuan Dat, Lyong Thi Mo, Sludsky A.A., Kouklev E.V., Tarasov M.A., Kas'yan I.A., Mayorov N.V., Astakhova T.S. [Anthropogenic plague foci in Vietnam: past and present]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 4:29–35.

8. Suchkov I.Yu., Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Arutyunov Yu.I., Shishiyanu M.V., Mishan'kin B.N. [VNTR-genotypes in the collection of natural *Yersinia pestis* strains from the Republic of Vietnam]. In: [Advanced Technologies in Diagnostics of Particularly Dangerous Infections]. Saratov; 2003. P. 177–80.

9. Filippov A.A., Solodovnikov N.S., Kukleva L.M., Protsenko O.A. [Studies of plasmid composition of plague agent strains from different natural foci]. *Zh. Mikrobiol., Epidemiol. Immunobiol.* 1992; 3:10–3.

10. Shvedun G.P., Savostina E.P., Mozharov O.T., Plotnikov O.P. [Plasmid spectrum of plague microbe strains from Vietnam]. In: [Relevant Issues of Prophylaxis of Particularly Dangerous and Natural-Focal Infections]. Saratov; 1994. P. 173.

11. Cavanaugh D., Dangerfield H., Hunter D., Joy J., Marshall J., Quy D., Vivona S., Winter E. Some observations on the current plague outbreak in the Republic of Vietnam. *Amer. J. Public. Health.* 1968; 58(4):42–52.

12. Guiyoule A., Grimont F., Iteman I., Grimont P., Lefèvre M., Carniel E. Plague pandemics investigated by ribotyping of *Yersinia pestis* strains. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32(3):634–41.

13. Kado C., Liu S. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* 1981; 145(3):365–73.

14. Morelli G., Song Y., Mazzoni C.J., Eppinger M., Roumagnac P., Wagner D.M., Feldkamp M., Kusecek B., Vogler A.J., Li Y., Cui Y., Thomson N.R., Jombart T., Leblois R., Lichtner P., Rahalison L., Petersen J.M., Balloux F., Keim P., Wirth T., Ravel J., Yang R., Carniel E., Achtman M. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. *Nat. Genet.* 2010; 42(12):1140–3. DOI: 10.1038/ng.705.

15. Motin V., Georgescu A., Elliott J., Hu P., Worsham P., Ott L., Slezak T., Sokhansanj B., Regala W., Brubaker R., Garcia E. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (glpD). *J. Bacteriol.* 2002; 184(4):1019–27.

16. Pham H., Dang D., Tran Minh N., Nguyen N., Nguyen T. Correlates of environmental factors and human plague: an ecological study in Vietnam. *Intern. J. Epidemiol.* 2009; 38(6):1634–41. DOI: 10.1093/ije/dyp244.

17. Spyrou M., Tukhbatova R., Feldman M., Drath J., Kacki S., Beltrán de Heredia J., Arnold S., Sitdikov A., Castex D., Wahl J., Gazimzyanov I., Nurgaliev D., Herbig A., Bos K., Krause J. Historical *Y. pestis* Genomes Reveal the European Black Death as the Source of Ancient and Modern Plague Pandemics. *Cell Host Microbe.* 2016; 19(6):874–81. DOI: 10.1016/j.chom.2016.05.012.

18. Velimirovic B. Investigations on the epidemiology and control of plague in South Vietnam. *Zentralbl. Bakteriол. Orig. A.* 1974; 228(4):482–532.

Authors:

Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'khova Zh.V., Romanov N.I., Nosov N.Yu., Fadeeva A.V., Malakhaeva A.N., Sharapova N.A., Devdariani Z.L., Popov Yu.A., Eroshenko G.A. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Куклева Л.М., Никифоров К.А., Альхова Ж.В., Романов Н.И., Носов Н.Ю., Фадеева А.В., Малахаева А.Н., Шарпова Н.А., Девдариани З.Л., Попов Ю.А., Ерошенко Г.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 01.11.17.

Е.В.Монахова, Р.В.Писанов, С.В.Титова, М.И.Ежова, С.А.Иванов

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ГЕНОВ *cef* ТОКСИГЕННЫХ И НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* O1

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

Целью исследования явился сравнительный биоинформационный анализ генов и белков Cef (CHO cell elongating factor) холерных вибрионов O1 серогруппы. **Материалы и методы.** В работе использовано 36 штаммов *Vibrio cholerae* O1 из коллекции Ростовского противочумного института. Секвенирование ДНК проводили на платформе MiSeq (Illumina), для идентификации генов и анализа использовали программы BioEdit 7.2.5, BLASTN 2.2.29, BLASTP, MEGA 7, Vector NTI Advance 11. **Результаты и выводы.** Полученные данные подтвердили достаточно высокую консервативность Cef у холерогенных штаммов (несущих гены холерного токсина *ctxAB* в составе интегрированного в геном профага CTX): все они содержали близкородственные прототипные аллели *cefC* или *cefE1*. Аллель E1 обнаружена также у *ctxAB*⁻ штаммов, содержащих профаг pre-CTX, и всего у одного лишённого обоих профагов. У остальных CTX⁻/pre-CTX⁻ вибрионов идентифицировано четыре новых, ранее не описанных варианта Cef, два из которых (E2 и E3), принадлежащие штаммам, выделенным в России, оказались уникальными, тогда как для двух других (E4 и E5) в NCBI были найдены полные гомологи. При этом в группу носителей *cefE4* попали несколько штаммов, вызывавших у людей тяжелые холероподобные заболевания. Поскольку Cef является одним из факторов патогенности/персистенции холерных вибрионов, мы полагаем, что сохранение в процессе естественного отбора его измененных вариантов несет определенный биологический смысл с точки зрения возможного приобретения ими свойств, существенных для реализации возбудителями как патогенетического, так и персистентного потенциала.

Ключевые слова: *Vibrio cholera*, CHO cell elongating factor, биоинформационный анализ, аллели гена *cef*, патогенетический потенциал, персистенция.

Корреспондирующий автор: Монахова Елена Владимировна, e-mail: monakhova_ev@antiplague.ru.

E.V.Monakhova, R.V.Pisanov, S.V.Titova, M.I.Ezhova, S.A.Ivanov

Variability of *cef* Genes in Toxigenic and Non-Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 Strains

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

Objective of the investigation was a comparative bioinformatics analysis of *Vibrio cholerae* O1 Cef (CHO cell elongating factor) genes and proteins. **Materials and methods.** 36 *Vibrio cholerae* O1 strains from the Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute collection have been utilized. DNA sequencing was conducted on the MiSeq platform (Illumina); gene identification and analysis was carried out by means of BioEdit 7.2.5, BLASTN 2.2.29, BLASTP, MEGA 7, Vector NTI Advance 11 software programs. **Results and conclusions.** The data obtained confirmed Cef to be rather conserved in cholera strains (carrying cholera toxin genes *ctxAB* as a part of genome-integrated CTX prophage): all of them shared closely related prototype alleles *cefC* or *cefE1*. The E1 allele was also revealed in *ctxAB*⁻ strains carrying the pre-CTX prophage and in a single strain lacking both prophages. In the rest of CTX⁻/pre-CTX⁻ *V. cholerae* four novel *cef* variants, that were not previously described, have been identified, two of which (E2 and E3), belonging to the Russian isolates, appeared to be unique, while for the two others absolute homologues were found in NCBI. In this connection several strains which caused severe cholera-like diseases in humans were placed in the group of *cefE4* host strains. Since Cef is one of pathogenicity/persistence factors of cholera vibrios, we presume that conservation of its altered variants in the course of natural selection embodies a certain biological sense in respect of possible acquisition of qualities, significant for realization of both pathogenic and persistence potential.

Key words: *Vibrio cholerae*, CHO cell elongating factor, bioinformatics analysis, gene alleles, pathogenic potential, persistence.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Elena V. Monakhova, e-mail: monakhova_ev@antiplague.ru.

Citation: Monakhova E.V., Pisanov R.V., Titova S.V., Ezhova M.I., Ivanov S.A. Variability of *cef* Genes in Toxigenic and Non-Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2017; 4:50–55. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-50-55

Как известно, возбудителями эпидемических вспышек холеры являются холерогенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 и O139, содержащие гены холерного токсина (СТ) *ctxAB* в составе интегрированного в геном профага CTX. Клиническая картина типичной холеры обусловлена главным образом СТ, но в ее развитии участвует и ряд других фак-

торов [1]. Также существуют штаммы, лишённые *ctxAB*, но способные вызывать у людей заболевания различной степени тяжести – от слабой и умеренной диареи до тяжелых форм, клинически неотличимых от холеры [1, 8, 9]; они также часто выделяются и из объектов окружающей среды (ООС) [4, 10]. Их патогенетический потенциал зависит от

экспрессии детерминант других токсических субстанций, наборы которых различаются у разных штаммов [1]. Поскольку передача инфекции осуществляется водным либо пищевым путем, вибрионы должны обладать и достаточным персистентным потенциалом, позволяющим выживать в ООС, конкурируя за источники питания с другими микроорганизмами [10]. Они способны усваивать многие органические соединения за счет экспрессии детерминант различных гидролаз (протеаз, липаз, эстераз, нуклеаз и др.), причем некоторые одновременно служат факторами патогенности [1, 4]. К числу таких факторов относится, в частности, Cef (CHO cell elongating factor) – белок с молекулярной массой около 84 кДа, состоящий из 796 аминокислотных остатков (aa), кодируемый геном в составе малой хромосомы. Помимо давней название этому фактору цитотонической активности по отношению к культурам клеток и диареогенной на модели мышей-сосунков, сопровождающимися серьезными нарушениями ультраструктуры клеток, он способен гидролизовать р-нитрофениловые эфиры жирных кислот, твины и трибутирин [1, 2, 3, 6, 7]. В молекуле Cef идентифицировано несколько функциональных доменов: домен Куница, свойственный ингибиторам протеаз; лейциновая молния, обеспечивающая формирование димерной структуры белков; домен альфа-бета-гидролаз (a/bH) с входящим в его состав консервативным субстрат-связывающим мотивом GHSLG; перекрывающийся с a/bH домен LIP. GHSLG отвечает за биохимическую, но не биологическую активность Cef [2]. Ранее нами проведен биоинформационный анализ генов и белков Cef нескольких холерогенных штаммов O1 и O139 серогрупп и показана его высокая консервативность. Вместе с тем установлено, что даже единственная нуклеотидная замена (SNP) в гене *cef V. cholerae* O139 привела к изменению спектра субстратной специфичности его продукта [3]. Поскольку CTX⁻ штаммам свойственна значительно большая генетическая изменчивость по сравнению с CTX⁺, мы допускали, что в их геномах могут присутствовать и измененные гены *cef*, продукты которых могли приобрести свойства, существенные для реализации как патогенетического, так и персистентного потенциала. Поэтому представляло интерес проведение более подробного анализа с привлечением других штаммов, в том числе нехолерогенных.

Цель настоящего исследования состояла в сравнительном биоинформационном анализе генов и белков Cef холерных вибрионов O1 серогруппы.

Материалы и методы

Объектами исследования служили 36 штаммов *V. cholerae* O1 различного происхождения из коллекции Музея живых культур Ростовского противочумного института. Гены *cef* идентифицировали с помощью программ BioEdit 7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit>) и BLASTN 2.2.29 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) в «черновых» полных геномах этих штаммов, секвенированных нами на платформе MiSeq (Illumina) согласно прилагаемому протоколу.

Анализ генов и их продуктов осуществляли с использованием программ Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), AlignX (Vector NTI Advance 11, Invitrogen) и MEGA 7 (<http://www.megasoftware.net>). Список штаммов и номера (ID) нуклеотидных последовательностей генов *cef*, депонированных нами в NCBI GenBank, представлены в таблице. Для сравнения в анализ включили прототипные гены *cef V. cholerae* Эль Тор JBK70 (AY7772384) и двух штаммов классического биовара – CVD103HgR (AY7772385) и O395 (VC0395_0373 в CP000626.1) – и их продукты.

Результаты и обсуждение

По данным AlignX-анализа нуклеотидных последовательностей была построена дендрограмма, на которой *cef V. cholerae* Эль Тор образовали пять ветвей, каждая включала идентичные гены (рис. 1). Мы обозначили эти аллели как E1–E5 в соответствии с уровнем сходства с прототипным геном AY772384 (E1). Аллель E1 длиной 2391 п.н. обнаружена у всех CTX⁺ штаммов, у *ctxAB*⁻/pre-CTX⁺ и у одного CTX⁻/pre-CTX⁻ штамма (14157). Результаты Blast-поиска в имеющихся на сегодняшний день в NCBI завершенных и «черновых» геномах показали, что данная аллель наиболее распространена среди штаммов Эль Тор. Следует отметить, что E1 почти полностью идентична *cefC* классических штаммов: как показано ранее, разница между ними состояла в единственной SNP G/A-2014, приведшей к синонимичной замене остатка изолейцина (I) в CefC на остаток валина (V) в CefE1 в позиции 672, однако это никак не повлияло на биохимическую и биологическую активность продукта [3, 7]. Такую же аллель содержали классические штаммы, найденные в NCBI: ATCC 14035 (JHXR01000002), M-29 (Астрахань, 1942, JFGR01000001), RC27 (Индонезия, 1991, ADAI01000039), 95412 (Мексика, 1997, APFM01000042). Кроме того, в *cef* классического штамма 569B выявлена дополнительная SNP – A/C-2267 с соответствующей несинонимичной заменой гистидина (H) на пролин (P) в позиции 756. По-видимому, эта SNP не является значимой, поскольку активность продукта клонированного гена *cef* 569B ничем не отличалась от таковой *cefE1* [3]. Кроме того, аллель *cefC* присутствовала и у отдельных штаммов, обозначенных как Эль Тор: ATCC 11629 (LOSM01000001) и 5/66 (Пакистан, 1966, JREO01000002).

Аллель E2 имела нормальную длину 2391 п.н. и обладала 96,5 % сходства с E1. Она идентифицирована в геноме всего одного из изученных нами штаммов (P-18904), а в базах NCBI не найдено ее полных гомологов.

Аллель E3 выявлена у двух штаммов из разных

Штаммы <i>V. cholerae</i> и гены, использованные в сравнительном анализе					
Наличие профагов	Штамм	Место выделения	Год	Источник выделения	ID гена <i>cef</i>
CTX ⁺	P-5879	Ростовская обл.	1972	Труп	KM588824
	17290	Дагестан	1994	Больной	KM522861
	16228	Дагестан	1994	Больной	KT779266
	17261	Дагестан	1994	Больной	KT779267
	17296	Дагестан	1994	Больной	KT779268
	18329	Казань	2001	Больной	KT779269
	3265	Москва	2014	Больной	KM522864
	P-17917	Ростов-на-Дону	1999	Речная вода	KR827238
	P-18252	Ростов-на-Дону	2000	Сточные воды	KR827239
	P-18367	Ростов-на-Дону	2001	Речная вода	KR827240
	P-18368	Ростов-на-Дону	2001	Речная вода	KR827241
	P-18369	Ростов-на-Дону	2001	Речная вода	KR827242
	P-18588	Ростов-на-Дону	2002	Речная вода	KR827243
	81	Ростов-на-Дону	2014	Речная вода	KM522865
pre-CTX ⁺	569B	неизвестно	1948	Больной	KT188942
	9961	Москва	1977	Речная вода	KT728924
	P-13169	Ростов-на-Дону	1987	Речная вода	KT728925
CTX ⁻ /pre-CTX ⁻	15500	Крым	1991	Сточные воды	KM522863
	14157	Азербайджан	1989	Больной	KM522866
	14863	Украина	1991	Больной	KM456178
	14873	Молдова	1991	Больной	KM456179
	15031	Украина	1991	Больной	KM456180
	9339	Краснодарский край	1975	Речная вода	KX640094
	11739	Краснодарский край	1980	Речная вода	KX640095
	12026	Краснодарский край	1981	Речная вода	KX640096
	17920	Краснодарский край	1999	Больной	KX640097
	18748	Краснодарский край	2004	Больной	KX640098
	18984	Краснодарский край	2007	Речная вода	KT728926
	434	Краснодарский край	2015	Речная вода	KX640099
	P-18904	Ростовская обл.	2006	Речная вода	KM522860
	P-18973	Ростов-на-Дону	2007	Речная вода	KM456181
	P-19051	Ростов-на-Дону	2008	Речная вода	KX640100
	19308	Астраханская обл.	2012	Речная вода	KX640101
	19758	Псковская обл.	2014	Речная вода	KX640102
	19710	Иркутская обл.	2014	Речная вода	KX640104
	P-19430	Ростов-на-Дону	2013	Речная вода	KX640105

регионов России, которые были практически идентичными и по другим генетическим признакам. За счет вставки СТА между нуклеотидами 1630 и 1631 (относительно E1) ген удлинился на три нуклеотида, а продукт – соответственно на 1 aa. Сходство с E1 составило 93,7 %. В NCBI идентичных генов не найдено. Представляет интерес тот факт, что один из этих штаммов (434) является представителем клона, широко распространившегося в открытых водоемах Краснодарского края (в основном в реке Агура в Сочи и окрестностях) в 2015 г., где в течение двух месяцев выделено 83 штамма, идентичных по ПЦР- и VNTR-генотипам. Отличительной чертой их явилось наличие довольно редко встречающегося у *V. cholerae* O1 гена *cholix*-токсина (*chxA*), который относят к факторам колонизации, способствующим персистенции вибрионов в ассоциации с водными организмами [5]. Поэтому мы полагали, что такая длительная циркуляция данного клона могла быть отчасти или полностью обусловлена именно экспрессией *chxA*. Обнаружение у штамма 434 новой аллели *cefE3* позволяет думать, что к этому мог быть причастен и

его продукт. Второй штамм, идентичный первому, выделен тремя годами ранее в Астраханской области, что не исключает возможности его длительного сохранения с заносом на другие территории, где в определенный период сложились благоприятные условия для его размножения.

У 12 нехолерогенных штаммов разного происхождения выявлена аллель E4, имеющая такую же вставку СТА, что и E3, такую же длину (2394 п.н.) и 94,2 % сходства с E1. В эту группу наряду с водными попали и клинические штаммы. Для трех из них (14863, 14873 и 15031) известно, что они явились этиологическими агентами тяжелых холероподобных заболеваний людей, на модели кроликов-сосунков вызывали эффект, близкий холерогенному, а их культуральные супернатанты – удлинение клеток СНО и L-929. Поскольку они не содержали генов других цитотонических токсинов (СТ и термостабильного), удлинение клеток скорее всего обусловлено действием Cef. Более того, ультраструктурные изменения в кишечнике животных, зараженных штаммом 14863, во многом напоминали таковые под действием рекомби-

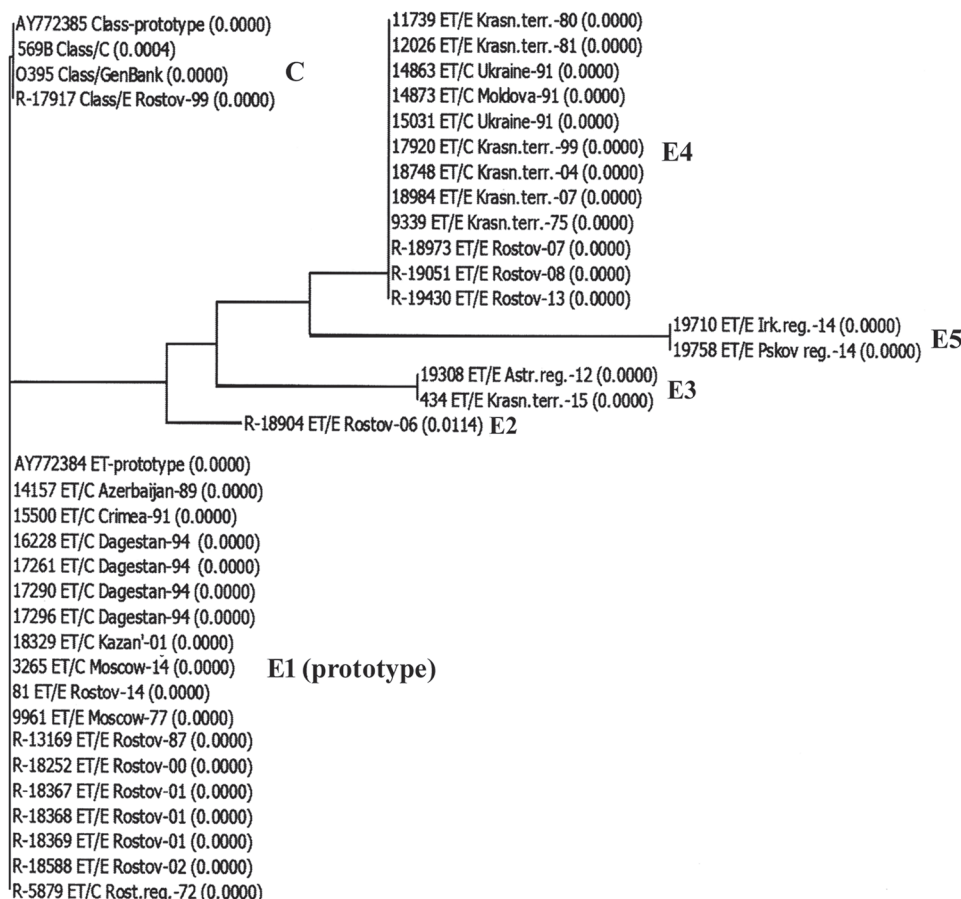


Рис. 1. Дендрограмма, отражающая сходство и различия генов *cef* *V. cholerae*:

C – клинический штамм, E – штамм из ООС

нантного белка Cef [1]. Эти данные позволяют предположить, что способность упомянутых штаммов вызывать тяжелые формы кишечных инфекций отчасти (или даже полностью) обусловлена продукцией CefE4, обладающего повышенной биологической активностью. В NCBI найден один CTX⁺ штамм VC35 с такой же аллелью (AMBR01000017, Contig017), выделенный в 2004 г. в Малайзии от больного с диагнозом «холера» [8]. Выявление аллели *cefE4* у штаммов, не связанных общностью происхождения, указывает на его широкое распространение и необходимость дальнейшего изучения свойств его продукта для ответа на вопрос о том, является ли его присутствие в геномах возбудителей, выделяемых из ООС, показателем их высокого патогенетического потенциала и представляют ли они реальную угрозу. Не исключено также, что CefE4 обладает измененной эстеразной/липазной активностью, что может повлиять на персистентный потенциал.

Наименьшим уровнем сходства с прототипом (89,5 %) обладала аллель E5 длиной 2403 п.н. Увеличение длины обусловлено, помимо уже упомянутой вставки СТА между нуклеотидами 1630 и 1631, наличием еще двух вставок: ТТААТ между 946 и 947 и GTGT между 958 и 959 (относительно E1). Первая привела к сдвигу рамки считывания, вторая – к восстановлению прежнего порядка кодонов. Кроме того, в последовательности «выше» данных вставок наблюдалось большое число 1-3-нуклеотидных замен. Все это привело к образованию в продукте ге-

терологического 12 аа участка. Аллель E5 обнаружена всего у двух штаммов, выделенных в разных регионах России в разные годы, но практически идентичных и по другим генетическим признакам. Тем не менее, такая же аллель найдена в NCBI в сиквенсах двух CTX⁺/pre-CTX⁺ штаммов M1522 (Калмыкия, 2014, вода, LQCA01000002, contig00002) и 12129 (больной, 1985, ACFQ01000009, contig178). Мы полагаем, что продукт аллели *cefE5* также заслуживает дальнейшего изучения по причинам, изложенным применительно к *cefE4*.

Интересно, что во всех случаях наличия вставок общее число «лишних» нуклеотидов было кратно трем, поэтому в продуктах измененных генов появлялись «лишние» аа, но в целом они сохраняли достаточно высокий уровень сходства друг с другом, как и сами гены.

Поскольку в связи с вырожденностью генетического кода не все SNP приводят к заменам аа, далее мы провели AlignX-анализ продуктов разных аллелей гена *cef* вибрионов Эль Тор (рис. 2). В соответствии с длиной генов их продукты также имели разные размеры: E1 и E2 – 786, E3 и E4 – 797, E5 – 800 аа.

Несмотря на различия по первичной структуре, все белки Cef сохранили активные домены. Домен Куница у всех находился в одной и той же позиции 179–196 и остался в неизменном виде. Локализация остальных доменов в E3, E4 и E5 отличалась от таковой в E1 и E2 вследствие сдвига за счет вставок дополнительных аа. Лейциновая молния была одинаковой

Signal peptide	
E1	MKQVIKLSLLCSALWLACGDETNSGASTEVEVYESIQALQDRTTIKFALSGKDANVLPSPFALMNAKDGTLEIPPGSNTSGSNPLVAMQVGDGPIT 100
E2	S.....V..... 100
E3	S..... 100
E4	S..... 100
E5	S..... 100
Kunitz domain	
E1	MPLFLDFKAGLADNIITSGIYLYELTDSMTGSPSIKALLTNGVDYTAVSSAASDKILIMPTKALNASSEYILAVTSEVSDANGNPVGTSSASYAALKSKN 200
E2	I.....V..... 200
E3	V..... 200
E4	L.....V..... 200
E5	V.A..... 200
E1	KIYSEGDIALTQKVITQGVKIFQLSGVDETQIVYSTWFSTQSVSNTLFATRGATASAFASGSNQLETVWKQTGLGLDTAYTIQLGTPVDFAAALTADDNF 300
E2	N.....M..... 300
E3	N..... 300
E4	N.....M..... 300
E5	..R.....M.....VT...N.T... 300
Leucine zipper	
E1	STYVGADKKTAILGTY---TANTVDVTGKTVRLPYLETGSNWNTQPFESAMPSLAKIKAALADSKEQLTIGSQLLAAGIDTTKLATDASEQLKLMGLTL 397
E2	 397
E3	...D.....A.....S...V..... 397
E4	..I..... 397
E5	..N.I.....A.VITAFNTVPTVS.....S..... 400
a/bH LIP	
E1	TKSDGTALDPERYITRYSVPVKVSVQDVFFLLFTPAGAAPTDIVIYOHGVTTAKENAYAFKNLTAVGLAVIAIDLPLHGERSLDSTRSANSDFLAYIN 497
E2	A..... 497
E3	N.ST.N.....S.....A..... 497
E4	A..... 497
E5	K.VDK.....S..... 500
SBS a/bH	
E1	LTYLAVARDNLRLQSILDLVGLRAALTLSQPLFTGTRLSGINVTG-SKVRMLGHSLSGIGVGTSAIAE*SNKTLGSTAADAMYSFSGAAIQNSGGQISNLLI 596
E2	P..... 596
E3	P.N...RN.ST.....V.....A..N.L..... 597
E4	..AI.ES...P.N...IRN.ST.....V.....L.N.L..... 597
E5	..AI.ES...P.N...RN.ST...I.....V.....L.N.L..... 600
E1	GSAFFGPKIKHNVALSASTEYKGFADAQCASLDDSSACYNLFTSLAQEQLAQVTSQGFQMFSAQAQTLLDTIDPYSVSVSTKLNNGLTTPLYFSEVDGDSV 696
E2	T..KS.ETS..E..R.....T...E..... 696
E3	T..KS.ETS..E..R..... 697
E4	..EY..Q.....E.....T..KS.ETS..EK.R.....T.....A..... 697
E5	..EY..Q.....E.....ES.ERS..E..R.....L.....SS.A...A..... 700
LIP	
E1	VPNKVSNTPTGSLVYLSPQFAGTEPLATLLGLTTVNAGQTAPNATKSFVQFNSTAKHSTFVAPQDAGYADLAHNTQMOTETADFLADDSLGAVSNSNSVLK 796
E2	Q.D.GD..... 796
E3	S.....I...S.L..RF..V.I...L..... 797
E4	Q.D.GD..... 797
E5	S.....L..... 800

Рис. 2. Аминокислотные последовательности белков CefE1–E5. Все домены подчеркнуты, a/bH выделен рамкой, жирной чертой подчеркнута область его перекрытия с LIP. SBS – субстрат-связывающий мотив, выделен заливкой. Звездочкой (*) обозначены аминокислотные остатки: валина-672, на месте которого в CefC находится остаток изолейцина; гистидина-756, который замещен остатком пролина в CefC штамма *V. cholerae* 569B

во всех аллелях, тогда как a/bH и LIP характеризовались значительной вариабельностью, не затрагивающей GHSLG. Как видно из рис. 2, некоторые замены aa присутствовали во всех новых вариантах, другие повторялись в 2–3 аллелях либо были уникальными.

Таким образом, в результате проведенного анализа установлено, что гены *cef* нехолерогенных штаммов *V. cholerae* O1 значительно отличаются от таковых холерогенных вибрионов. Среди них выявлено четыре новых, ранее не описанных аллели, две из которых оказались уникальными. Принимая во внимание установленный нами ранее факт изменения субстратной специфичности Cef *V. cholerae* O139 вследствие единственной точечной мутации в его гене [3], мы не исключаем, что продукты разных аллелей *cefE* также могут различаться по биохимической и биологической активностям, с которыми связана способность вибрионов как к персистенции

в разных экологических нишах, так и к проявлению патогенных свойств, что требует экспериментальной проверки, которая покажет, представляют ли штаммы с той или иной аллелью этого гена реальную угрозу здоровью населения.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Монахова Е.В. Стратегия вирулентности холерных вибрионов и пути ее реализации. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 4:60–8.
2. Монахова Е.В., Писанов Р.В., Мазрухо А.Б., Маркина О.В., Алексеева Л.П. Свойства Cef (CHO cell elongating factor) холерных вибрионов: биоинформационный анализ и экспериментальные данные. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2012; 2:10–4.
3. Писанов Р.В., Монахова Е.В., Шалу О.А. Точечная мутация в гене *cef* (CHO cell elongating factor) *Vibrio cholerae* O139 приводит к изменению субстратной специфичности его продук-

та. *Генетика*. 2012; 48(2):275–9.

4. Islam A., Labbate M., Djordjevic S.P., Alam M., Darling A., Melvold J., Holmes A.J., Johura F.T., Cravioto A., Charles I.G., Stokes H.W. Indigenous *Vibrio cholerae* strains from a non-endemic region are pathogenic. *Open Biol.* 2013; 3:120181. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3603452>. DOI: 10.1098/rsob.120181.

5. Lugo M.R., Merrill A.R. The father, son and cholix toxin: the third member of the DT group mono-ADP-ribosyltransferase toxin family. *Toxins (Basel)*. 2015; 7(8):2757–72. DOI: 10.3390/toxins7082757.

6. McCardell B.A., Kothary M.H., Hall R.N., Sathyamoorthy V. Identification of a CHO-elongating factor produced by *Vibrio cholerae* O1. *Microb. Pathog.* 2000; 29(1):1–8. DOI: 10.1006/mpat.2000.0361.

7. McCardell B.A., Sathyamoorthy V., Michalski J., Lavu S., Kothary M., Livezey J., Kaper J.B., Hall R. Cloning, expression and characterization of the CHO cell elongating factor (Cef) from *Vibrio cholerae* O1. *Microb. Pathog.* 2002; 32(4):165–72. DOI: 10.1006/mpat.2001.0492.

8. Osama A., Gan H.M., The C.S., Yap K.P., Thong K.L. Genome sequence and comparative genomics analysis of a *Vibrio cholerae* O1 strain isolated from a cholera patient in Malaysia. *J. Bacteriol.* 2012; 194(24):6933. DOI: 10.1128/JB.01832-12.

9. Saha P.K., Koley H., Mukhopadhyay A.K., Bhattacharya S.R., Nair G.B., RamaKrishnan S.T., Takeda Y. Nontoxigenic *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba biotype El Tor associated with a cluster of cases of cholera in Southern India. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(5):1114–7.

10. Vezzulli L., Pruzzo C., Huq A., Colwell R.R. Environmental reservoirs of *Vibrio cholerae* and their role in cholera. *Environ. Microbiol. Rep.* 2010; 2(1):27–3. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2009.00128.x.

References

1. Monakhova E.V. [Cholera vibrio virulence strategy and ways of its realization]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 4:60–8.

2. Monakhova E.V., Pisanov R.V., Mazrukho A.B., Markina O.V., Alekseeva L.P. [Characterization of *Vibrio cholerae* Cef (CHO cell elongating factor): bioinformatics analysis and experimental data]. *Mol. Genet.*

Mikrobiol. Virusol. 2012; 2:10–4.

3. Pisanov R.V., Monakhova E.V., Shalu O.A. [Point mutation in *Vibrio cholerae* O139 cef (CHO cell elongating factor) gene alters the substrate specificity of its product]. *Genetika*. 2012; 48(2):245–8.

4. Islam A., Labbate M., Djordjevic S.P., Alam M., Darling A., Melvold J., Holmes A.J., Johura F.T., Cravioto A., Charles I.G., Stokes H.W. Indigenous *Vibrio cholerae* strains from a non-endemic region are pathogenic. *Open Biol.* 2013; 3:120181. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3603452>. DOI: 10.1098/rsob.120181.

5. Lugo M.R., Merrill A.R. The father, son and cholix toxin: the third member of the DT group mono-ADP-ribosyltransferase toxin family. *Toxins (Basel)*. 2015; 7(8):2757–72. DOI: 10.3390/toxins7082757.

6. McCardell B.A., Kothary M.H., Hall R.N., Sathyamoorthy V. Identification of a CHO-elongating factor produced by *Vibrio cholerae* O1. *Microb. Pathog.* 2000; 29(1):1–8. DOI: 10.1006/mpat.2000.0361.

7. McCardell B.A., Sathyamoorthy V., Michalski J., Lavu S., Kothary M., Livezey J., Kaper J.B., Hall R. Cloning, expression and characterization of the CHO cell elongating factor (Cef) from *Vibrio cholerae* O1. *Microb. Pathog.* 2002; 32(4):165–72. DOI: 10.1006/mpat.2001.0492.

8. Osama A., Gan H.M., The C.S., Yap K.P., Thong K.L. Genome sequence and comparative genomics analysis of a *Vibrio cholerae* O1 strain isolated from a cholera patient in Malaysia. *J. Bacteriol.* 2012; 194(24):6933. DOI: 10.1128/JB.01832-12.

9. Saha P.K., Koley H., Mukhopadhyay A.K., Bhattacharya S.R., Nair G.B., RamaKrishnan S.T., Takeda Y. Nontoxigenic *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba biotype El Tor associated with a cluster of cases of cholera in Southern India. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(5):1114–7.

10. Vezzulli L., Pruzzo C., Huq A., Colwell R.R. Environmental reservoirs of *Vibrio cholerae* and their role in cholera. *Environ. Microbiol. Rep.* 2010; 2(1):27–3. DOI: 10.1111/j.1758-2229.2009.00128.x.

Authors:

Monakhova E.V., Pisanov R.V., Titova S.V., Ezhova M.I., Ivanov S.A. 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:

Монахова Е.В., Писанов Р.В., Титова С.В., Ежова М.И., Иванов С.А. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.

Поступила 03.11.17.

Е.Г.Оглодин¹, О.А.Морозов¹, К.А.Никифоров¹, Л.М.Куклева¹, Н.А.Шарапова¹, Е.Н.Рождественский²,
Г.Х.Базарова², А.В.Денисов², П.П.Санаров², Е.Г.Токмакова³, М.А.Макашова¹, В.Г.Германчук¹,
Г.А.Ерошенко¹, В.В.Кутырев¹

ВИДОВАЯ ПРИНАДЛЕЖНОСТЬ, ЧИСЛЕННОСТЬ И ДИНАМИКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АКАНТАМЕБ ИЗ ПОЧВ ГОРНО-АЛТАЙСКОГО ВЫСОКОГОРНОГО ОЧАГА ЧУМЫ СО ШТАММАМИ *YERSINIA PESTIS*

¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов; ²ФКУЗ «Алтайская противочумная станция», Горно-Алтайск; ³ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российская Федерация

Цель исследования. Анализ видовой принадлежности, численности и динамики взаимодействия акантамеб из почв Горно-Алтайского высокогорного очага чумы со штаммом *Yersinia pestis* 367, выделенным на энзоотической территории этого очага в 2016 г. **Материалы и методы.** В работе использованы почвенные амебы из Горно-Алтайского высокогорного очага и штамм *Y. pestis* 367 основного подвида античного биовара, выделенный в этом очаге в 2016 г. Определение систематической принадлежности выделенных амеб проводили с помощью ПЦР с родоспецифическими праймерами и секвенирования полученных ПЦР-фрагментов с дальнейшей идентификацией нуклеотидных последовательностей по базе данных GenBank. Определение локализации клеток *Y. pestis* в акантамебах проводили с помощью метода флуоресцирующих антител с использованием микроскопа Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия). **Результаты и выводы.** Впервые установлено присутствие акантамеб *Acanthamoeba castellanii* в почве нор серого сурка *Marmota altaica* в количестве до 300000 кл./г почвы в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы. Исследована динамика взаимодействия этих микроорганизмов и установлено сохранение возбудителя в вакуолях эндоплазматического ретикулаума акантамеб в течение 14 дней. Это предполагает возможность персистенции *Y. pestis* в амебах рода *Acanthamoeba* в почвенном биоценозе Горно-Алтайского высокогорного очага чумы.

Ключевые слова: возбудитель чумы, акантамебы, природные очаги чумы, механизмы персистенции, *Acanthamoeba*, *Yersinia pestis*.

Корреспондирующий автор: Оглодин Евгений Геннадьевич, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

E.G.Oglodin¹, O.A.Morozov¹, K.A.Nikiforov¹, L.M.Kukleva¹, N.A.Sharapova¹, E.N.Rozhdestvensky¹, G.Kh. Bazarova², A.V.Denisov², P.P.Sanarov², E.G.Tokmakova³, M.A.Makashova¹, V.G.Germanchuk¹, G.A.Eroshenko¹, V.V.Kutyrev¹

Specific Appurtenance, Numbers, and Dynamics of Interaction of *Acanthamoeba* from Soils of Gorno-Altai High-Mountain Plague Focus with *Yersinia pestis* Strains

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

Objective of the study is to analyze the appurtenance, numbers, and dynamics of interaction of acanthamoeba from soils of Gorno-Altai plague focus with *Yersinia pestis* 367 strain, isolated in 2016 in enzootic territory of this focus. **Materials and methods.** Utilized were soil amoeba from Gorno-Altai high-mountain focus and the strain *Y. pestis* 367 of the main subspecies of antique biovar, isolated there in 2016. Determination of systematic relation of the isolated amoeba was carried out using PCR with genus specific primers and sequencing of the obtained PCR fragments followed by identification of nucleotide sequences against GenBank database. Localization of *Y. pestis* cells in acanthamoeba was performed using fluorescent antibody technique by means of Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Germany). **Results and conclusions.** For the first time ever established has been the presence of *Acanthamoeba castellanii* in soils of burrows of *Marmota altaica* in the numbers of up to 300000 cells/gr in Gorno-Altai high-mountain focus. Investigated has been the dynamics of interaction of these microorganisms. Preservation of the agent in vacuoles of endoplasmatic reticulum within 14 days has been revealed. It is an indicative of the possibility of *Y. pestis* persistence in amoeba of *Acanthamoeba* subspecies in soil biocenosis of Gorno-Altai high-mountain plague focus.

Key words: plague agent, acanthamoeba, natural plague foci, mechanisms of persistence, *Acanthamoeba*, *Yersinia pestis*.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Evgeniy G. Oglodin, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Oglodin E.G., Morozov O.A., Nikiforov K.A., Kukleva L.M., Sharapova N.A., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Denisov A.V., Sanarov P.P., Tokmakova E.G., Makashova M.A., Germanchuk V.G., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Specific Appurtenance, Numbers, and Dynamics of Interaction of *Acanthamoeba* from Soils of Gorno-Altai High-Mountain Plague Focus with *Yersinia pestis* Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 4:56–61. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-56-61

Чума – зоонозная особо опасная природно-очаговая болезнь, циркулирующая в природе на грызунах и их блохах. Этиологическим агентом чумы

является бактерия *Yersinia pestis*, которая вызывает эпизоотии чумы грызунов, приводящие к их массовой гибели. Эпизоотические периоды во многих

природных очагах чумы чередуются с межэпизоотическими периодами, в течение которых возбудитель чумы сохраняется до сих пор в не выявленном природном резервуаре. В последнее время появляется все больше данных о сохранении возбудителей опасных инфекций в почвенных амебах и других многочисленных членах почвенных и водных биоценозов. В том числе показано, что в амебах в течение длительного времени могут сохраняться такие опасные патогены, как *Francisella tularensis*, *Vibrio cholerae*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium leprae* и другие [8, 9]. Для объяснения сохранения возбудителя чумы в межэпизоотический период недавно была разработана гипотеза «вертикальной трансмиссии», предполагающая сохранение возбудителя чумы в членах почвенных биоценозов в этот период и вынос возбудителя в популяцию грызунов с помощью зараженных личинок блох с последующим развитием эпизоотического процесса [4, 7]. Ранее также высказано предположение о том, что Protozoa могут играть решающую роль в эпизоотологии возбудителя чумы ввиду возможности сохранения возбудителя в вегетативных формах и цистах амеб в течение достаточно продолжительного времени. Предположено, что симбиотические простейшие пищеварительного тракта грызунов и зайцеобразных могут быть резервуарами возбудителя чумы, что обеспечивает постоянство эпизоотического процесса [1].

Ранее нами был проведен анализ видового состава и численности простейших из почв природных очагов чумы Прикаспия, исследовано их взаимодействие со штаммами *Y. pestis*. Из почв Прикаспийского Северо-Западного степного, Прикаспийского песчаного и Волго-Уральского степного очагов в России выделены амебы родов *Willertia*, *Hartmannella*, представители миксомицет, однако доминирующими по численности оказались амебы рода *Acanthamoeba* – *A. castellanii* и *Acanthamoeba* spp. Их численность была высокой и составляла от 30 до 300 тыс. клеток на 1 г почвы. Показана возможность сохранения штаммов *Y. pestis* в клетках акантамеб при 26 °C и влажности 20 % (моделирование засушливых периодов в природных очагах чумы) в течение 2–4 месяцев. Полученные данные могут свидетельствовать о возможном участии амеб *Acanthamoeba* spp. в сохранении *Y. pestis* в почвенных биоценозах природных очагов чумы.

В данной работе нами впервые проведен анализ видовой принадлежности, численности и динамики взаимодействия акантамеб из почв Горно-Алтайского высокогорного очага чумы со штаммом *Yersinia pestis* 367, выделенным на энзоотичной территории этого очага в 2016 г.

Материалы и методы

Выделение амеб, определение их численности. Для выделения амеб использовали плотную среду SM/10 (глюкоза – 1 г, Bacto-pepton – 1 г, дрожжевой экстракт – 1 г, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2 г, KH_2PO_4 – 1,9 г,

K_2HPO_4 – 1 г, Bacto-agar – 20 г, вода – до 1000 мл), на которой проводили совместное культивирование вытяжек почвы с суспензией штамма *Escherichia coli* OP50 при 28 °C в течение 6 сут. Для получения аксенической культуры амеб собранный с чашек материал в количестве 200–400 м.к. обрабатывали 1 мл раствора антибиотиков гентамицина, стрептомицина и ампициллина в концентрации 20 ед./мл каждого в течение 24 ч. Затем культуру отмывали в избытке фосфатного буфера (pH 6,4), центрифугировали при 4000 об./мин и ресуспендировали в 1 мл этого же буфера. Выделенные очищенные культуры амеб хранили при температуре 4 °C. Количество амеб в пробах почвы определяли по методу Singh с нашими модификациями [3]. Количество клеток амеб определяли методом подсчета клеток в камере Горяева.

Культивирование штаммов *Y. pestis*. Используемый в работе штамм *Y. pestis* 367 выделен в Горно-Алтайском высокогорном очаге в 2016 г. и получен нами из ГКПБ РосНИПЧИ «Микроб». Штамм выращивали на жидкой и твердой LB средах (pH 7,2). Анализ культурально-морфологических и биохимических характеристик штамма выполняли стандартными методами [6].

Микроскопия образцов. Визуализацию клеток *Y. pestis* в образцах проводили с помощью метода флуоресцирующих антител (МФА). Для специфического окрашивания использовали «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие чумные адсорбированные лошадиные» (производство РосНИПЧИ «Микроб», включающие иммуноглобулиновую фракцию чумной агглютинирующей лошадиной сыворотки, меченной флуоресцеин-5-изотиоционатом (ФИТЦ)). Препараты для окрашивания обрабатывали последовательно 2 % Triton X-100, 1 % Tween 20 (Sigma, США) в течение 30 мин. Для контрастирования и снижения уровня неспецифического свечения дополнительно использовали альбумин бычий (Sigma, США). Просмотр образцов проводили с использованием люминесцентного микроскопа Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия).

Определение систематической принадлежности амеб. Для получения ДНК амеб использовали набор «ДНК-Сорб» (ИнтерЛабСервис, Москва). Родовую принадлежность амеб устанавливали по результатам ПЦР со специфическими праймерами на участок рибосомного оперона – гена 18S рРНК [2]. О присутствии в образце ДНК амеб рода *Acanthamoeba* судили по образованию в ПЦР с праймерами JDP1/JDP2 фрагмента размером 450 п.н. Для видовой идентификации полученные в ПЦР фрагменты ДНК амеб секвенировали на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500xL. Анализ полученных последовательностей выполняли при помощи программы MEGA 6.0 и алгоритма BLAST на основе базы нуклеотидных последовательностей простейших из базы данных NCBI GenBank. Образец ДНК амеб считали идентифицированным по видовой принадлежности при проценте гомологии нуклеотидной последовательности выше 99 при условии совпаде-

ния длины сравниваемых последовательностей более чем на 95.

Результаты и обсуждение

В последние годы в Горно-Алтайском высокогорном очаге постоянно регистрируется эпизоотическая активность, а в 2014–2017 гг. здесь впервые произошло три случая заражения чумой человека после 35 лет отсутствия регистрации чумы на территории Российской Федерации [5]. В 2012–2017 гг. в этом очаге впервые обнаружена циркуляция высоковирулентных штаммов *Y. pestis* основного подвида. Почвенные амёбы из нор грызунов из Горно-Алтайского высокогорного очага и штамм *Y. pestis* 367, выделенный здесь в 2016 г., использованы нами для изучения динамики взаимодействия возбудителя чумы и простейших из почвенных биоценозов Горного Алтая. Места забора проб почвы и выделения использованного в работе штамма *Y. pestis* указаны на рис. 1. Образцы почв брали из постоянных и временных нор серого сурка *Marmota altaica* на глубине от 10 до 120 см. При анализе взятого образца почвы в Мухор-Тархатинском районе установлено, что в образце содержались цистообразующие амёбы, которые были отобраны для проведения экспериментов.

Определения численности и систематической принадлежности амёб из образца почвы из Горно-Алтайского высокогорного очага. При анализе численности цистообразующих амёб по методу Singh с модификациями [2] установлено, что численность амёб в 1 г почвы составляет 300000 кл./г почвы. Амёбы получали в чистой аксенической культуре и выделяли из них ДНК с помощью набора «ДНК-Сорб» (ИнтерЛабСервис, Москва). Родовую принадлежность выделенных амёб определяли по результатам ПЦР со специфическими праймерами JDP1/JDP2 на участок гена 18S рРНК рибосомного оперона [10, 11]. В ПЦР в исследуемом образце образовывался фрагмент размером 450 п.н., специфичный для амёб

рода *Acanthamoeba*, что свидетельствовало о принадлежности выделенных амёб к этому роду. Для подтверждения родовой принадлежности и определения вида выделенных акантамёб проведено секвенирование полученных в ПЦР фрагментов гена 18S рРНК и их сравнение с аналогичными нуклеотидными последовательностями из базы данных NCBI GenBank. Максимальный процент гомологии нуклеотидной последовательности гена 18S рРНК акантамёбы из почв в Горном Алтае с видом *A. castellanii* составил 100 при совпадении длины сравниваемой последовательности на 100 %, что однозначно доказывает принадлежность выделенных амёб к виду *A. castellanii*.

Ранее введенные нами в базу данных последовательности штамма *A. castellanii* из Волго-Уральского степного очага на 99 % совпадали с вновь выделенным нами штаммом *A. castellanii* из Горно-Алтайского высокогорного очага. Это указывает на широкое распространение этого вида в почвенных биоценозах очагов чумы Прикаспия и Алтая и совпадает с литературными данными о глобальном распространении вида *A. castellanii* в различных ландшафтно-географических зонах. Мы обозначили выделенный штамм из Горного Алтая как *A. castellanii* Tarhata. Полученный штамм акантамёб *A. castellanii* Tarhata был использован для моделирования взаимодействия амёб из Горно-Алтайского высокогорного очага и штаммов *Y. pestis* из этого очага.

Анализ взаимодействия штаммов *Y. pestis* из Горно-Алтайского высокогорного очага и акантамёб из этого очага. В работе использован штамм *Y. pestis* 367. Анализ его дифференциальных биохимических особенностей – отсутствие ферментации рамнозы, наличие способности к редукции нитратов и наличие маркерной плазмиды рTP33 указал на принадлежность к ветви 4.ANT античного биовара основного подвида возбудителя чумы. Штамм *Y. pestis* 367 выделен в с. Мухор-Тархата бактериологическим посевом от биопробной белой мыши. Анализ взаимодействия штамма *Y. pestis* 367 и акантамёб проводили в жидкой среде LB. В качестве контроля численности



Рис. 1. Место забора пробы образцов почв из постоянных и временных нор серого сурка *M. altaica* на территории Горно-Алтайского высокогорного очага и выделения штамма *Y. pestis* в участках проявления эпизоотической активности в 2014–2016 гг.:

К – место выделения *Y. pestis* 367; А – место выделения *A. castellanii* Tarhata

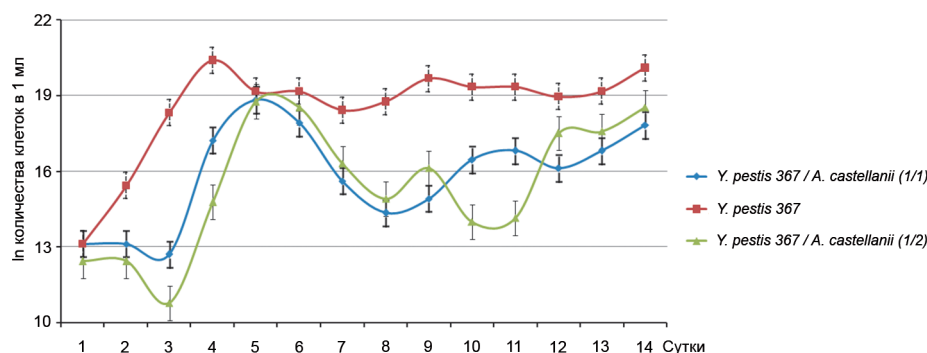


Рис. 2. Динамика роста *Y. pestis* 367 при совместном культивировании с клетками *A. castellanii* в соотношении концентрации клеток 1/1 и 1/2. В качестве контроля использовалась культура *Y. pestis* 367 без акантамеб в среде

клеток в жидкой среде использовали культуру *Y. pestis* 367, а культуру акантамеб с инактивированными клетками *Y. pestis* этого же штамма использовали в качестве контроля численности *A. castellanii*.

Выделенный штамм акантамебы *A. castellanii* размножали в жидкой среде на матрасах со средой PYG до концентрации $1 \cdot 10^6$ кл./мл. Штамм *Y. pestis* 367 выращивали в среде LB (pH 7,2) при 28 °C в течение 18 ч и доводили до концентрации $1 \cdot 10^9$ кл./мл. Культуры акантамеб и *Y. pestis* смешивали в пропорциях 1/1, 1/2, 1/10, 1/20 и культивировали в течение двух недель (рис. 2, 3). Совместное культивирование возбудителя чумы и амёб проводили в пробирках при постоянной температуре 22 °C и влажности 60 %, поддерживаемых климатической камерой KBF 720 (Binder, Германия). Забор материала из пробирки осуществляли каждые сутки в одно и то же время. Количество клеток *Y. pestis* 367 определяли по числу КОЕ на твердой агаровой среде LB с разведением исходного материала до 10 раз. Инактивацию *Y. pestis* проводили в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)». Количество клеток амёб определяли методом подсчета клеток в камере Горяева по рекомендациям производителя. Полученные результаты по динамике изменения численности клеток акантамеб и *Y. pestis* представлены в таблице. Для подтверждения достоверности полученных результатов и определения уровня значимости проводили определение среднеквадратичного отклонения полученных значений. В таблице приведены значения количества КОЕ *Y. pestis* и количества клеток *A. castellanii*. Все значения укладываются в доверительный интервал ± 5 %.

На основе полученных данных построена диаграмма зависимости количества клеток возбудителя

чумы от численности акантамеб (рис. 2 и 3). Как следует из графика и таблицы, на 2–3-е сутки наблюдается падение КОЕ *Y. pestis* в пробирках с клетками акантамеб в соотношении 1/1 и 1/2, что свидетельствует об активном фагоцитозе амёбами клеток возбудителя чумы. Однако резкое изменение значений натурального логарифма КОЕ *Y. pestis* на 3–4-е сутки в 1,3 раза при совместном выращивании с культурой акантамеб в соотношении 1/1 и 1/2 может свидетельствовать об активном делении *Y. pestis* внутри клеток трофозоитов (таблица). Равномерный подъем в первые 4 сут КОЕ возбудителя чумы в контрольной пробирке показывает нормальный темп роста культуры чумы до стадии плато на 5–6-е сутки.

В то же время снижение количества КОЕ *Y. pestis* в пробирках с акантамебами показывает более интенсивный фагоцитоз с 6-х по 8-е сутки, чем вначале и в конце эксперимента. Таким образом, постепенное уменьшение амплитуды колебаний количества клеток и аналогичный темп роста культуры *Y. pestis* в контрольной пробирке на 13–14-е сутки по сравнению с темпом роста возбудителя чумы в пробирках с акантамебами свидетельствует о возможности взаимного сосуществования *Y. pestis* и *A. castellanii* в условиях жидкой среды.

Кроме того, полученные кривые динамики роста акантамеб (рис. 3) показывают интенсивность лизиса клеток амёб в связи с выходом *Y. pestis* 367 в жидкую среду. Постепенное падение численности акантамеб на 5-е и 8-е сутки соответствует росту клеток возбудителя чумы (рис. 2 и 3). Напротив, увеличение количества клеток *A. castellanii* в пробирке с соотношением к клеткам *Y. pestis* 367 как 2/1 на 6–7-е и 9–11-е сутки (рис. 3) свидетельствует об адаптации амёб к среде с возбудителем чумы и относительно устойчивом взаимном балансе количества клеток.

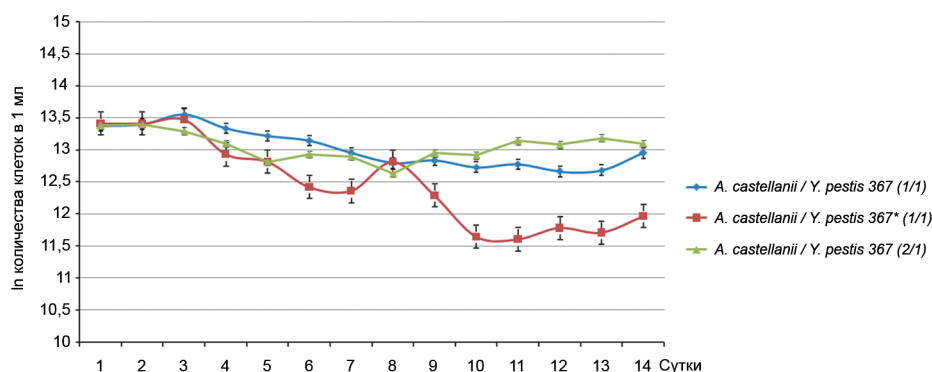


Рис. 3. Динамика роста клеток *A. castellanii* при совместном культивировании с *Y. pestis* 367 в соотношении 1/1 и 2/1. В качестве контроля использовалась культура акантамеб с инактивированной культурой *Y. pestis* 367 (отмечена*)

Однако отсутствие жизнеспособных клеток *Y. pestis* 367 в контрольной пробирке как источника питания не только задерживает рост амёб, но и негативно влияет на концентрацию клеток (рис. 3). Вероятно, приспособление акантамеб к питанию инактивированными клетками *Y. pestis* 367 более замедлено (рис. 3) по сравнению с амёбами в двух других пробирках в связи с лизисом при инактивации клеток и выхода токсинов в среду. Схожая с описанной выше динамика роста *Y. pestis* 367 при совместном культивировании с *A. castellanii* наблюдалась при соотношении исходных концентраций 1/10 и 1/20.

Определение внутриклеточной локализации клеток *Y. pestis* в клетках акантамеб проводили с помощью модифицированного метода флуоресцирующих антител (МФА) с использованием микроскопа AXIO Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия). Материал для окрашивания препаратов МФА наносили на предметное стекло и высушивали при комнатной температуре. Далее мазки фиксировали в течение 1 ч в 96 % этиловом спирте, высушивали на воздухе и обрабатывали последовательно 2 % Triton X-100, 1 % Tween 20 (Sigma, США) в течении 30 мин на стекле. Антитела разводили до рабочего разведения и окрашивали препараты в соответствии с инструкцией производителя. Микроскопию проводили в УФ-свете с фильтром GFP и регистрации изображения с помощью цифровой камеры Axioscam 105 color Carl Zeiss (Carl Zeiss, Германия).

На рис. 4 отображены этапы взаимодействия *Y. pestis* 367 с клетками акантамеб в жидкой среде. В первые сутки происходит активный фагоцитоз бактериальных клеток и накопление их внутри пищеварительных вакуолей трофозоитов (рис. 4, А), что подтверждается падением количества КОЕ *Y. pestis* в

первые сутки наблюдения (рис. 2). Следующим этапом адаптации к среде с бактериальными клетками чумы стало образование цист амёб, как способа переживания неблагоприятных условий. Об инцистировании клеток амёб свидетельствует уменьшение их размеров и образование групп по несколько клеток на 3–4-е сутки проведения эксперимента (рис. 4, Б). В результате приспособления к среде с патогенными бактериями среди акантамеб наблюдались клетки, содержащие вакуоли с *Y. pestis* 367, наряду с лизированными клетками амёб (рис. 4, В). Вероятно, сохранение акантамеб, содержащих клетки возбудителя чумы, определяет адаптацию к жидкой среде с *Y. pestis* 367. Наличие механизма инцистирования и сохранение патогенных бактериальных клеток внутри вакуолей может быть одним из определяющих факторов сосуществования *Y. pestis* 367 и *A. castellanii*.

Полученные результаты совпадают с ранее полученными нами данными о локализации клеток *Y. pestis* в индивидуальных вакуолях в сети эндоплазматического ретикулума *Acanthamoeba sp.* и о возможности длительного сохранения возбудителя в этих амёбах [3]. Таким образом, нами впервые установлено наличие акантамеб *A. castellanii* в почве нор серого сурка *M. altaica* на глубине 70 см от входа на участке эпизоотической активности в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы. Численность акантамеб здесь очень высока – до 300000 кл./г почвы, что обеспечивает их массовый контакт с клетками *Y. pestis*, выделяемых с продуктами жизнедеятельности переносчика *M. altaica* и его блох. Проведенный анализ взаимодействия выделенных акантамеб и штаммов *Y. pestis*, полученных на этом же эпизоотическом участке, свидетельствует о конкурентном взаимодействии этих микроорганизмов и возможности со-

Анализ динамики взаимодействия акантамеб *A. castellanii* из почв Горно-Алтайского высокогорного очага и *Y. pestis* 367

Сутки	<i>Y. pestis</i> 367 / <i>A. castellanii</i> (1/1)		<i>Y. pestis</i> 367	<i>A. castellanii</i> / <i>Y. pestis</i> 367*	<i>Y. pestis</i> 367 / <i>A. castellanii</i> (1/2)	
	<i>Y. pestis</i>	<i>A. castellanii</i>			<i>Y. pestis</i>	<i>A. castellanii</i>
1-е	$5 \cdot 10^5 \pm 2,5 \cdot 10^4$	$6,4 \cdot 10^5 \pm 3,2 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^5 \pm 2,5 \cdot 10^4$	$6,675 \cdot 10^5 \pm 3,33 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^5 \pm 1,2 \cdot 10^4$	$6,45 \cdot 10^5 \pm 3,22 \cdot 10^4$
2-е	$5 \cdot 10^5 \pm 2,5 \cdot 10^4$	$6,6 \cdot 10^5 \pm 3,3 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^5 \pm 2,5 \cdot 10^4$	$6,675 \cdot 10^5 \pm 3,33 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^5 \pm 1,25 \cdot 10^4$	$6,6 \cdot 10^5 \pm 3,3 \cdot 10^4$
3-е	$3,3 \cdot 10^5 \pm 1,65 \cdot 10^4$	$7,7 \cdot 10^5 \pm 3,8 \cdot 10^4$	$90 \cdot 10^6 \pm 4,5 \cdot 10^6$	$7,05 \cdot 10^5 \pm 3,52 \cdot 10^4$	$4,8 \cdot 10^4 \pm 2,4 \cdot 10^3$	$5,925 \cdot 10^5 \pm 2,96 \cdot 10^4$
4-е	$30 \cdot 10^6 \pm 1,5 \cdot 10^6$	$6,2 \cdot 10^5 \pm 3,1 \cdot 10^4$	$720 \cdot 10^6 \pm 36 \cdot 10^6$	$4,125 \cdot 10^5 \pm 2,06 \cdot 10^4$	$2,6 \cdot 10^6 \pm 1,3 \cdot 10^5$	$4,875 \cdot 10^5 \pm 2,43 \cdot 10^4$
5-е	$150 \cdot 10^6 \pm 7,5 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^5 \pm 2,7 \cdot 10^4$	$210 \cdot 10^6 \pm 10,5 \cdot 10^6$	$3,675 \cdot 10^5 \pm 1,83 \cdot 10^4$	$140 \cdot 10^6 \pm 7 \cdot 10^6$	$3,675 \cdot 10^5 \pm 1,83 \cdot 10^4$
6-е	$60 \cdot 10^6 \pm 3 \cdot 10^6$	$5,1 \cdot 10^5 \pm 2,5 \cdot 10^4$	$210 \cdot 10^6 \pm 10,5 \cdot 10^6$	$2,475 \cdot 10^5 \pm 1,23 \cdot 10^4$	$110 \cdot 10^6 \pm 5,5 \cdot 10^6$	$4,125 \cdot 10^5 \pm 2,06 \cdot 10^4$
7-е	$6 \cdot 10^6 \pm 3 \cdot 10^5$	$4,2 \cdot 10^5 \pm 2,1 \cdot 10^4$	$100 \cdot 10^6 \pm 5 \cdot 10^6$	$2,325 \cdot 10^5 \pm 1,23 \cdot 10^4$	$12 \cdot 10^6 \pm 6 \cdot 10^5$	$3,975 \cdot 10^5 \pm 1,98 \cdot 10^4$
8-е	$1,7 \cdot 10^6 \pm 0,85 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^5 \pm 1,8 \cdot 10^4$	$140 \cdot 10^6 \pm 7 \cdot 10^6$	$3,675 \cdot 10^5 \pm 1,83 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^6 \pm 1,5 \cdot 10^5$	$3,075 \cdot 10^5 \pm 1,53 \cdot 10^4$
9-е	$3 \cdot 10^6 \pm 1,5 \cdot 10^5$	$3,75 \cdot 10^5 \pm 1,87 \cdot 10^4$	$350 \cdot 10^6 \pm 17,5 \cdot 10^6$	$2,175 \cdot 10^5 \pm 1,08 \cdot 10^4$	$10 \cdot 10^6 \pm 5 \cdot 10^5$	$4,2 \cdot 10^5 \pm 2,1 \cdot 10^4$
10-е	$14 \cdot 10^6 \pm 7 \cdot 10^5$	$3,375 \cdot 10^5 \pm 1,68 \cdot 10^4$	$250 \cdot 10^6 \pm 12,5 \cdot 10^6$	$1,14 \cdot 10^5 \pm 0,57 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^6 \pm 0,6 \cdot 10^5$	$4,05 \cdot 10^5 \pm 2,02 \cdot 10^4$
11-е	$20 \cdot 10^6 \pm 1 \cdot 10^6$	$3,525 \cdot 10^5 \pm 1,76 \cdot 10^4$	$250 \cdot 10^6 \pm 12,5 \cdot 10^6$	$1,09 \cdot 10^5 \pm 0,5475 \cdot 10^4$	$1,4 \cdot 10^6 \pm 0,7 \cdot 10^5$	$5,1 \cdot 10^5 \pm 2,55 \cdot 10^4$
12-е	$10 \cdot 10^6 \pm 5 \cdot 10^5$	$3,15 \cdot 10^5 \pm 1,57 \cdot 10^4$	$170 \cdot 10^6 \pm 8,5 \cdot 10^6$	$1,305 \cdot 10^5 \pm 0,6525 \cdot 10^4$	$40 \cdot 10^6 \pm 2 \cdot 10^6$	$4,8 \cdot 10^5 \pm 2,4 \cdot 10^4$
13-е	$20 \cdot 10^6 \pm 1 \cdot 10^6$	$3,225 \cdot 10^5 \pm 1,61 \cdot 10^4$	$210 \cdot 10^6 \pm 10,5 \cdot 10^6$	$1,215 \cdot 10^5 \pm 0,6075 \cdot 10^4$	$43 \cdot 10^6 \pm 2,15 \cdot 10^6$	$5,325 \cdot 10^5 \pm 2,66 \cdot 10^4$
14-е	$55 \cdot 10^6 \pm 2,75 \cdot 10^6$	$4,2 \cdot 10^5 \pm 2,1 \cdot 10^4$	$530 \cdot 10^6 \pm 26,5 \cdot 10^6$	$1,575 \cdot 10^5 \pm 0,7875 \cdot 10^4$	$110 \cdot 10^6 \pm 5,5 \cdot 10^6$	$4,875 \cdot 10^5 \pm 2,43 \cdot 10^4$

Примечания. В таблице приведены средние значения численности клеток *A. castellanii* и КОЕ *Y. pestis* 367 в различном соотношении исходных концентраций. *Инактивированная культура *Y. pestis* 367.

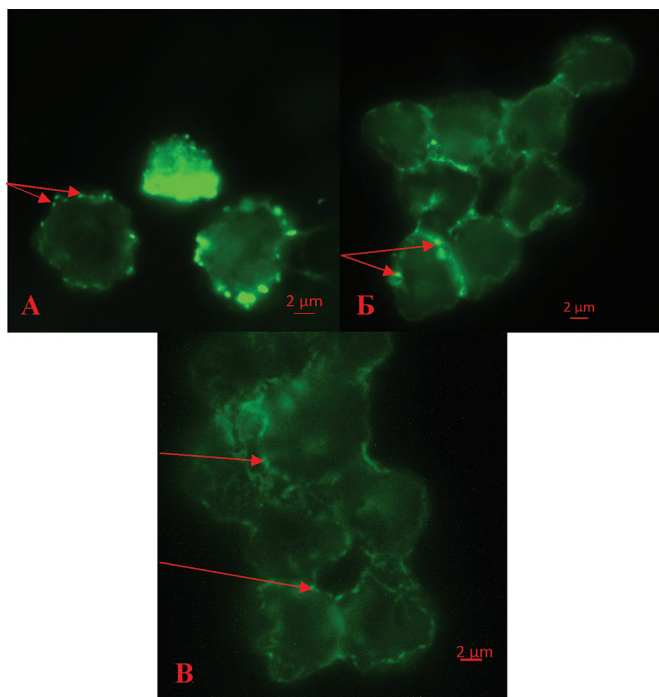


Рис. 4. Внутриклеточная локализация клеток штамма *Y. pestis* 367 в акантамебах *A. castellanii* из почвы Горно-Алтайского высокогорного очага. Материал отобран на 1-е (А), 3-и (Б) и 5-е (В) сутки совместного культивирования возбудителя чумы и клеток акантамеб в соотношении 1/1. Стрелками отмечены клетки *Y. pestis* 367 в индивидуальных вакуолях. Изображения получены на микроскопе AXIO Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия), с цифровой камерой AxioCam 105 color при увеличении 630×

хранения возбудителя чумы в вегетативных клетках и цистах акантамеб в почвенных биоценозах постоянных и временных нор сурка в Горно-Алтайском высокогорном очаге чумы.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Домарадский И.В. Не является ли чума протозоозом? (роль Protozoa в эпизоотологии чумы). *Мед. паразитол.* 1999; 2:10–13.
2. Кошель Е.И., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Видяева Н.А., Гусева Н.П., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Определение систематической принадлежности почвенных амёб из очагов чумы Прикаспия на основе анализа участков рибосомного оперона. *Генетика*. 2015; 51:39–45. DOI: 10.7868/S0016675815010051.
3. Кошель Е.И., Ерошенко Г.А., Анисимова Л.В., Новичкова Л.А., Широков А.А., Буров А.М., Кузнецов О.С., Кутырев В.В. Оценка длительности сохранения штаммов *Yersinia pestis* в клетках почвенных амёб *Acanthamoeba sp.* в экспериментальных условиях. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 2:69–74. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-69-74.
4. Кутырев В.В., Ерошенко Г.А., Попов Н.В., Видяева Н.А., Коннов Н.П. Молекулярные механизмы взаимодействия возбудителя чумы с беспозвоночными животными. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2009; 4:7–12.
5. Кутырев В.В., Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Дёмина Ю.В., Пакскина Н.Д., Щучинов Л.В., Михайлов В.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.
6. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство 2-е изд. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
7. Попов Н.В., Кошель Е.И., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Формирование современных представлений о механизмах эн-

зоотии чумы. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 3(109):5–8.

8. Abd H., Johansson T., Golovliov I., Sandstrom G., Forsman M. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69:600–6. PMID: 12514047; PMCID: PMC152416.

9. Greub G., Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17:413–33. PMID: 15084508; PMCID: PMC387402.

10. Pelandakis M., Pernin P. Use of multiplex PCR and PCR restriction enzyme analysis for detection and exploration of the variability in the free-living amoeba *Naegleria* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68(4):2061–5. PMID: 11916734; PMCID: PMC123847.

11. Schroeder J., Booton G., Hay J., Niszl I., Seal D., Markus M., Fuerst P., Byers T. Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *Clin. Microbiol.* 2001; 39(5):1903–11. DOI: 10.1128/JCM.39.5.1903-1911.2001.

References

1. Domadarsky I.V. [Is not plague a protozoan disease? (The role of Protozoa in epizootiology of plague)]. *Med. Parazitol.* 1999; 2:10–3.
2. Koshel' E.I., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Vidyayeva N.A., Guseva N.P., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Determination of specific apturtenance of soil amoeba from plague foci of Pre-Caspian based on analysis of ribosomal operon regions]. *Genetika*. 2015; 51:30–45. DOI: 10.7868/S0016675815010051.
3. Koshel' E.I., Eroshenko G.A., Anisimova L.V., Novichkova L.A., Shirokov A.A., Burov A.M., Kuznetsov O.S., Kutyrev V.V. [Exploratory study of the long-term persistence of *Yersinia pestis* in the cells of soil-inhabiting ameba – *Acanthamoeba ssp.*]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 2: 69–74. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-69-74.
4. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Popov N.V., Vidyayeva N.A., Konnov N.P. [Molecular mechanisms of plague agent interaction with invertebrate animals]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2009; 4:7–12.
5. 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.
6. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. M.: 'Shiko'; CJSC; 2nd edition, 2013. 560 p.
7. Popov N.V., Koshel' E.I., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Formation of modern concepts on the mechanism of plague enzooty]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 3(109):5–8.
8. Abd H., Johansson T., Golovliov I., Sandstrom G., Forsman M. Survival and growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69:600–6. PMID: 12514047; PMCID: PMC152416.
9. Greub G., Raoult D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 2004; 17:413–33. PMID: 15084508; PMCID: PMC387402.
10. Pelandakis M., Pernin P. Use of multiplex PCR and PCR restriction enzyme analysis for detection and exploration of the variability in the free-living amoeba *Naegleria* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002; 68(4):2061–5. PMID: 11916734; PMCID: PMC123847.
11. Schroeder J., Booton G., Hay J., Niszl I., Seal D., Markus M., Fuerst P., Byers T. Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *Clin. Microbiol.* 2001; 39(5):1903–11. DOI: 10.1128/JCM.39.5.1903-1911.2001.

Authors:

Oglodin E.G., Morozov O.A., Nikiforov K.A., Kukleva L.M., Sharapova N.A., Makashova M.A., Germanchuk V.G., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.
Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Denisov A.V., Sanarov P.P. Altai Plague Control Station. 2, Zavodskaya St., Gorno-Altai, 649002, Russian Federation. E-mail: chuma@mail.gorny.ru.
Tokmakova E.G. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissersa St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Об авторах:

Оглодин Е.Г., Морозов О.А., Никифоров К.А., Куклева Л.М., Шарипова Н.А., Макашова М.А., Германчук В.Г., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

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

Токмакова Е.Г. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Поступила 16.11.17.

В.П.Попов¹, Т.В.Ватлина², М.В.Воробьева³, Д.С.Орлов⁴, В.Е.Безсмертный¹

РАЙОНИРОВАНИЕ СМОЛЕНСКОЙ ОБЛАСТИ ПО СТЕПЕНИ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ОПАСНОСТИ ПРИРОДНЫХ ОЧАГОВ ТУЛЯРЕМИИ

¹ФКУЗ «Противочумный центр», Москва; ²Смоленский государственный университет, Смоленск;
³ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Смоленской области», Смоленск; ⁴Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Российская Федерация

Цель работы. Выявление с помощью ГИС-технологий районов Смоленской области с разной степенью потенциальной эпидемической опасности по туляремии. **Материалы и методы.** Для ГИС-анализа использованы архивные данные ФБУЗ «ЦГиЭ в Смоленской области» Роспотребнадзора эпизоотического (1947–2015 гг.) и эпидемиологического мониторинга (1941–2015 гг.) энзоотических по туляремии территорий области, а также ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора и литературные данные. В программе Microsoft Excel созданы таблицы с данными по местам выделения возбудителя туляремии (161) и по населенным пунктам (423), где были зарегистрированы больные туляремией. Посредством Google Earth определены географические координаты базовых точек (населенные пункты). При помощи ГИС-пакета MapInfo Professional 10.5 сформирована база данных, получены слои по местам инфицирования людей, выделения возбудителя туляремии и выполнена электронная карта. **Результаты и выводы.** В результате ГИС-анализа эпизоотического и эпидемического проявлений природных очагов туляремии в 1941–2015 гг. выполнена дифференциация районов области по степени потенциальной эпидемической опасности. Установлено, что районы с высокой степенью потенциальной эпидемической опасности по туляремии и кратностью (более 10–15 лет) ее проявления (выделение культур, регистрации инфицирования людей) занимают 30 % Смоленской области. На территории области выявлено 42 участка стойкого (до 60 лет) сохранения природных очагов туляремии. Полученные результаты являются основой для усовершенствования тактики эпизоотологического мониторинга природных очагов туляремии Смоленской области и планирования объемов профилактических мероприятий.

Ключевые слова: туляремия, природно-очаговые болезни, эпизоотическая и эпидемическая дифференциация территории, степень потенциальной эпидемической опасности, ГИС-технологии.

Корреспондирующий автор: Попов Вячеслав Петрович, e-mail: protivochym@nln.ru.

V.P.Popov¹, T.V.Vatlina², M.V.Vorob'eva³, D.S.Orlov⁴, V.E.Bezsmertny¹

Zoning of the Smolensk Region by the Degree of Potential Epidemic Hazard of Natural Tularemia Foci

¹Plague Control Center, Moscow, Russian Federation; ²Smolensk State University, Smolensk, Russian Federation; ³Center of Hygiene and Epidemiology in the Smolensk Region, Smolensk, Russian Federation; ⁴M.V.Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Objective of the study is to find areas characterized by different degree of potential epidemic hazard as regards tularemia in the territory of the Smolensk Region using GIS-technologies. **Materials and methods.** GIS-analysis of the archive data of the Center of Hygiene and Epidemiology in the Smolensk Region, obtained in the process of epizootiological and epidemiological monitoring (1941–2015) of enzootic as regards tularemia territories, as well as of Plague Control Center of the Rospotrebnadzor and literature sources was carried out. By means of Microsoft Excel created were the tables with the data on the sites of isolation (a total of 161) and residential areas (all in all 423), where patients with tularemia had been registered. Via Google Earth application, geographical coordinates of the base points (residential areas) were identified. Using GIS software package MapInfo Professional 10.5, a database was created, the layers on sites of human infections and agent isolation were obtained, and electronic map was generated. **Results and discussion.** Following GIS-analysis of epizootic and epidemic manifestations of natural tularemia foci in 1941–2015, differentiation of the areas by the degree of potential epidemic hazard was performed. It was established that the districts with high degree of potential epidemic hazard as regards tularemia and recurrence rate (more than 10–15 years) of its manifestations (culture isolation, human infection reports) occupy 30 % of the Smolensk Region. In addition, 42 areas of durable persistence (up to 60 years) of natural tularemia foci were spotted. The results revealed are the basis for the enhancement of epizootiological monitoring strategy and specifying the scope of prophylactic measures.

Key words: tularemia, natural-focal infections, epizootic and epidemic differentiation, degree of potential epidemic hazard, GIS-technology.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Vyacheslav P. Popov, e-mail: protivochym@nln.ru.

Citation: Popov V.P., Vatlina T.V., Vorob'eva M.V., Orlov D.S., Bezsmertny V.E. Zoning of the Smolensk Region by the Degree of Potential Epidemic Hazard of Natural Tularemia Foci. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2017; 4:62–65. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-62-65

Территория Смоленской области считается эндемичной по туляремии с 1941 г. – года регистрации первых больных туляремией. За последние 75 лет накоплен большой фактический материал, характеризующий биоценотическую структуру и пространственно-временные особенности эпизоотической и эпидемической активности природных очагов туляремии на территории области. Природные очаги туляремии Смоленской области относятся к лугово-полевому типу и имеются во всех 25 районах, но степень их эпизоотической и эпидемической активности значительно отличается друг от друга [1].

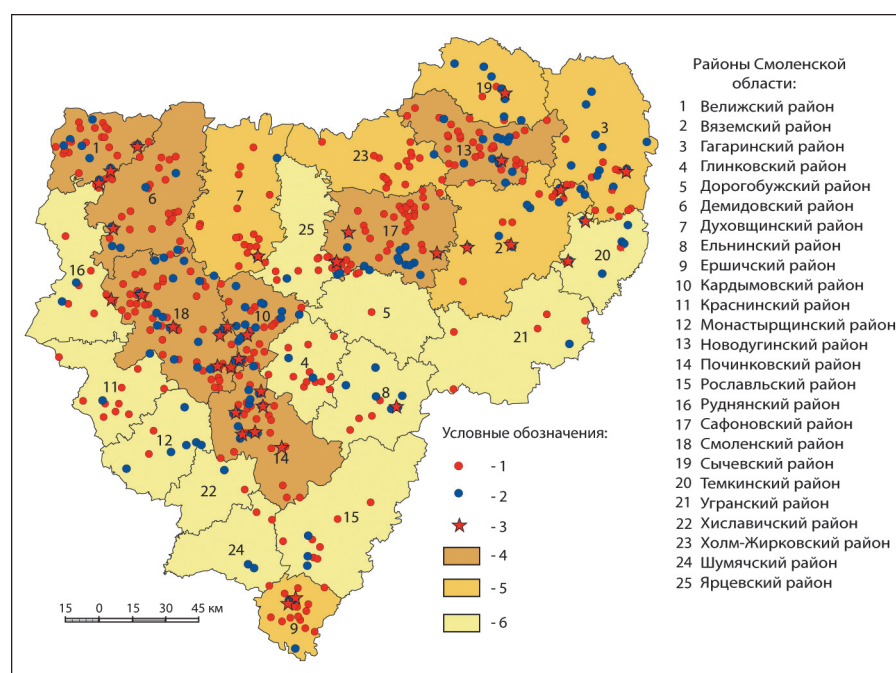
С 1941 по 2015 год в области заболело туляремией 2004 чел. За первые 10 лет – 1648 чел., что составило 82,2 % от всех заболевших за 75 лет мониторинга. Пик эпидемической активности природных очагов туляремии пришелся на 1947 г., когда заболело 836 чел. Последний заметный подъем эпидемической активности был в 1995 г., когда в п. Юбилейный Вяземского района заболел 91 чел. [2]. С 2001 по 2010 год в области регистрировались ежегодно 1–3 заболевания. Последний случай заболевания туляремией зарегистрирован в 2010 г. у жителя Смоленска, который заразился во время посещения родственников в Кардымовском районе. Единичные случаи заболевания людей туляремией отмечены в 321 на-

селенном пункте, заболело 344 чел., что составило 17,1 % от всех заболевших в области. С 2011 по 2015 год больные туляремией в области не регистрируются (таблица).

На территории Смоленской области за время эпизоотологического мониторинга из различных объектов внешней среды изолировано 319 культур возбудителя туляремии, в том числе от мелких млекопитающих – 118 (36,99 %), от иксодовых клещей – 161 (50,47 %), из различных водных объектов – 34 (10,65 %), из подснежных гнезд грызунов – 4, по одной от домашней кошки и слепня. Культуры возбудителя туляремии выделены во всех районах области, кроме Дорогобужского и Ярцевского. В настоящее время основной носитель туляремии на территории Смоленской области: обыкновенная полевка (*Microtus arvalis*) – 46 (39 %) культур; второстепенные – полевая мышь (*Apodemus agrarius*) – 16 (13,55 %) и домовая мышь (*Mus musculus*) – 18 культур (15,25 %), в разное время от которой культуры были выделены в Гагаринском, Глинковском, Демидовском, Кардымовском, Руднянском, Сычевском, Смоленском, Новодугинском и Сафоновском районах. В эпизоотии также вовлекались мышь-малютка, обыкновенная бурозубка, водяная и общественная полевки, обыкновенный крот, рыжая полевка и полевка-экономка.

Эпизоотическая и эпидемическая активность природных очагов туляремии Смоленской области (1941–2015 гг.)

Район	Количество					Площадь, км ²	Население, тыс. чел.	Всего населенных пунктов	Число совпадений эпизоотических и эпидемических проявлений
	заболевших людей	эпидемических лет	пораженных населенных пунктов	выделенных культур	эпизоотий, лет				
Велижский	105	8	28	21	6	1373	11,045	156	4
Вяземский	112	10	16	18	7	338	76,375	331	3
Гагаринский	35	11	16	23	7	2901	45,316	256	3
Глинковский	55	3	12	2	2	1223	4,384	233	0
Демидовский	92	9	27	9	5	2512	11,876	231	2
Дорогобужский	2	2	2	0	0	1772	27,118	127	0
Духовщинский	47	7	21	10	3	2611	17,000	234	3
Ельнинский	18	4	9	7	5	1808	13,581	172	2
Ершицкий	79	6	17	8	3	1039	6,283	79	2
Кардымовский	110	15	25	46	15	1093	12,629	161	3
Краснинский	40	8	11	1	1	1508	12,145	182	0
Монастырский	35	1	2	9	5	1514	9,283	209	0
Новодугинский	464	4	36	36	8	1922	9,460	218	1
Починковский	113	5	33	22	10	2381	30,574	233	5
Рославльский	9	8	8	7	2	3032	71,427	314	0
Руднянский	9	7	7	2	2	2111	23,239	212	0
Сафоновский	335	6	55	24	7	2258	58,538	224	3
Смоленский	138	13	49	28	8	2895	54,078	423	7
Сычевский	11	7	9	33	11	1804	13,745	132	1
Темкинский	2	2	2	8	4	1324	5,960	133	2
Угранский	9	3	5	1	1	2869	7,992	203	0
Хиславичский	4	1	2	1	1	1161	7,967	157	0
Холм-Жирковский	163	7	21	1	1	3033	9,642	178	1
Шумяцкий	8	4	3	2	2	1368	9,759	140	0
Ярцевский	9	4	7	0	0	1619	53,403	130	0
ИТОГО:	2004	155	423	319	116	50469	602,919	5068	42



Потенциальная эпидемическая опасность природных очагов туляремии Смоленской области:

1 – места заражения людей туляремией; 2 – места выделения культур возбудителя туляремии; 3 – точки совпадения мест выделения культур возбудителя и заражения людей туляремией; 4 – районы с высокой эпидемической опасностью; 5 – районы со средней эпидемической опасностью; 6 – районы с низкой эпидемической опасностью

Значительную роль в поддержании эпизоотической активности природных очагов туляремии в Смоленской области играют иксодовые клещи, от которых была изолирована 161 культура возбудителя туляремии, что составляет более половины (50,47 %) от всех выделенных культур. Основной хранитель инфекции – клещ *Dermacentor reticulatus*, второстепенный – *Ixodes ricinus*. Первые культуры возбудителя туляремии выделены в 1949 г. от клещей в Демидовском, Кардымовском, Сафоновском и Темкинском районах, последние – в 2010 г. в Ельнинском и Шумячском районах. Наиболее активные эпизоотии туляремии со значительным количеством выделенных культур от клещей (119) зарегистрированы в Велижском, Гагаринском, Духовщинском, Кардымовском, Сафоновском, Смоленском, Сычевском и Темкинском районах.

За время эпизоотического мониторинга из различных водных объектов изолировано 34 культуры возбудителя туляремии в 14 районах. Первые культуры были выделены в Кардымовском районе в 1950 г., последние – в 2013 г. в Рославльском и Хиславичском районах. Подавляющее количество культур (27) изолировано в Кардымовском, Новодугинском, Починковском, Смоленском и Сычевском районах.

Для районирования Смоленской области по степени потенциальной эпидемической опасности проанализирована эпидемическая и эпизоотическая активность природных очагов туляремии за 75-летний период наблюдений по годовым кратностям эпидемических и эпизоотических проявлений туляремийной инфекции.

На основании результатов анализа пространственных особенностей эпидемических и эпизоотических проявлений природных очагов туляремии в 1941–2015 гг. проведено районирование Смоленской области по степени потенциальной эпидемиологиче-

ской опасности (высокая, средняя, низкая) энзоотических территорий (рисунок).

К территориям с высокой степенью потенциальной эпидемической опасности относятся Велижский, Демидовский, Кардымовский, Новодугинский, Починковский, Сафоновский и Смоленский районы. Эпизоотии туляремии регистрировались в течение 32 лет. Изолировано 186 культур возбудителя туляремии, из которых 80 – от иксодовых клещей. Эпидемические проявления туляремии регистрировались в течение 30 лет, заболело 1357 чел. в 253 населенных пунктах. К территориям со средней степенью потенциальной эпидемической опасности относятся Вяземский, Гагаринский, Духовщинский, Ершичский, Сычевский и Холм-Жирковский районы. Эпизоотические проявления отмечены в течение 19 лет. Выделено 93 культуры возбудителя туляремии, из которых иксодовых клещей – 43. Эпидемические проявления туляремии зарегистрированы в 100 населенных пунктах в течение 29 лет, заболело 447 чел. К территориям с низкой степенью эпидемической опасности относятся Глинковский, Дорогобужский, Ельнинский, Краснинский, Монастырщинский, Рославльский, Руднянский, Темкинский, Угранский, Хиславичский, Шумячский и Ярцевский районы. Их площадь составляет 21309 км² или 42,8 % от всей площади области. Эпизоотии туляремии зарегистрированы в течение 14 лет, выделено 40 культур, из которых 27 – от иксодовых клещей. Эпидемические проявления зарегистрированы в течение 26 лет, заболело 200 чел. в 70 населенных пунктах, в пяти из них выделены культуры туляремии и зарегистрированы больные.

Применение современных ГИС-технологий позволяет выявить участки длительного сохранения природных очагов туляремии и их эпидемического проявления и тем самым определить во времени степень их

устойчивости. Такая работа проведена в Московской области [3]. В Смоленской области совпадения мест выделения культур туляремии с регистрацией больных выявлены в 42 населенных пунктах, что составило 9,92 % от 423 населенных пунктов, где заболели люди. С учетом различной степени потенциальной эпидемической опасности районов области проведен анализ распределения мест совпадений. В районах с высокой степенью эпидемической опасности совпадения зарегистрированы во всех районах 25 населенных пунктов. Изолировано 53 культуры: из них 31 – от клещей, 15 – от мелких млекопитающих и 7 – из водных источников. В районах со средней степенью эпидемической опасности совпадения отмечены на территории всех районов 13 населенных пунктов. Здесь выделено 20 культур возбудителя туляремии, в том числе от клещей – 6, из воды – 5, от мелких млекопитающих – 9. Из 12 районов с низкой степенью эпидемической опасности совпадения были в трех районах и четырех населенных пунктах, где выделено 8 культур возбудителя туляремии (7 – от клещей и 1 – от домовой мыши). Всего в местах совпадений выделена 81 культура или 25,4 % от всех культур, изолированных в области за годы мониторинга, в том числе 44 культуры от иксодовых клещей (54,32 %), из различных водных источников – 12, от мелких млекопитающих – 25. В 10 населенных пунктах Велижского, Демидовского, Починковского, Сафоновского, Смоленского, Гагаринского, Ершичского и Сычевского районов области, где зарегистрированы случаи заболевания людей туляремией, отмечено 2–3-кратное выделение культур (всего 41) возбудителя туляремии. Это подтверждает наличие в области участков стойкого сохранения инфекции в течение длительного времени.

Особо следует подчеркнуть важную роль иксодовых клещей в формировании таких участков. По районам различной степени потенциальной эпидемической опасности выделение культур от иксодовых клещей выглядит следующим образом. В районах с высокой степенью эпидемической опасности выделено 84 культуры (45,2 %) из 186 культур, выделенных в этих районах. В районах со средней эпидемической опасностью выделено 50 (53,76 %) из 93 культур. В районах с низкой степенью эпидемической опасности выделено 27 (67,5%) из 40 культур. Таким образом, иксодовые клещи играют основную роль в сохранении и поддержании эпизоотической активности природных очагов туляремии лугово-полевого типа.

С 2010 по 2015 год в области выделено 18 культур возбудителя туляремии. В районах с высокой эпидемической опасностью выделено 10 культур: в Починковском, Сафоновском и Смоленском районах. В районах со средней эпидемической опасностью выделена 1 культура в Холм-Жирковском районе. В районах с низкой эпидемической опасностью изолировано 7 культур возбудителя туляремии в Глинковском, Ельнинском, Шумячском, Монастырщинском, Рославльском и Хиславичском

районах. Впервые за все время исследования природных очагов туляремии в Холм-Жирковском и Хиславичском районах области выделено 2 культуры возбудителя туляремии. Культуры выделены от домовых мышей (5), клещей (2) и воды (11), что говорит о низкой эпизоотической активности природных очагов туляремии в последние годы.

Проведенная работа по районированию области по степени потенциальной эпидемической опасности территории Смоленской области позволила оптимизировать режим эпизоотологического обследования природных очагов туляремии. Районы с высокой степенью эпидемической опасности необходимо исследовать два раза в год (весна и осень), со средней степенью – один раз в год (весной), с низкой степенью – следует обследовать силами районных филиалов один раз в год (весной), что позволит эффективно использовать имеющиеся возможности ФБУЗ «Центра гигиены и эпидемиологии в Смоленской области».

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ватлина Т.В. Очаги туляремии в Смоленской области. *Изв. Смоленского гос. ун-та*. 2009; 2(6):111–9.
2. Ватлина Т.В., Попов В.П., Орлов Д.С. Особенности распространения очагов туляремии в ландшафтах Смоленской области. *Изв. Смоленского гос. ун-та*. 2014; 1(25):333–43.
3. Попов В.П., Орлов Д.С., Безсмертный В.Е. Эпизоотическая и эпидемиологическая обстановка в природных очагах туляремии на территории Центрального федерального округа Российской Федерации в 1992–2011 гг. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 4(114):10–4.

References

1. Vatlina T.V. [Tularemia foci in the Smolensk Region]. *News of the Smolensk State University*. 2009; 2(6):111–9.
2. Vatlina T.V., Popov V.P., Orlov D.S. [Peculiarities of tularemia foci distribution across the landscapes of the Smolensk Region]. *News of the Smolensk State University*. 2014; 1(25):333–43.
3. Popov V.P., Orlov D.S., Bezsmertny V.E. [Epizootic and epidemiological situation in natural tularemia foci in the territory of the Central Federal District of the Russian Federation in 1992–2011]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 4(114):10–4.

Authors:

- Popov V.P., Bezsmertny V.E. Plague Control Center. 4, Musorgskogo St., Moscow, 127490, Russian Federation. E-mail: protivochym@nln.ru.
 Vatlina T.V. Smolensk State University. 4, Przhhevalskogo St., Smolensk, 214000, Russian Federation.
 Vorob'eva M.V. Center of Hygiene and Epidemiology in the Smolensk Region. 12, Tulskiy pereulok, Smolensk, 214013, Russian Federation.
 Orlov D.S. M.V. Lomonosov Moscow State University. 1, Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation.

Об авторах:

- Попов В.П., Безсмертный В.Е. Противочумный центр. Российская Федерация, 127490, Москва, ул. Мусоргского, 4. E-mail: protivochym@nln.ru.
 Ватлина Т.В. Смоленский государственный университет. Российская Федерация, 214000, г. Смоленск, ул. Пржевальского, 4. E-mail: vatlina_geo@mail.ru.
 Воробьева М.В. Центр гигиены и эпидемиологии в Смоленской области. Российская Федерация, 214013, Смоленск, Тульский пер., 12. E-mail: San_epid@bk.ru.
 Орлов Д.С. Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова. Российская Федерация, 119991, Москва, Ленинские горы, 1. E-mail: orlovds@list.ru.

Поступила 11.01.17.

А.Ю.Попова^{1,2}, А.Н.Куличенко³, О.В.Малецкая³, В.М.Дубянский³, Ю.В.Дёмина¹, Н.Д.Пакскина¹,
Ю.М.Тохов³, Е.А.Манин³, Е.В.Лазаренко³, О.Х.Шаяхметов³, М.В.Фёдорова⁴, В.Г.Оробей⁵,
Ю.В.Юничева⁶, Н.С.Комарова⁷, А.В.Топорков⁸, Д.В.Викторов⁸, Т.В.Гречаная⁹, П.Н.Николаевич⁹,
О.А.Куличенко¹⁰, В.В.Пархоменко¹⁰

МЕРОПРИЯТИЯ ПО РЕГУЛЯЦИИ ЧИСЛЕННОСТИ КОМАРОВ *Aedes aegypti* И *Aedes albopictus* В Г. СОЧИ В 2016 г., РЕЗУЛЬТАТЫ И ПУТИ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ

¹Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва;

²ФГБОУ «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования, Москва;

³ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь;

⁴ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии», Москва; ⁵Территориальный отдел Управления Роспотребнадзора по Краснодарскому краю в городе-курорте Сочи, Сочи; ⁶Сочинское ПЧО ФКУЗ «Причерноморская ПЧС», Сочи; ⁷Филиал ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае» в городе-курорте Сочи, Сочи; ⁸ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград; ⁹Управление Роспотребнадзора по Краснодарскому краю, Краснодар; ¹⁰ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае», Краснодар, Российская Федерация

Цель работы. Оценить эффективность противокомариных мероприятий (в отношении комаров *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus*) на территории Сочи с целью оценки их эффективности и определения путей совершенствования тактики инсектицидных, в том числе ларвицидных, обработок. **Материалы и методы.** Проанализированы данные мониторинга в 156 точках учета численности комаров, 57 из которых располагались на объектах, подвергшихся обработке, в том числе и неоднократной. Учет численности комаров проводили методом «на наблюдателя» за 20 мин. Статистическую обработку данных осуществляли с применением пакета «Past». Различия средних значений рассчитывались с использованием критерия Манна-Вилкоксона-Уитни. В точках выявления комаров *Ae. aegypti* или *Ae. albopictus* целенаправленно осуществляли дополнительные противокомариные обработки. **Результаты и выводы.** В 2016 г. отмечена крайне низкая численность комаров *Ae. aegypti*. Численность комаров *Ae. albopictus* охарактеризована как высокая: было учтено свыше 11000 экземпляров на участке от государственной границы с Республикой Абхазия на востоке до Новороссийска, включительно, на западе. Самая высокая численность комаров *Ae. albopictus* отмечена на территории кладбищ. Проведенные противокомариные работы показали их эффективность на урбанизированных территориях и части парковых зон с высоким количеством постоянно проживающего населения и туристов за счет более высокой плотности обработок, малого количества мест, благоприятных для выплода комаров *Ae. albopictus* непосредственно на указанных территориях и вблизи них. С целью предотвращения распространения комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* на территорию эпидемически значимых объектов с соседних участков мониторинг их численности необходимо продолжать на всей территории города и во всех потенциальных местах обитания. Актуальным остается продолжение мониторинговых мероприятий на всем черноморском побережье в связи с возможностью дальнейшего расширения ареала обитания этих комаров.

Ключевые слова: комары *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, численность, противокомариные обработки.

Корреспондирующий автор: Дубянский Владимир Маркович, e-mail: snipchi@mail.stv.ru.

A.Yu.Popova^{1,2}, A.N.Kulichenko³, O.V.Maletskaia³, V.M.Dubyansky³, Yu.V.Demina¹, N.D.Pakskina¹,
Yu.M.Tokhov³, E.A.Manin³, E.V.Lazarenko³, O.Kh.Shayakhmetov³, M.V.Fedorova⁴, V.G.Orobey⁵,
Yu.V.Yunicheva⁶, N.S.Komarova⁷, A.V.Toporkov⁸, D.V.Viktorov⁸, T.V.Grechanaya⁹, P.N.Nikolaevich⁹,
O.A.Kulichenko¹⁰, V.V.Parkhomenko¹⁰

Measures Undertaken for *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Control in 2016 in Sochi, Results and Ways of Improvement

¹Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation;

²Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russian Federation; ³Stavropol Research Anti-Plague

Institute, Stavropol, Russian Federation; ⁴Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation ⁵Territorial

Department of the Rospotrebnadzor Administration in the Krasnodar Territory in the resort city of Sochi, Sochi, Russian Federation;

⁶Sochi Plague Control Department of the Black Sea Region Plague Control Station, Sochi, Russian Federation; ⁷Affiliated Branch

of the Center of Hygiene and Epidemiology in the Krasnodar Territory in the resort city Sochi, Sochi, Russian Federation; ⁸Volgo-

grad Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation; ⁹Rospotrebnadzor Administration in the Krasnodar Territory,

Krasnodar, Russian Federation; ¹⁰Center of Hygiene and Epidemiology in the Krasnodar Territory, Krasnodar, Russian Federation

Objective of the study is to assess the effectiveness of anti-mosquito measures (against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes) in the territory of Sochi and determine the ways to improve the tactics of insecticide, including larvicide, treatments. **Materials and methods.** The monitoring data were analyzed in 156 points of mosquito numbers counting, 57 of which were located at sites that were subjected to treatment, including repeated ones. The count of mosquitoes was carried out by the “observer” method within 20 minutes. Statistical processing of the data was carried out using the “Past” package. Differences in mean values were calculated using the Mann-Wilcoxon-Whitney test. At the points of detection of *Ae. aegypti* or *Ae. albopictus* mosquitoes additional targeted anti-mosquito treatments were carried out. **Results and conclusions.** In 2016, an extremely low numbers of mosquitoes *Ae. aegypti* were observed. Abundance of mosquitoes *Ae. albopictus* is described as “high”: more than 11,000 specimens were collected in the

territory stretching from the state border with the Republic of Abkhazia in the east to the city of Novorossiysk, inclusive, to the west. The highest numbers of mosquitoes *Ae. albopictus* were registered in the territory of cemeteries. Performed anti-mosquito activities demonstrated their effectiveness in urbanized areas and some park zones with a high numbers of permanently residing population and tourists due to higher treatment density, small number of places favorable for the breeding of mosquitoes *Ae. albopictus* directly in these territories and nearby. To prevent the spread of mosquitoes *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* in the territory of epidemically significant objects from neighboring sites, monitoring of their numbers should be continued throughout the city and in all potential habitats. The continuation of monitoring activities across the entire Black Sea coast remains a topical issue due to the possibility of further expansion of the mosquitoes areal.

Key words: mosquitoes *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, numbers, anti-mosquito treatments.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Vladimir M. Dubyansky, e-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Citation: Popova A.Yu., Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Dubyansky V.M., Demina Yu.V., Paskina N.D., Tokhov Yu.M., Manin E.A., Lazarenko E.V., Shayakhmetov O.Kh., Fedorova M.V., Orobey V.G., Yunicheva Yu.V., Komarova N.S., Toporkov A.V., Viktorov D.V., Grechanaya T.V., Nikolaevich P.N., Kulichenko O.A., Parkhomenko V.V. Measures Undertaken for *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Control in 2016 in Sochi, Results and Ways of Improvement. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 4:66–71. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-66-71

В настоящее время в мире сохраняется напряженная обстановка по инфекциям, переносчиками которых являются кровососущие насекомые, в первую очередь комары. В последние годы осложнилась ситуация по лихорадке Зика, а также лихорадкам денге и чикунгунья. Многолетние наблюдения за комарами *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus*, переносчиками возбудителей этих инфекций, свидетельствуют о расширении их ареала в мире, возможно, в связи с глобальным потеплением климата [5, 8]. В Причерноморском регионе Краснодарского края и Республики Абхазия к 2015 г. популяции комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* выявлены на территории от г. Сухум до п. Джубги Туапсинского района [1, 2, 4, 6]. Несмотря на то, что факты передачи вируса Зика человеку комарами *Ae. albopictus* в природных условиях отсутствуют (возможность их инфицированности подтверждена только экспериментально), они являются эффективными переносчиками более 20 арбовирусов [7, 10], в том числе Западного Нила, денге, чикунгунья, желтой лихорадки, а у комаров *Ae. albopictus*, собранных в 2015 г. на территории Туапсинского района, обнаружена РНК вируса Западного Нила [3]. При недавней вспышке лихорадки денге и чикунгунья в Европе комары *Ae. albopictus* были основным переносчиком возбудителей этих инфекций [9].

Для профилактики опасных арбовирусных инфекционных болезней, в том числе лихорадки Зика, в 2016 г. в Российской Федерации проведен комплекс мероприятий по мониторингу и регуляции численности комаров этих видов на черноморском побережье Краснодарского края.

В статье приводятся данные по результатам противокомариных мероприятий в отношении комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* на территории Сочи с целью оценки их эффективности и определения путей совершенствования тактики инсектицидных, в том числе ларвицидных, обработок.

Материалы и методы

Мониторинговые и противокомариные мероприятия в Сочи осуществлялись в открытых и за-

крытых стационах с марта по ноябрь 2016 г. согласно МР 3.5.1.0109-16 и МР 3.5.2.0110-16 в соответствии с «Планом мероприятий Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по недопущению завоза и распространения лихорадки Зика на территории Российской Федерации» (утвержден руководителем Роспотребнадзора 10.02.2016).

Энтомологический мониторинг численности комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* в каждой точке наблюдения проводили на постоянной основе энтомологи учреждений Роспотребнадзора Краснодарского края и ФКУЗ «Причерноморская противочумная станция». Периодический контроль численности и анализ особенностей распространения комаров осуществляли специалисты ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» и ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора. Сеть точек стационарного мониторинга, общим количеством 156, охватывала всю территорию города. Минимальная плотность точек – одна на 1 км². Их расположение исходно не связано с местами проведения противокомариных обработок. Анализ численности комаров на этих участках дал возможность оценить состояние популяций комаров в целом по данному ландшафту (территории). Учет численности осуществляли с периодичностью 7–14 сут. В 57 точках мониторинга, расположенных в местах обитания комаров, проводили дезинсекционные обработки (табл. 1). Эффективность инсектицидных работ оценивали на 3-и и 14-е сутки после их проведения. Сочи разделили на семь урбанизированных и природных ландшафтных территорий для более объективного и подробного анализа.

Противокомариные работы включали санитарную очистку населенных пунктов и проведение дезинсекционных (в т.ч. ларвицидных) обработок для уничтожения имаго и личинок комаров, прежде всего на территории эпидемически значимых объектов (ЭЗО) – в аэропорту, морпортах, автомобильном и пешеходном пунктах пропуска через государственную границу «Псоу», возле ЛПО, крупных гостиниц, санаториев, пансионатов. Инсектицидные обработки проводились при благоприятных метео-

Таблица 1

Распределение мониторинговых точек наблюдения за комарами *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus*

Урбанизированные и природные ландшафтные территории Сочи	Общее количество точек стационарного мониторинга	Количество точек в местах, где проводились инсектицидные обработки
Эпидемически значимые объекты в урбанизированной части города	19	6
Парки внутри города	25	15
Лесопарковые зоны	24	6
Городские кладбища	38	30
Природные и искусственные водоемы с отсутствием твердых стенок	22	0
Частная малоэтажная застройка	16	0
Поймы рек, ливневая канализация, прибрежная полоса (объединены в силу малого количества учетных точек)	12	0
Итого:	156	57

условиях генераторами холодного тумана с использованием препаратов: ларвициды на основе энтомобактерий (Ларвиоль, Ларвиоль паста, Бактицид), синтетические пиретроиды, содержащие 25 % циперметрина (Цифокс, Альпицид, Ципермитрин, Юракс, Бриз, Медилис-Ципер), синтетические пиретроиды на основе 10 % зетациперметрина (Таран), фосфорорганические соединения на основе 25 % фентиона (Форс-Сайт). Работы выполнялись в соответствии с заключенными договорами со специализированными организациями, проведение работ контролировали Управление Роспотребнадзора по Краснодарскому краю и его территориальный отдел в Сочи, а эффективность обработок – ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае» и его филиал в Сочи.

В 2016 г. в Сочи против комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* обработано 3900,77 тыс. м² открытых и 245,9 тыс. м² закрытых стаций, в том числе 685

объектов, из которых 542 в урбанизированной части города (табл. 2). В местах обработок осуществляли оперативный пре- и постдезинсекционный мониторинг.

Учет численности комаров проводили методом «на наблюдателя» за 20 мин.

Статистическую обработку данных осуществляли с применением пакета «Past», <https://folk.uio.no/ohammer/past/>. Различия средних значений рассчитывались с использованием критерия Манна-Вилкоксона-Уитни.

Результаты и обсуждение

В 2016 г. отмечена крайне низкая численность комаров *Ae. aegypti*, которые были обнаружены только в открытых стациях Сочи в количестве 12 экземпляров: в марте – 1, мае – 10, июне – 1. Численность комаров *Ae. albopictus* в Сочи охарактеризована как высокая: учтено 9063 особи. Всего в Причерноморском регионе Российской Федерации в 2016 г. учтено свыше 11000 экз. комаров на участке от государственной границы с Республикой Абхазия на востоке до Новороссийска, включительно, на западе.

Начиная со второй декады марта, инсектицидные обработки проводили в закрытых стациях Сочи в местах обнаружения комаров (жилые застройки – подтопляемые подвалы, и т.д.). В дальнейшем (с апреля по сентябрь) обрабатывали открытые стации с учетом эпидзначимости объектов и данных энтомологического обследования.

Дезинсекционные работы в Сочи были преимущественно направлены на борьбу с имаго комаров. Ларвицидные обработки составляли от 6 до 18 % от общего объема обработанной площади.

Эффективность дезинсекционных мероприятий непосредственно в местах обработок практически всегда составляла 100 %. Однако площадь каждой ландшафтной территории на 1–2 порядка превышает

Таблица 2

Инсектицидные обработки на территории урбанизированных и природных ландшафтных зон Сочи

Урбанизированные и природные ландшафтные территории Сочи	Оперативная площадь обработок, тыс. м ²	Физическая площадь, тыс. м ²	Кратность обработок за сезон	Количество объектов, подлежащих обработкам	Средняя обработанная площадь на 1 объект, тыс. м ²
Эпидемически значимые объекты в урбанизированной части города	1620,32	540,11	3	542	2,99
Парки внутри города	505	126,25	4	43	11,74
Лесопарковые зоны	160	160,00	1	-	-
Городские кладбища	1465	732,50	2	34	43,09
Природные и искусственные водоемы с отсутствием твердых стенок	21,452	7,15	3	48	0,45
Частная малоэтажная застройка	0	0	0	0	0
Пойма рек, ливневая канализация, прибрежная полоса (объединены в силу малого количества учетных точек)	129	64,50	2	18	7,17
Итого:	3900,77	1630,51	-	685	5,70

площадь обработок, поэтому для анализа ситуации в целом по ландшафтным зонам использованы данные учета на всех стационарных точках мониторинга.

На территории эпидемически значимых урбанизированных объектов за анализируемый период имаго комаров регистрировались (при невысокой их численности – от 2 до 20) однократно на четырех объектах, двукратно – на одном (Центральный район Сочи, гостиница «Приморская»). После проведения инсектицидных работ комары *Ae. albopictus* на указанных территориях не обнаружены.

В зоне стационарных точек учета, расположенных на территории парков внутри города, обработки проводились в течение всего периода регистрации имаго комаров с мая по сентябрь. Численность периодически возрастала до 2–60, однако снижалась до нуля после проведения инсектицидных работ. Снова комары регистрировались через 10–15 дней, что свидетельствует о кратковременной эффективности выполненных противокомариных мероприятий. При пиковой численности *Ae. albopictus* в августе численность их восстанавливалась уже через три дня после обработок.

Лесопарковые зоны. По ландшафту отмечена высокая численность комаров *Ae. albopictus* – от 4 до 30 в июне–июле, до 50–70 имаго в августе–сентябре. На обработанных участках лесопарков эффективность инсектицидных работ удовлетворительная, что подтверждается статистически достоверной меньшей средней численностью комаров в период, когда проводились обработки (май–июль, среднее значение относительной численности – 4) с увеличением в период, когда обработки отсутствовали (август–сентябрь среднее значение относительной численности – 16,82). После обработок численность взрослых комаров уменьшалась на 76,22 %. По-видимому, за счет перелета с соседних необработанных участков комары снова появлялись на обработанных участках через 5–10 дней.

На территории кладбищ отмечена самая высокая численность комаров *Ae. albopictus*, которая достигала 139 особей в начале июля и 182 – в сентябре (максимальные значения). На обработанных кладбищах средняя численность комаров *Ae. albopictus* также продолжала оставаться высокой, однако статистически достоверно меньшей (25,38), чем в период, когда обработки не проводили (53,8 – в конце июля – начале августа).

На территории природных и искусственных водоемов с отсутствием твердых стенок (пруды, озера, реки) в точках учета комары отсутствовали, их личинки не обнаружены. Обозначенные водоемы не являлись местом выплода комаров *Ae. albopictus*.

В районах частных малоэтажных застроек регулярно фиксировали наличие *Ae. albopictus*, численность которых достигала 94 особей в августе и до 34–42 – в сентябре. Инсектицидные работы в частном секторе не проводились в связи с недостаточностью правовой базы, велась информационно-

разъяснительная работа с населением и санитарная очистка территории.

В зоне систем ливневой канализации с застойной водой комары не обнаружены.

Снижения численности комаров по городу, в течение эпидсезона 2016 г., удалось добиться лишь частично на отдельных ландшафтных территориях, в первую очередь на ЭЗО.

Проведенные противокомариные работы показали их эффективность на урбанизированных территориях и части парковых зон с высоким количеством постоянно проживающего населения и туристов за счет более высокой плотности обработок (в т.ч. ЭЗО), малого количества мест, благоприятных для выплода комаров *Ae. albopictus* непосредственно на указанных территориях и вблизи них.

На территориях с преобладающими природными ландшафтами (лесопарки и кладбища), где непосредственно проводились дезинсекционные мероприятия, эффективность в первые 1–3 сут составила 100 %, что является показателем правильно выбранных ключевых мест обработок для всего ландшафта. Долговременная эффективность проведенных работ оказалась низкой вследствие быстрого восстановления численности *Ae. albopictus* из-за сохранения благоприятных условий для выплода и перелета комаров этого вида из необработанных близлежащих биотопов, так как ни одна из анализируемых нами территорий не подвергалась тотальной противокомариной обработке.

Довольно слабый эффект обработок территории кладбищ (падение численности на 52,83 % в среднем) может быть связан с недостаточным размером площади обработок, а также с частыми дождями в Сочи, что приводило к формированию большого количества микроводоемов, пригодных для выплода комаров.

По результатам энтомологического мониторинга показано, что основными местами обитания комаров *Ae. albopictus* являются территории, имеющие множественные благоприятные условия для их развития – кладбища, малоэтажные жилые застройки и лесопарковые зоны. В лесопарках местами выплода комаров являются дупла деревьев, небольшие углубления почвы, пластиковый мусор; на кладбищах – вазы для цветов; на территории частных домовладений – приспособления для хранения воды, поилки для животных, различные емкости, в которых скапливается дождевая вода, и пр. Основная особенность дезинсекционных мероприятий в отношении *Ae. albopictus* состоит в том, что ларвицидные обработки должны проводиться точно и тщательно, без пропусков возможных мест их выплода в каждом городском ландшафте. Иначе комары из неохваченных участков смогут быстро заселить ранее обработанные территории.

С учетом опыта проведенной работы и видовых особенностей комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* тактика борьбы с ними на территории черноморско-

го побережья Российской Федерации должна включать следующие основные направления:

- выполнять первоочередные дезинсекционные (ларвицидные) мероприятия на территории ЭЗО, при этом, с учетом расстояния возможного разлета *Ae. albopictus*, проводить противокомариные обработки в радиусе 500 м от ЭЗО в местах благоприятных для выплода комаров этого вида;

- осуществлять санитарную очистку территории (уборка мусора, осушение и закапывание луж, постоянное осушение мелких водоемов антропогенного происхождения) постоянно и повсеместно как результативный и наименее затратный раздел работ по борьбе с комарами;

- осуществлять в открытых станциях преимущественно ларвицидные обработки, направленные на дезинсекцию каждого микроводоема на обрабатываемой территории, предварительные обработки в местах возможного выплода комаров начинать со 2-й декады апреля;

- осуществлять в закрытых станциях инсектицидные и ларвицидные обработки по показаниям (на основании данных энтомологического наблюдения), начиная со 2-й декады апреля;

- уделять в зонах частной малоэтажной застройки особое внимание информационно-разъяснительной работе среди населения и благоустройству территорий общего пользования.

С целью предотвращения распространения комаров *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* на территорию ЭЗО с соседних участков мониторинг их численности необходимо продолжать на всей территории города и во всех потенциальных местах обитания. В случае обнаружения комаров *Ae. albopictus* на расстоянии до 500 м от ЭЗО необходимо вносить корректировки в планы обработки территории. Проведение обработок крупных природных водоемов со стоячей и проточной водой, проточных ливневых канализаций по отношению к *Ae. albopictus* нецелесообразно. Актуальным остается продолжение мониторинговых мероприятий на всем черноморском побережье в связи с возможностью дальнейшего расширения ареала обитания этих комаров.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ганушкина Л.А., Безжонова О.В., Патраман И.В., Таныгина Е.Ю., Сергиев В.П. Распространение комаров *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. и *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skus. на Черноморском побережье Кавказа. *Мед. паразитол. и паразитарн. бол.* 2013; 1:45–6.
2. Ганушкина Л.А., Дремова В.П. Комары *Aedes aegypti* L., *Aedes albopictus* Skus. – новая биологическая угроза для юга России. *Мед. паразитол. и паразитарн. бол.* 2012; 3:49–54.
3. Ганушкина Л.А., Морозов Е.Н., Патраман И.В., Вышемирский О.И., Агумова А.А. Оценка рисков возникновения арбовирусных инфекций в России. *Мед. паразитол. и паразитарн. бол.* 2017; 1:9–14.
4. Ганушкина Л.А., Таныгина Е.Ю., Безжонова О.В., Сергиев В.П. Об обнаружении комаров *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skus. на территории Российской Федерации. *Мед. паразитол. и паразитарн. бол.* 2012; 1:3–4.

5. Попов И.О., Титкина С.Н., Семенов С.М., Ясюкевич В.В. Модельные оценки распространения переносчиков некоторых болезней человека в XXI веке в России и соседних странах. *Пробл. экол. мониторинга и моделирования экосистем.* 2013; 25:395–427.

6. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Дёмина Ю.В., Куличенко А.Н., Дубянский В.М., Малецкая О.В., Шапошникова Л.И., Тохов Ю.М., Топорков А.В., Виктор Д.В., Смелянский В.П., Жуков К.В., Шпак И.М., Бородай Н.В. Обеспечение эпидемиологического надзора и профилактики лихорадки Зика в Российской Федерации. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 2:5–10. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-5-10.

7. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Дёмина Ю.В., Топорков А.В., Виктор Д.В., Смелянский В.П., Жуков К.В., Бородай Н.В., Шпак И.М., Куличенко А.Н., Михеев В.Н., Малеев В.В., Шипулин А.Г. Лихорадка Зика: состояние проблемы на современном этапе. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 1:5–12. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-5-12.

8. Попова А.Ю., Топорков А.В., редакторы. Лихорадка Зика: эпидемиология, клиника, лабораторная диагностика и меры профилактики. Практическое руководство. Волгоград: Волга-Пресс; 2016. 192 с.

9. Переносчики вируса Зика и риск его распространения в Европейском регионе ВОЗ: [Электронный ресурс]. URL: http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0018/304263/Zika-virus-vectors-and-risk-of-spread-in-European-Region-RU.pdf (дата обращения 20.04.2017).

10. Ясюкевич В.В., Титкина С.Н., Попов И.О., Давидович Е.А., Ясюкевич Н.В. Климатозависимые заболевания и клещи-переносчики: возможное влияние наблюдаемого на территории России изменения климата. *Пробл. экол. мониторинга и моделирования экосистем.* 2013; 25:314–60.

References

1. Ganushkina L.A., Bezzhonova O.V., Patraman I.V., Tanygina E.Yu., Sergiev V.P. [Dissemination of mosquitoes *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. and *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skus. across the Black Sea coast of Caucasus]. *Med. Parazitol. Parazitarn. Bol.* 2013; 1:45–6.
2. Ganushkina L.A., Dremova V.P. [Mosquitoes *Aedes (Stegomyia) aegypti* L., *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skus. – new biological threat to the South of Russia]. *Med. Parazitol. Parazitarn. Bol.* 2012; 3:49–54.
3. Ganushkina L.A., Morozov E.N., Patraman I.V., Vyshemirsky O.I., Agumova A.A. [Assessment of risks of arboviral infection emergence in Russia]. *Med. Parazitol. Parazitarn. Bol.* 2017; 1:9–14.
4. Ganushkina L.A., Tanygina E.Yu., Bezzhonova O.V., Sergiev V.P. [Regarding detection of mosquitoes *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skus. in the territory of the Russian Federation]. *Med. Parazitol. Parazitarn. Bol.* 2012; 1:3–4.
5. Popov I.O., Titkina S.N., Semenov S.M., Yasyukevich V.V. [Model assessment of vector dissemination of some human diseases in the XXI century in Russia and neighboring states]. *Probl. Ecol. Monitoringa i Modelir. Ecosystem.* 2013; 25:395–427.
6. Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Kulichenko A.N., Dubyansky V.M., Maletskaya O.V., Shaposhnikova L.I., Tokhov Yu.M., Toporkov A.V., Viktorov D.V., Smelyansky V.P., Zhukov K.V., Shpak I.M., Boroday N.V. [Provision of epidemiological surveillance and prophylaxis of Zika fever in the Russian Federation]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 2:5–10. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-5-10.
7. Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Toporkov A.V., Viktorov D.V., Smelyansky V.P., Zhukov K.V., Boroday N.V., Shpak I.M., Kulichenko A.N., Mikheev V.N., Maleev V.V., Shipulin A.G. [Zika fever: the current state of the issues]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 1:5–12. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-5-12.
8. Popova A.Yu., Toporkov A.V., editors. [Zika Fever: Epidemiology, Clinical Picture, Laboratory Diagnostics, and Prophylactic Measures. Practice Guidelines]. Volgograd: "Volga-Press"; 2016. 192 p.
9. [Zika virus vectors and risk of its spread in the WHO European region]. [Internet] (cited: 20 Apr 2017). Available from: http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0018/304263/Zika-virus-vectors-and-risk-of-spread-in-European-Region-RU.pdf.
10. Yasyukevich V.V., Titkina S.N., Popov I.O., Davidovich E.A., Yasyukevich N.V. [Climate-related diseases and arthropod vectors: potential impact of the observed in the territory of Russia climate change]. *Probl. Ecol. Monitoringa i Modelir. Ecosystem.* 2013; 25:314–360.

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 of Continuing Professional Education; 2/1, Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russian Federation.

Demina Yu.V., Paskina 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.

Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Dubyansky V.M., Tokhov Yu.M., Manin E.A., Lazarenko E.V., Shayakhmetov O.Kh. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Fedorova M.V. Central Research Institute of Epidemiology. 3a, Novogireevskaya St., Moscow, 111123, Russian Federation. E-mail: crie@pcr.ru.

Orobey V.G. Territorial Department of the Rospotrebnadzor Administration in the Krasnodar Territory in the resort city of Sochi. 27, Roz St., Sochi, 354000, Russian Federation.

Yunicheva Yu.V. Sochi Plague Control Department of the Black Sea Region Plague Control Station. Sochi, Russian Federation.

Komarova N.S. Affiliated Branch of the Center of Hygiene and Epidemiology in the Krasnodar Territory in the resort city Sochi. 27, Roz St., Sochi, 354000, Russian Federation.

Toporkov A.V., Viktorov D.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Grechanaya T.V., Nikolaevich P.N. Rospotrebnadzor Administration in the Krasnodar Territory. 100, Rashpilevskaya St., Krasnodar, 350000, Russian Federation. E-mail: upravlenie@kubanrpn.ru.

Kulichenko O.A., Parkhomenko V.V. Center of Hygiene and Epidemiology in the Krasnodar Territory. Krasnodar, 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 непрерывного профессионального образования; Российская Федерация, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1.

Дёмина Ю.В., Пакскина Н.Д. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Российская Феде-

рация, 127994, Москва, Вадковский переулок, дом 18, строение 5 и 7.

А.Н.Куличенко, О.Х.Шаяхметов, Малецкая О.В., В.М.Дубянский, Тохов Ю.М., Манин Е.А., Лазаренко Е.В. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Фёдорова М.В. Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии. Российская Федерация, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а. E-mail: crie@pcr.ru.

Оробей В.Г. Территориальный отдел Управления Роспотребнадзора по Краснодарскому краю в городе-курорте Сочи. Российская Федерация, 354000, Краснодарский край, Сочи, ул. Роз, 27.

Юничева Ю.В. Сочинское ПЧО ФКУЗ «Причерноморская ПЧС. Российская Федерация, Сочи.

Комарова Н.С. Филиал ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае» в городе-курорте Сочи. Российская Федерация, 354000, Краснодарский край, Сочи, ул. Роз, 27.

Топорков А.В., Викторов Д.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Гречаная Т.В., Николаевич П.Н. Управление Роспотребнадзора по Краснодарскому краю. Российская Федерация, 350000, Краснодар, ул. Раппиловская, 100. E-mail: upravlenie@kubanrpn.ru

Куличенко О.А., Пархоменко В.В. Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае. Российская Федерация, Краснодар.

Поступила 02.05.17.

А.М.Поршаков¹, Ю.В.Кононова², В.А.Терновой², А.В.Зайковская², К.А.Никифоров¹, Д.А.Агафонов¹,
А.О.Семенцова², N.Keita³, С.А.Яковлев¹, А.Е.Нестеров², А.А.Сергеев², A.Toure⁴, S.Boumbaly⁴,
П.П.Никитин¹, А.А.Лопатин⁵, В.Б.Локтев²

ЦИРКУЛЯЦИЯ ЛИССАВИРУСОВ (*LYSSAVIRUS*) СРЕДИ МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

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

²ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Российская Федерация;

³Centre Universitaire de Kindia-Foulayah, Киндия, Гвинейская Республика;

⁴Institut de Recherche en Biologie Appliquée de Guinée à Kindia, Киндия, Гвинейская Республика;

⁵ФКУЗ «Противочумный центр», Москва, Российская Федерация

Цель работы. Изучение участия мелких млекопитающих Гвинейской Республики в циркуляции лиссавирусов. **Материалы и методы.** Исследования выполнены с использованием ОТ-ПЦР, нуклеотидная последовательность фрагментов кДНК лиссавирусов была определена при помощи секвенирования с последующим филогенетическим анализом. **Результаты и выводы.** На наличие РНК лиссавирусов методом ОТ-ПЦР с использованием родоспецифичных праймеров проанализировано 356 образцов головного мозга мелких млекопитающих, отловленных в пригородах г. Киндия в 2016 г. Образцы получены от диких животных, относящихся к отрядам Rodentia, Chiroptera, Eulipotyphla и Carnivora. РНК лиссавирусов обнаружена в 31 образце (8,7 %), для 14 ПЦР положительных образцов принадлежность к роду *Lyssavirus* была подтверждена определением и анализом нуклеотидных последовательностей полученных коротких кДНК фрагментов вирусного генома. Наличие РНК вируса бешенства в положительных пробах было исключено в ПЦР с помощью видоспецифических праймеров. В пуле образцов от черных крыс *Rattus rattus*, позитивных на наличие РНК лиссавирусов, была идентифицирована РНК, характерная для вида *Mokola lyssavirus*. Определена нуклеотидная последовательность фрагмента гена матричного белка М вируса Мокола. Генетический материал вируса Мокола впервые обнаружен в Гвинейской Республике.

Ключевые слова: лиссавирусы, Гвинейская Республика, вирус Мокола, черная крыса.

Корреспондирующий автор: Поршаков Александр Михайлович, e-mail: rusrapi@microbe.ru

A.M.Porshakov¹, Yu.V.Kononova², V.A.Ternovoy², A.V.Zaikovskaya², K.A.Nikiforov¹, D.A.Agafonov¹,
A.O.Sementsova², N.Keita³, S.A.Yakovlev¹, A.E.Nesterov², A.A.Sergeev², A.Toure⁴, S.Boumbaly⁴, P.P.Nikitin¹,
A.A.Lopatin⁵, V.B.Loktev²

Circulation of Lyssaviruses (*Lyssavirus*) among the Small Mammals in the Territory of the Republic of Guinea

¹Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation; ²State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Russian Federation; ³Centre Universitaire de Kindia-Foulayah, Kindia, Republic of Guinea;

⁴Institut de Recherche en Biologie Appliquée de Guinée à Kindia, Kindia, Republic of Guinea; ⁵Plague Control Center, Moscow, Russian Federation

Objective is to study the role of small mammals, habitant in the Republic of Guinea, in Lyssavirus circulation. **Materials and methods.** Investigations were conducted using RT-PCR; nucleotide sequence of Lyssavirus cDNA fragments was identified with the help of sequencing with further phylogenetic analysis. **Results and conclusions.** Tested have been 356 brain samples from small mammals for the presence of Lyssavirus RNA using RT-PCR with genus-specific primers. The animals were caught in the suburbs of Kindia city in 2016. The samples were obtained from wild animals pertaining to Rodentia, Chiroptera, Eulipotyphla, and Carnivora orders. Lyssavirus RNA was detected in 31 samples (8.7 %). For 14 PCR positive samples the appurtenance to Lyssavirus was confirmed through identification and analysis of nucleotide sequences of the collected short cDNA fragments of viral genome. The presence of rabies virus RNA in positive tests was excluded from PCR with the help of species specific primers. The pool of samples from black rats, *Rattus rattus*, positive for Lyssavirus RNA, contained RNA characteristic of *Mokola lyssavirus* species. Specified has been nucleotide sequence of matrix protein M gene fragment of Mokola virus. Genetic material of Mokola virus was detected in the Republic of Guinea for the first time ever.

Key words: lyssaviruses, Republic of Guinea, Mokola virus, black rat.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Alexander M. Porshakov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Porshakov A.M., Kononova Yu.V., Ternovoy V.A., Zaikovskaya A.V., Nikiforov K.A., Agafonov D.A., Sementsova A.O., Keita N., Yakovlev S.A., Nesterov A.E., Sergeev A.A., Toure A., Boumbaly S., Nikitin P.P., Lopatin A.A., Loktev V.B. Circulation of Lyssaviruses (*Lyssavirus*) among the Small Mammals in the Territory of the Republic of Guinea. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2017; 4:72–76. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-72-76

Род лиссавирусов (*Lyssavirus*) является одним из 13 родов семейства рабдовирусов (*Rhabdoviridae*) и состоит из 14 видов лиссавирусов [10]. Согласно

классификации, предложенной Д.Т.Наyman и соавт., лиссавирусы генетически неоднородны и разделяются на несколько филогенетических групп [4].

К I группе лиссавирусов относятся вирус бешенства, европейские, евразийские и австралийский лиссавирусы, а также африканский вирус Дювенхейдж; II группа включает в себя только африканские вирусы – Мокола, Лагос бат и Шимони бат; в филогенетическую группу III входят Западно-Кавказский лиссавирус летучих мышей, Икома и Ллейда лиссавирусы.

На Африканском континенте циркулируют 6 из 14 видов лиссавирусов – вирус бешенства, Лагос бат, Дювенхейдж, Мокола, Икома и Шимони бат [4]. По данным ВОЗ, бешенство является актуальной проблемой для здравоохранения большинства африканских стран, где существует высокий риск инфицирования людей этим вирусом [3]. Ежегодно в Африке регистрируется до 24 тыс. смертельных случаев бешенства среди людей [5]. Основным источником заражения людей являются больные бешенством собаки, в дикой природе вирус бешенства циркулирует среди плотоядных и копытных животных [11]. Среди других африканских лиссавирусов патогенными для человека являются Мокола и Дювенхейдж. Вирус Мокола впервые изолирован в 1968–1969 гг. в Нигерии из пула органов гигантской белозубки (*Crocidura flavescens manni*). Позже вирус выделяли от грызунов, невакцинированных и вакцинированных против бешенства собак и кошек, а также от людей [6]. Вирус Дювенхейдж неоднократно изолировали из головного мозга людей, умерших от заболевания, схожего с бешенством, а также от клинически здоровых насекомоядных рукокрылых [9]. Лиссавирус Лагос бат выделяли только от животных – рукокрылых, кошек, собак, мангустов [7]. Для лиссавирусов Икома и Шимони бат природный резервуар и патогенность для человека не установлены [1, 11].

Для Гвинейской Республики ранее была подтверждена циркуляция двух лиссавирусов – вирусов бешенства и Лагос бат [7, 12]. Целью данной работы являлось изучение возможного участия мелких млекопитающих Гвинейской Республики в циркуляции лиссавирусов.

Материалы и методы

Отлов наземных млекопитающих проводили в период с апреля по октябрь 2016 г., используя стандартные методики количественного учета и отлова мелких млекопитающих ловушками Геро (давилками) и капканами, отлов рукокрылых – с использованием паутинных сетей, сачков, а также ручной сбор в местах дневных убежищ (пещеры, заброшенные здания, растительность). Животные были отловлены в окрестностях г. Киндия – административного центра региона Киндия Гвинейской Республики.

Для исследования готовили 10 % гомогенаты головного мозга с использованием стерильного 0,9 % раствора хлорида натрия, которые центрифугировали 2 мин при 3000 об./мин. Далее добавля-

ли 100 мкл супернатанта к 300 мкл лизирующего раствора из комплекта «АмплиПрайм РИБО-преп» (ИнтерЛабСервис, Россия) и инкубировали 20 мин при температуре 65 °С. В случае большой выборки животных одного вида гомогенат готовили из пула фрагментов головного мозга, с количеством в пуле от 2 до 6. При учете результатов считали, что в пуле положителен один образец.

Выделение РНК проводили с использованием набора реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «АмплиПрайм РИБО-Преп» (ИнтерЛабСервис, Россия) согласно инструкции производителя. Построение кДНК проводили с использованием комплекта реагентов для получения кДНК на матрице РНК «Реверта-L» (ИнтерЛабСервис, Россия) согласно инструкции производителя.

Для выявления генетического материала лиссавирусов ПЦР проводили в два раунда с использованием родоспецифических праймеров, комплементарных участку гена нуклеопротеина N лиссавирусов [2]. Для постановки ПЦР использовали набор реагентов qPCR-mix-HS (Евроген, Россия), режим постановки ПЦР: 95 °С – 2 мин (1 цикл), 94 °С – 5 с, 56 °С – 10 с, 72 °С – 30 с (40 циклов) и 72 °С – 7 мин. Образцы, положительные на наличие лиссавирусов, проверяли на наличие вирусов бешенства и Мокола методом ПЦР с использованием рассчитанных авторами видоспецифических праймеров, комплементарных к участку гена матричного белка М. В качестве положительного контроля при постановке ПЦР на выявление генетического материала лиссавирусов и вируса бешенства использовались синтетические конструкции, специфичность которых показана при сравнении с панелью образцов от больных бешенством животных. Визуализацию продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 2 % агарозном геле с добавлением бромистого этидия.

Определение нуклеотидной последовательности выделенных ПЦР-фрагментов проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 310 Genetic Analysis (ABI, США) в комплекте с программным обеспечением Combined Applications Module, с использованием набора «BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit» (ABI, США). Филогенетический анализ осуществляли с использованием прикладных программ MEGA 5 (PSU) и DNASTAR Lasergene 9.

Все работы проводили на базе Российско-Гвинейского научно-исследовательского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней (г. Киндия).

Результаты и обсуждение

В период с апреля по октябрь 2016 г. в пригородах г. Киндия отловлено 356 диких мелких млекопитающих, относящихся к отрядам грызунов (*Rodentia*), рукокрылых (*Chiroptera*), насекомоядных (*Eulipotyphla*) и плотоядных (*Carnivora*). Результаты

Таблица 1

Результаты анализа образцов головного мозга мелких млекопитающих на наличие РНК лиссавирусов

Отряд	Вид, род	Общее кол-во	РНК лиссавирусов абс. (%)	Сиквенс абс. (%)
Chiroptera	Мохнатый щелеморд (<i>Nycteris hispida</i> Schreber, 1774)	2	0	0
	Камерунский складчатогуб (<i>Mops thersites</i> Thomas, 1903)	28	0	0
	Домовый белобрюхий гладконос (<i>Scotophilus leucogaster</i> Cretzschmar, 1826)	84	8 (9,5 %)	2 (2,4 %)
	Красный листонос (<i>Hipposideros ruber</i> Noack, 1893)	2	1	0
	Пальмовый крылан (<i>Eidolon helvum</i> Kerr, 1792)	2	0	0
	Египетская летучая собака (<i>Rousettus aegyptiacus</i> Geoffroy, 1810)	9	1	0
Rodentia	Многососковые крысы (<i>Mastomys</i> sp. Thomas, 1915)	78	12 (15,4 %)	5 (6,4 %)
	Черная крыса (<i>Rattus rattus</i> Linnaeus, 1758)	117	3 (2,6 %)	2 (1,7 %)
	Мягковолосые крысы (<i>Praomys</i> sp. Thomas, 1905)	4	0	0
	Гамбийская сумчатая крыса (<i>Cricetomys gambianus</i> Waterhouse, 1840)	1	0	0
	Абиссинская травяная мышь (<i>Arvicanthis abyssinicus</i> Ruppell, 1842)	1	0	0
	Мышь Ансорджа (<i>Lophuromys ansorgei</i> De Winton, 1896)	2	0	0
	Ручьевая крыса (<i>Pelomys fallax</i> Peters, 1852)	1	0	0
	Домовая мышь (<i>Mus musculus</i> Linnaeus, 1758)	9	1 (11 %)	1 (11 %)
	Африканская водяная крыса (<i>Colomys goslingi</i> Thomas et Wroughton, 1907)	1	0	0
	Крыса Эдвардса (<i>Malacomys edwardsi</i> Rochebrune, 1885)	2	0	0
	Домовые мыши (<i>Mus</i> sp. Linnaeus, 1758)	6	2	1
Eulipotyphla	Белозубки (<i>Crocidura</i> sp. Wagler, 1832)	6	2	2
Carnivora	Африканская циветта (<i>Civettictis civetta</i> Schreber, 1776)	1	1	1
ВСЕГО		356	31 (8,7 %)	14 (3,9 %)

Примечание: Номенклатура млекопитающих дана по И.Я.Павлинову (Павлинов И.Я. Систематика современных млекопитающих. 2-е изд. М.: изд-во МГУ; 2006. 297 с.)

анализа образцов головного мозга животных на наличие РНК лиссавирусов представлены в табл. 1. РНК лиссавирусов обнаружена у представителей всех отрядов, включая синантропных животных – черных крыс и домашних мышей. Все положительные образцы протестированы на наличие вируса бешенства. РНК вируса бешенства не обнаружена ни в одном из образцов, что свидетельствует об инфицировании животных другими лиссавирусами.

В табл. 2 представлены данные по образцам от животных, позитивных на наличие лиссавиру-

сов, подтвержденных определением нуклеотидных последовательностей. На картосхеме (рис. 1) обозначены места отлова этих животных. Половина инфицированных животных отловлена вблизи мест постоянного пребывания человека (жилые дома, птицефабрика, плантация, огороды), что создает потенциальную возможность инфицирования лиссавирусами людей.

Из пула образцов головного мозга черных крыс *R. rattus*, отловленных на птицефабрике, был выделен фрагмент гена матричного белка М (9088–

Таблица 2

Места и время отлова животных, позитивных на наличие РНК лиссавирусов

Номер точек на картосхеме	Дата отлова	Вид, род	Адрес и место отлова
1	13.04.2016	<i>S. leucogaster</i>	Ферефу 2, жилой дом
2	15.04.2016	<i>S. leucogaster</i>	Пастория, грот
3	21.04.2016	<i>Mastomys</i> sp.	Пастория/Колиады 2, плантация
4	16.06.2016	<i>Crocidura</i> sp.	Ферефу 2, кустарник
5	03.07.2016	<i>R. rattus</i>	Пастория/Колиады 2, жилой дом
6	11.07.2016	<i>Mastomys</i> sp.	Ферефу 2, кустарник
7*	1.08.2016	<i>R. rattus</i> *	Самория, птицефабрика
8	13.07.2016	<i>Mastomys</i> sp.	Ферефу 2, кустарник
9	22.08.2016	<i>M. musculus</i>	Пастория/Колиады 2, жилой дом
10	25.08.2016	<i>Crocidura</i> sp.	Кхалиакхоры, огород
11	04.09.2016	<i>Mastomys</i> sp.	Пастория, манго у дома
12	20.09.2016	<i>Mastomys</i> sp.	Кхалиакхоры, жилой дом
13	28.09.2016	<i>Mus</i> sp.	Пастория/Колиады 2, жилой дом
14	01.10.2016	<i>C. civetta</i>	Пастория, манговая роща

*Обнаружена РНК вируса Мокола.



Рис. 1. Картограмма мест отлова животных, позитивных на наличие РНК лиссавирусов в пригороде г. Киндия

9207 п.н.) лиссавирусов. Секвенирование и анализ нуклеотидной последовательности этого фрагмента подтвердил таксономическую идентификацию изолята как лиссавируса, предположительно относящегося к виду вируса Мокола. Фрагмент генома изоля-

та Guinea-2016 депонирован в международной базе GeneBank (MF169761). Уровень гомологии секвенированного фрагмента гена матричного белка М с уже известными геномными последовательностями различных штаммов вируса Мокола составил всего 77–95 %. Филогенетический анализ секвенированного фрагмента гена матричного белка М изолята Guinea-2016 показал, что он генотипируется как лиссавирус. По всей вероятности, изолят может быть отнесен к виду вируса Мокола, при этом он достоверно формирует отдельную ветвь на филогенетическом дереве лиссавирусов с наибольшим филогенетическим сходством с уже известными геномными последовательностями вируса Мокола (рис. 2). Достаточно низкий уровень гомологии фрагмента гена матричного белка М изолята с опубликованными ранее последовательностями вируса Мокола позволяет предположить, что выделенный изолят может рассматриваться как представитель нового генотипа вируса Мокола. Уточнение таксономической идентификации изолята Guinea-2016, циркулирующего в Гвинее, возможно на основе определения более полной последовательности генома и выделения новых штаммов вируса Мокола в Гвинее. Низкий уровень гомологии нуклеотидной последовательности генома гвинейских изолятов может поставить вопрос о признании их новым видом лиссавирусов.

Ранее были опубликованы сообщения об изоляции вируса Мокола в Нигерии, ЮАР, Камеруне, Центрально-Африканской Республике, Зимбабве и Эфиопии [6]; в Гвинейской Республике этот вирус обнаружен впервые. За все время наблюдения с 1968 г. вирус Мокола был изолирован в Нигерии от двух больных детей с клинической картиной, значительно отличавшейся от бешенства: в 1968 г. из спинно-мозговой жидкости ребенка с лихорадкой и конвульсиями, выздоровевшего впоследствии, и в 1971 г. из головного мозга ребенка, умершего от полиомиелитоподобного заболевания [6]. Изоляция этого вируса от вакцинированных против бешенства

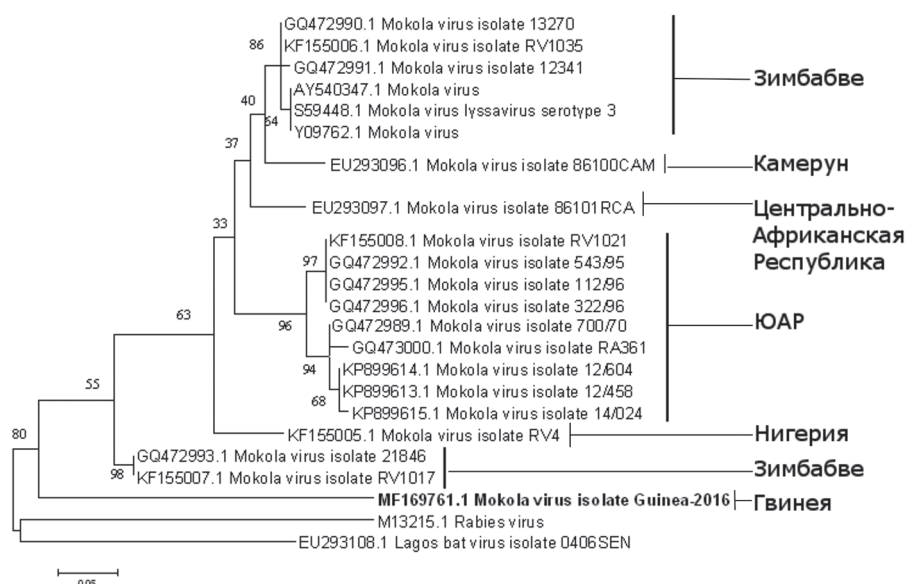


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основании данных филогенетического анализа фрагмента гена матричного белка М (9088–9207) вируса Мокола методом максимального правдоподобия. Изолят Guinea-2016 вируса Мокола выделен жирным шрифтом

собак и кошек, а также изучение *in vitro* перекрестной нейтрализации антирабическими антителами других лиссавирусов [2] подтверждает низкий протективный эффект антирабической вакцинации в отношении вируса Мокола.

Таким образом, проведенный анализ проб головного мозга от представителей четырех отрядов мелких млекопитающих, отловленных в окрестностях г. Киндия Гвинейской Республики, показал наличие РНК лиссавирусов в 8,7 % исследованных образцов. Удалось идентифицировать и секвенировать короткий фрагмент геномной РНК вируса Мокола в пробах от черных крыс. Филогенетический анализ позволил сделать предположение, что секвенированный фрагмент генома принадлежит новому генотипу вируса Мокола. Несмотря на то, что проведено секвенирование не всех ПЦР положительных образцов, полученные данные позволяют исключить наличие РНК вируса бешенства в положительных пробах. В этой связи представляется актуальным дальнейшее изучение молекулярной эпидемиологии вируса Мокола, выделение вирусных изолятов лиссавирусов для более детального исследования и идентификация других видов лиссавирусов, циркулирующих в Западной Африке. Также принципиально важна оценка возможной роли лиссавирусов, и вируса Мокола в частности, в развитии тяжелых неврологических патологий у жителей Гвинейской Республики.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Banyard A.C., Evans J.S., Luo T.R., Fooks A.R. Lyssaviruses and Bats: Emergence and Zoonotic Threat. *Viruses*. 2014; 6:2974–90. DOI: 10.3390/v6082974.
2. Boldbaatar B., Inoue S., Sugiura N., Noguchi A., Orbina J.R., Demetria C., Miranda M.E., Yamada A. Rapid detection of rabies virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2009; 62(3):187–91.
3. Global distribution of risk to humans of contracting rabies, 2013. [Cited 01 Mar 2017]. Available from: http://www.who.int/rabies/Global_distribution_risk_humans_contracting_rabies_2013.png?ua=1.
4. Hayman D.T., Fooks A.R., Marston D.A., Garcia-R J.C. The Global Phylogeography of Lyssaviruses – Challenging the ‘Out of Africa’ Hypothesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(12):e0005266. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005266.
5. Hemachudha T., Ugolini G., Wacharapluesadee S., Sungkarat W., Shuangshoti S., Laothamatas J. Human rabies: neuropathogenesis, diagnosis and management. *Lancet Neurol.* 2013; 12:498–513. DOI: 10.1016/S1474-4422(13)70038-3.
6. Kgaladi J., Wright N., Coertse J., Markotter W., Marston D., Fooks A.R., Freuling C.M., Müller T.F., Sabeta C.T., Nel L.H. Diversity and Epidemiology of Mokola Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7(10):e2511. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002511.
7. Kuzmin I.V., Niezgodna M., Franka R., Agwanda B., Markotter W., Beagley J.C., Urazova O.Y., Breiman R.F., Rupprecht C.E. Lagos Bat Virus in Kenya. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(4):1451–61. DOI: 10.1128/JCM.00016-08.
8. Malerczyk C., Freuling C., Gniel D., Giesen A., Selhorst T., Müller T. Cross-neutralization of antibodies induced by vaccination with Purified Chick Embryo Cell Vaccine (PCECV) against different Lyssavirus species. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2014; 10(10):2799–804. DOI: 10.4161/21645515.2014.972741.
9. Paweska J.T., Blumberg L.H., Liebenberg C., Hewlett R.H., Grobbelaar A.A., Leman P.A., Croft J.E., Nel L.H., Nutt L., Swanepoel R. Fatal Human Infection with Rabies-related Duvenhage Virus, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12:1965–7. DOI: 10.3201/eid1212.060764.
10. Virus Taxonomy: 2015 Release. EC 47, London, UK, July 2015. [Cited 01 Mar 2017]. Available from: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
11. Warrell M. Rabies and African bat lyssavirus encephalitis and its prevention. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2010; 36(1):S47–52. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2010.06.021.
12. Youla A.S., Traore F.A., Sako F.B., Feda R.M., Emeric M.A. Canine and human rabies in Conakry: epidemiology and preventive aspects. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 2014; 107(1):18–21. DOI: 10.1007/s13149-013-0321-x.

References

1. Banyard A.C., Evans J.S., Luo T.R., Fooks A.R. Lyssaviruses and Bats: Emergence and Zoonotic Threat. *Viruses*. 2014; 6:2974–90. DOI: 10.3390/v6082974.
2. Boldbaatar B., Inoue S., Sugiura N., Noguchi A., Orbina J.R., Demetria C., Miranda M.E., Yamada A. Rapid detection of rabies virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2009; 62(3):187–91.
3. Global distribution of risk to humans of contracting rabies, 2013. [Cited 01 Mar 2017]. Available from: http://www.who.int/rabies/Global_distribution_risk_humans_contracting_rabies_2013.png?ua=1.
4. Hayman D.T., Fooks A.R., Marston D.A., Garcia-R J.C. The Global Phylogeography of Lyssaviruses – Challenging the ‘Out of Africa’ Hypothesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(12):e0005266. DOI: 10.1371/journal.pntd.0005266.
5. Hemachudha T., Ugolini G., Wacharapluesadee S., Sungkarat W., Shuangshoti S., Laothamatas J. Human rabies: neuropathogenesis, diagnosis and management. *Lancet Neurol.* 2013; 12:498–513. DOI: 10.1016/S1474-4422(13)70038-3.
6. Kgaladi J., Wright N., Coertse J., Markotter W., Marston D., Fooks A.R., Freuling C.M., Müller T.F., Sabeta C.T., Nel L.H. Diversity and Epidemiology of Mokola Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7(10):e2511. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002511.
7. Kuzmin I.V., Niezgodna M., Franka R., Agwanda B., Markotter W., Beagley J.C., Urazova O.Y., Breiman R.F., Rupprecht C.E. Lagos Bat Virus in Kenya. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(4):1451–61. DOI: 10.1128/JCM.00016-08.
8. Malerczyk C., Freuling C., Gniel D., Giesen A., Selhorst T., Müller T. Cross-neutralization of antibodies induced by vaccination with Purified Chick Embryo Cell Vaccine (PCECV) against different Lyssavirus species. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2014; 10(10):2799–804. DOI: 10.4161/21645515.2014.972741.
9. Paweska J.T., Blumberg L.H., Liebenberg C., Hewlett R.H., Grobbelaar A.A., Leman P.A., Croft J.E., Nel L.H., Nutt L., Swanepoel R. Fatal Human Infection with Rabies-related Duvenhage Virus, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12:1965–7. DOI: 10.3201/eid1212.060764.
10. Virus Taxonomy: 2015 Release. EC 47, London, UK, July 2015. [Cited 01 Mar 2017]. Available from: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
11. Warrell M. Rabies and African bat lyssavirus encephalitis and its prevention. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2010; 36(1):S47–52. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2010.06.021.
12. Youla A.S., Traore F.A., Sako F.B., Feda R.M., Emeric M.A. Canine and human rabies in Conakry: epidemiology and preventive aspects. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 2014; 107(1):18–21. DOI: 10.1007/s13149-013-0321-x.

Authors:

- Porshakov A.M., Nikiforov K.A., Agafonov D.A., Yakovlev S.A., Nikitin P.P. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru
- Kononova Yu.V., Ternovoy V.A., Zaikovskaya A.V., Sementsova A.O., Nesterov A.E., Sergeev A.A., Loktev V.B. State Scientific Centre of Virology and Biotechnology “Vector”. Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru.
- Keita N. Centre Universitaire de Kindia-Foulayah. Kindia, Republic of Guinea.
- Toure A., Boubaly S. Institut de Recherche en Biologie Appliquée de Guinée à Kindia. Kindia, Republic of Guinea.
- Lopatin A.A. Plague Control Center. 4, Musorgskogo St., Moscow, 127490, Russian Federation. E-mail: protivochym@nlm.ru.

Об авторах:

- Поршаков А.М., Никифоров К.А., Агафонов Д.А., Яковлев С.А., Никитин П.П. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.
- Конорова Ю.В., Терновой В.А., Заиковская А.В., Сементцова А.О., Нестеров А.Е., Сергеев А.А., Локтев В.Б. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru.
- Кейта Н. Centre Universitaire de Kindia-Foulayah. Гвинейская Республика, Киндия.
- Туре А., Бумбали С. Institut de Recherche en Biologie Appliquée de Guinée à Kindia. Гвинейская Республика, Киндия.
- Лопатин А.А. Противочумный центр. Российская Федерация, 127490, Москва, ул. Мусоргского, 4. E-mail: protivochym@nlm.ru.

Поступила 22.08.17.

В.Б.Поступайло¹, Л.В.Саяпина¹, М.И.Торопчин², А.А.Далгатова³, Н.Ф.Никитюк¹, А.Р.Волгин¹,
О.А.Бургасова⁴

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ЗАБОЛЕВАЕМОСТИ БРУЦЕЛЛЕЗОМ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЛАН-ГРАФИКА ВАЛЬДА

¹ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва; ²ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М.Сеченова», Москва; ³ГБУ Республики Дагестан «Чародинская Центральная районная больница»; ⁴ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Министерства здравоохранения РФ, Москва, Российская Федерация

Цель работы – проведение эпидемиологического анализа официальных статистических данных по заболеваемости бруцеллезом в различных субъектах Российской Федерации за период с 2005 по 2014 год с помощью план-графика Вальда. **Материалы и методы.** В работе использовали учетные и отчетные документы Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ФБУЗ «Федерального центра гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора и информационные материалы ВОЗ. **Результаты и выводы.** Изучение особенностей развития эпидемического процесса в многолетней динамике позволило выявить субъекты, наиболее пораженные заболеваемостью бруцеллезом. Полученные результаты по заболеваемости бруцеллезом в РФ за период с 2005 по 2014 год показали, что первое место занимает СКФО (62 %), второе и третье места – СФО (16 %) и ЮФО (13 %) соответственно; на долю других регионов приходится 9 %. Наибольшая доля в структуре заболеваемости в субъектах СКФО установлена в Республике Дагестан – 62 %. При этом ежегодный темп прироста определен в количестве 5,54 случаев, что указывает на стабилизацию или некоторую тенденцию к снижению уровня заболеваемости в СКФО. Практическое использование прогнозирования заболеваемости с помощью предложенного метода дает возможность своевременно планировать лечебно-диагностические, профилактические и противоэпидемические мероприятия в очагах бруцеллеза. Применение план-графика Вальда для прогнозирования заболеваемости может использоваться и для других инфекционных болезней.

Ключевые слова: эпидемиологический анализ, бруцеллез, прогнозирование заболеваемости, план-график Вальда.

Корреспондирующий автор: Поступайло Валерий Борисович, e-mail: val.postupailo@yandex.ru.

V.B.Postupailo¹, L.V.Sayapina¹, M.I.Toropchin², A.A.Dalgatova³, N.F.Nikityuk¹, A.R.Volgin¹, O.A.Burgasova⁴

Forecasting of Brucellosis Morbidity Rates in the Russian Federation Using Wald Method

¹Scientific Center for Expert Evaluation of Medical Application Products, Moscow, Russian Federation; ²I.M.Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation; ³State Budgetary Institution of the Republic of Dagestan “Charodinsk Central District Hospital”, Russian Federation; ⁴Federal State-Funded Educational Institution for Further Vocational Education “Russian Medical Academy of Continuing Professional Education”, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Objective of the study is to conduct epidemiological analysis of official statistical data on brucellosis morbidity rates over the period of 2005–2014 in different constituent entities of the Russian Federation, using Wald method. **Materials and methods.** Utilized were recording and reporting documents of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, FBHI “Federal Center of Hygiene and Epidemiology” of the Rospotrebnadzor, and WHO information resources. **Results and conclusions.** Studies of peculiarities of epidemic process development over the long-term period have allowed for identification of entities that are the most affected by the diseases. The results obtained on the morbidity rates in the Russian Federation over the period of 2005–2014 testify to the fact that first comes North Caucasian Federal District (NCFD) (62 %), next go Siberian (SbFD) (16 %) and Southern (SFD) (13 %) Federal Districts, second and third lines of the list respectively. Other regions account for 9 % of the load. The largest share of morbidity in NCFD entities belongs to the Republic of Dagestan – 62 %. Thereat, annual increment rate is 5.54 cases, which points to stabilization and some downward trend. Application of this morbidity rate prediction tool provides for in-time planning of clinical-diagnostic, prophylactic, and anti-epidemic measures in brucellosis foci. Wald method for forecasting of morbidity can be used for other infectious diseases too.

Key words: epidemiological analysis, brucellosis, morbidity rate prediction, Wald method.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Valery B. Postupailo, e-mail: val.postupailo@yandex.ru.

Citation: Postupailo V.B., Sayapina L.V., Toropchin M.I., Dalgatova A.A., Nikityuk N.F., Volgin A.R., Burgasova O.A. Forecasting of Brucellosis Morbidity Rates in the Russian Federation Using Wald Method. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 4:77–80. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-77-80

Заболеваемость бруцеллезом людей за период с 2005 по 2014 год, особенно в неблагоприятных субъектах (Северо-Кавказский, Южный и Сибирский федеральные округа) Российской Федерации (РФ)

продолжает оставаться неустойчивой. Ежегодно регистрируется от 368 до 393 новых случаев заболевания среди людей [2, 3]. Эпидемическая обстановка обуславливает необходимость совершенствования

методов эпидемиологической диагностики [1, 5].

Актуальной проблемой является анализ многолетней заболеваемости бруцеллезом в субъектах РФ без учета действия факторов риска, оказывающих влияние на эпидемический процесс, и применение метода определения прогностического уровня заболеваемости на любой административной территории, начиная от конкретного населенного пункта до региона или страны в целом. Решение данной проблемы позволит быстро и своевременно оценить активность эпидемических очагов бруцеллеза на определенной территории и принять оперативные решения для их локализации и ликвидации [4].

Целью работы было проведение анализа заболеваемости бруцеллезом за 2005–2014 гг. и прогнозирования на 2015 г. в субъектах Российской Федерации, в том числе в неблагополучных районах, с использованием план-графика Вальда.

Материалы и методы

В работе определяли уровень и структуру заболеваемости бруцеллезом за период с 2005 по 2014 год. Для этого были использованы учетные и отчетные документы Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора, а также информационные материалы Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ). В ходе исследования проанализированы 259 актов эпидемиологического расследования очага инфекционной (паразитарной) болезни с установлением причинно-следственной связи; 205 форм федерального статистического наблюдения № 1 и № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях»; 120 медицинских карт стационарного больного (форма № 003/у); 56 информационных бюллетеней ВОЗ; 10 информационных бюллетеней Роспотребнадзора «О ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации».

Соответствие собранной информации законам нормальности распределения данных проводилось с помощью математического моделирования. Прогноз проявлений эпидемического процесса строился с применением формально-математического моделирования [6]. Для наглядности полученных результатов применялся метод графического/аналогового моделирования по типу линейных диаграмм [7]. Для выявления особенностей течения эпидемического процесса, а также графического изображения полученных результатов, применялись формулы расчетов, статистические критерии оценки достоверности и справочные таблицы [8]. Обеспечение исследований и расчет показателей заболеваемости осуществлялся с помощью разработанной нами автоматизированной системы ввода и хранения эпидемиологической информации с использованием средств Microsoft Windows 7. Таблицы, расчеты показателей, схемы и графики подготовлены с помощью электронных таблиц Microsoft Excel, 2010.

Результаты и обсуждение

Прогноз числа случаев заболеваемости проводился классическим методом с использованием линейной регрессии за период 2005–2014 гг. в РФ. С целью оценки эпидемиологической и эпизоотической обстановки по бруцеллезу в 2014 г. и прогнозирования эпидемической ситуации на 2015 г. проведен анализ официальных статистических данных по заболеваемости бруцеллезом среди людей. В 2014 г. зарегистрировано 368 случаев впервые выявленного бруцеллеза. По результатам статистического анализа, полученным Г.И.Лямкиным и соавт., уровень заболеваемости бруцеллезом людей в 2015 г. прогнозировался в пределах 370–420 случаев [2].

В наших исследованиях при использовании линейной регрессии в период с 2005 по 2014 год прогноз на 2015 г. составил 431 случай бруцеллеза. При этом ежегодный темп прироста составил 3,53 случая, который указывает на стабилизацию или некоторую тенденцию к снижению уровня заболеваемости в РФ (коэффициент достоверности – $R^2 = 0,0281$).

Для реализации цели нашей работы был проведен статистический анализ заболеваемости бруцеллезом, по данным многолетних наблюдений за период 2005–2014 гг., в результате которого определены фактический и пороговый уровни заболеваемости, а также прогноз ежемесячного числа случаев бруцеллеза на предстоящий период. Разработанный подход к проведению статистического анализа заболеваемости бруцеллезом обеспечивается определением целого ряда взаимосвязанных между собой показателей, которые характеризуют динамический ряд. Анализ уровня и структуры заболеваемости бруцеллезом в различных регионах РФ проведен для определения эпидемиологического и социального значения среди отдельных инфекций. В силу этих обстоятельств оценка актуальности инфекций проведена с учетом достаточного числа критериев, отражающих различные аспекты их значения.

Эпидемиологическое значение инфекционной болезни определяется, в первую очередь, ее распространенностью, а также частотой регистрации случаев среди населения. Показатель заболеваемости, рассчитанный за год, месяц или другой отрезок времени, является средней оценкой интенсивности эпидемического процесса в анализируемом периоде. Кроме суммарного числа заболеваний и относительной их частоты среди населения, эпидемиологическое значение инфекции зависит и от особенностей распределения заболеваемости на протяжении анализируемого периода. Анализ данных по заболеваемости бруцеллезом в РФ за период с 2005 по 2014 год показал, что первое место занимает Северо-Кавказский федеральный округ (СКФО), второе и третье – Сибирский федеральный округ (СФО) и Южный федеральный округ (ЮФО) соответственно.

Известно, что на эпидемиологическую интерпретацию показателей инфекционной заболеваемости влияет клиническое проявление инфекционного

процесса у заболевших лиц (соотношение манифестных и бессимптомных форм, наличие латентных, хронических форм инфекции) и длительность инкубационного периода инфекции. Частота регистрации случаев инфекции будет существенно зависеть от активности выявления больных, носителей и качества диагностики. В результате изучения структуры заболеваемости бруцеллезом в субъектах РФ установлено, что на СКФО приходится 62 %, Сибирский федеральный округ – 16 % и Южный федеральный округ – 13 %, на долю других регионов – 9 %.

Учитывая, что наибольшую значимость в структуре заболеваемости бруцеллезом в Российской Федерации имеет СКФО, нами для прогнозирования уровня заболеваемости использован метод линейной регрессии по показателям многолетних наблюдений в период с 2005 по 2014 год с применением план-графика Вальда. Результаты проведенных исследований установлено, что прогноз в СКФО на 2015 г. составил 230 случаев бруцеллеза. При этом ежегодный темп прироста (3,67 случая) указывает на стабилизацию или некоторую тенденцию к снижению уровня заболеваемости (коэффициент достоверности – $R^2 = 0,06$).

Для установления порогового уровня заболеваемости нами была применена формула «расчета эпидемиологического порога». Применение метода определения порогового уровня позволяет более детально проанализировать течение эпидемиологического процесса.

Анализ динамики заболеваемости, по данным многолетних наблюдений и отчетного периода в СКФО, позволил установить, что показатели средних значений варьировали от 8 до 40 случаев в разное время года, с наибольшим числом с июня по сентябрь. В динамике отчетного 2014 г. подъем заболеваемости бруцеллезом отмечался в мае, с пиком заболеваемости в июне, что превышает значение порогового уровня заболеваемости на 4 случая.

Предложенная методика позволяет определить минимальный и максимальный прогностический уровень заболеваемости бруцеллезом на предстоящий период в СКФО. Прогноз минимального числа случаев бруцеллеза определяли по начальным точкам, а максимального – по конечным. Прогнозирование ежемесячного числа заболеваний бруцеллезом в динамике анализируемого года, по данным контрольных значений Вальда, проводили путем вычисления ежемесячного темпа прироста числа случаев. Данные показатели являются основанием для установления минимального и максимального объема мероприятий в лечебно-профилактических учреждениях на предстоящий период.

Для достоверности примененного нами метода прогнозирования заболеваемости бруцеллезом в СКФО с использованием план-графика Вальда введены количественные показатели, которые необходимо учитывать с целью коррекции полученных результатов. Прогноз числа случаев заболеваний бруцеллезом на предстоящий период определен в виде нарастающего итога, при этом минимальный



Рис. 1. Структура заболеваемости бруцеллезом в Северо-Кавказском федеральном округе за период 2005–2014 гг.

ежемесячный прогностический уровень составил 11 случаев, максимальный – 32. Ежемесячный прирост числа заболеваний в динамике анализируемого года составил 2 случая. Проведенные исследования позволили спрогнозировать суммарные минимальный и максимальный уровни заболеваемости бруцеллезом на 2015 г., соответственно 132 и 384 случая.

Следует отметить, что прогноз максимального числа заболеваний в 2015 г. превышает значение порогового уровня заболеваемости и свидетельствует о возможном ухудшении эпидемиологической обстановки по бруцеллезу. С целью выявления наибольшего поражения населения бруцеллезом проведен детальный анализ заболеваемости на территории субъектов Северо-Кавказского федерального округа. Наиболее высокая заболеваемость бруцеллезом отмечается в Республике Дагестан – 67 %, Ставропольском крае – 26 %, Республике Северная Осетия и Кабардино-Балкарской Республике – по 3 % (рис. 1). Результаты анализа многолетней динамики с использованием линейной регрессии за период 2005–2014 гг. в Республике Дагестан показали, что прогноз на 2015 г. составит 140 случаев бруцеллеза (рис. 2). При этом ежегодный темп прироста наблюдался в 5,11 случаев, что указывает на стабилизацию или некоторую тенденцию к снижению уровня заболеваемости в республиках на Северном Кавказе (коэффициент достоверности – $R^2 = 0,17$).

Анализ динамики заболеваемости, по данным многолетних наблюдений и отчетного периода, позволил спрогнозировать число заболеваний бруцеллезом в Республике Дагестан с использованием графика Вальда (рис. 3). По результатам проведенного исследования, пороговый уровень заболеваемости бруцеллезом за анализируемый период составил 15 случаев. Показатели средних значений заболеваемости, по данным многолетних наблюдений, колебались от 2 до 49 случаев в разное время года, с



Рис. 2. Анализ многолетней динамики заболеваемости бруцеллезом в Республике Дагестан



Рис. 3. Динамика заболеваемости бруцеллезом в Республике Дагестан по месяцам

наибольшим числом случаев с июня по сентябрь. Установлено, что в динамике многолетних наблюдений подъем числа возникновения бруцеллеза отмечался в июне, что на 11 случаев выше значения порогового уровня.

Прогноз числа заболеваний бруцеллезом в Республике Дагестан на 2015 г. определен в виде нарастающего итога. При этом минимальный ежемесячный прогностический уровень составил 9 случаев, максимальный — 23; ежемесячный прирост числа заболеваний в динамике анализируемого года составил 1,3 случая; спрогнозирован максимальный уровень заболеваемости бруцеллезом в 2015 г. до 134 случаев.

Таким образом, в дополнение к классическим методам анализа предлагается применять план-график Вальда с определением ежемесячного максимального и минимального числа случаев заболеваний. Анализ данных по заболеваемости бруцеллезом в РФ за период с 2005 по 2014 год показал, что первое место занимает СКФО (62 %), второе и третье — СФО (16 %) и ЮФО (13 %) соответственно; на долю других регионов приходится 9 %. Наибольшая доля в структуре заболеваемости в субъектах СКФО выявлена в Республике Дагестан — 62 %. При этом ежегодный темп прироста определен в количестве 5,54 случая, что указывает на стабилизацию или некоторую тенденцию к снижению уровня заболеваемости в СКФО. Прогноз уровня заболеваемости в Российской Федерации, Северо-Кавказском федеральном округе и в Республике Дагестан на 2015 г. составил 389, 230 и 134 случая соответственно.

Оценка эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в 2015 г. показала, что в РФ зарегистрировано 393 случая, что превысило ожидаемый прогностический уровень всего на 34 случая, в Республике Дагестан — 140 случаев заболеваемости бруцеллезом среди людей [3], что существенно не оказывает влияния на эпидемиологическую обстановку. Практическое использование прогнозирования заболеваемости бруцеллезом с помощью предложенного нами метода дает возможность своевременно планировать лечебно-диагностические, профилактические и противоэпидемические мероприятия для локализации и ликвидации очагов бруцеллеза. Прогнозирование заболеваемости с использованием план-графика Вальда может применяться и для других инфекционных болезней.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беляков В.Д., Дегтярев А.А., Иванников Ю.Г. Качество и эффективность противоэпидемических мероприятий. Л.: Медицина, 1981.
2. Лямкин Г.И., Худолеев А.А., Хачатурова А.А., Куличенко А.Н. Обзор эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2014 г. и прогноз на 2015 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2015; 2:2–4.
3. Лямкин Г.И., Пономаренко Д.Г., Худолеев А.А., Русанова Д.Б., Велинская С.В., Куличенко А.Н. Обзор эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2015 г. и прогноз на 2016 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 2: 11–3.
4. Ляпина Е.П., Софьяна А.В., Шульдяков А.А., Ляпин М.Н., Сатарова С.А., Рамазанова К.Х. Медицинские аспекты противоэпидемических мероприятий при бруцеллезе. *Фундаментальные исследования.* 2014; 10:1759–64.
5. Поступайло В.Б., Никитюк Н.Ф. Методика проведения оперативного слежения с использованием показателей годовой динамики заболеваемости. *Мед. альманах.* 2009; 2:124–6.
6. Поступайло В.Б. Особенности использования автоматизированной базы данных при анализе инфекционной и неинфекционной заболеваемости. *Современные наукоемкие технологии.* 2010; 12:51–2.
7. Торопчин М.И., Поступайло В.Б., Саяпина Л.В., Никитюк Н.Ф. Способ прогнозирования заболеваемости бруцеллезом в Российской Федерации. *Современные проблемы науки и образования.* 2016; 1. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24102>.
8. Wald A. Sequential tests of statistical hypotheses. *Annals of Mathematical Statistics.* 1945; 16:117–86.

References

1. Belyakov V.D., Degtyarev A.A., Ivannikov Yu.G. [Quality and Effectiveness of Anti-Epidemic Measures]. Leningrad: "Meditsina"; 1981.
2. Lyamkin G.I., Khudoleev A.A., Khachaturova A.A., Kulichenko A.N. [Review of epidemiological situation on brucellosis in the Russian Federation in 2014, and prognosis for 2015]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2015; 2:22–4.
3. Lyamkin G.I., Ponomarenko D.G., Khudoleev A.A., Rusanova D.V., Vilinskaya S.V., Kulichenko A.N. [Review of epidemiological situation on brucellosis in the Russian Federation in 2015 and prognosis for 2016]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 2:11–3.
4. Lyapina E.P., Sof'ina A.V., Shul'dyakov A.A., Lyapina M.N., Satarova S.A., Ramazanov K.Kh. [Medical aspects of anti-epidemic measures in case of brucellosis]. *Fundamental. Issledovaniya.* 2014; 10:1759–64.
5. Postupailo V.B., Nikityuk N.F. [Method of continuous monitoring using indices of yearly morbidity rate dynamics]. *Med. Al'manakh.* 2009; 2:124–6.
6. Postupailo V.B. [Peculiarities of computer-controlled database in analyzing infectious and non-infectious morbidity rate]. *Sovrem. Naukoemkie. Tekhnol.* 2010; 12:51–2.
7. Toropchin M.I., Postupailo V.B., Sayapina L.V., Nikityuk N.F. [Method of brucellosis morbidity rate prediction in the Russian Federation]. *Sovrem. Probl. Nauki i Obrazovaniya.* 2016; 1. Available from: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=24102>.
8. Wald A. Sequential tests of statistical hypotheses. *Annals of Mathematical Statistics.* 1945; 16:117–86.

Authors:

- Postupailo V.B., Sayapina L.V., Nikityuk N.F., Volgin A.R. Scientific Center on Expertise of Medical Application Products, 8, Petrovsky Bulvar, Moscow, 127051, Russian Federation. E-mail: sayapina@expmed.ru.
- Toropchin M.I. I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 2–4 Bolshaya Pirogovskaya St., 119991 Moscow, Russian Federation. E-mail: UVC-Toropchin@mail.ru.
- Dalgatova A.A. Charodinsk Central District Hospital, 10, Charodinskaya St., Charodinsky District, Tsurib Village, Republic of Dagestan, Russian Federation.
- Burgasova O.A. Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, 2/1, Barrikadnaya St., Moscow, 125993, Russian Federation.

Об авторах:

- Поступайло В.Б., Саяпина Л.В., Никитюк Н.Ф., Волгин А.Р. Научный центр экспертизы средств медицинского применения. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8. E-mail: sayapina@expmed.ru.
- Торопчин М.И. Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова. Российская Федерация, 119435, Москва, ул. Большая Пироговская, д. 2, стр. 4. E-mail: UVC-Toropchin@mail.ru.
- Далгатова А.А. Чародинская Центральная районная больница. Российская Федерация, Республика Дагестан, Чародинский район, село Цуриб, Чародинская ул., 10.
- Бургасова О.А. Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования. Российская Федерация, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1.

Поступила 21.08.17.

Пробл. особо опасных инф. 2017; 4:81–85. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-81-85

УДК 616-078

Л.В.Романова, И.В.Дворцова, Э.А.Москвитина, Т.Н.Бородин, Н.Л.Пичурина, А.П.Савченко,
М.В.Забашта, И.В.Орехов, А.В.Забашта

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОМ ПЦР НОСИТЕЛЕЙ И ПЕРЕНОСЧИКОВ НА НАЛИЧИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КЛЕЩЕВЫХ БОРРЕЛИОЗОВ, МОНОЦИТАРНОГО ЭРЛИХИОЗА И ГРАНУЛОЦИТАРНОГО АНАПЛАЗМОЗА ЧЕЛОВЕКА В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

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

Цель работы – выявление циркуляции возбудителей иксодового клещевого боррелиоза, моноцитарного эрлихиоза и гранулоцитарного анаплазмоза человека в пробах от носителей и переносчиков трансмиссивных клещевых инфекций методом ПЦР. **Материалы и методы.** С помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) проведено исследование полевого материала на зараженность возбудителями клещевых инфекций (клещевых боррелиозов, эрлихиозов, анаплазмоза) в сочетанных природных очагах на территории Ростовской области. **Результаты и выводы.** В работе использованы материалы эпизоотологических обследований, проведенные в 21 административном районе и 10 городах Ростовской области, за период с 2014 по 2016 год. Результаты исследований указывают на спонтанную зараженность иксодовых клещей возбудителем ИКБ на территории Ростовской области и свидетельствуют о наличии природного очага данного заболевания. С 2013 г. природный очаг ИКБ является валентным в связи с выявлением и официальной регистрацией больных. Кроме того, на территории Ростовской области впервые зарегистрирована циркуляция возбудителя МЭЧ и ГАЧ и определены территориально сочетанные очаги МЭЧ и ГАЧ с ИКБ. Полученные данные позволяют говорить о генезисе очага иксодового клещевого боррелиоза и моноцитарного и гранулоцитарного эрлихиозов за счет ежегодного расширения ареала зараженных этими возбудителями клещей и их прокормителей. Проведение ПЦР-анализа с целью выявления клещевых инфекций важно для оценки их распространения на территории Ростовской области, прогнозирования эпидемиологической обстановки и проведения профилактических мероприятий в данном регионе.

Ключевые слова: сочетанные природные очаги, клещевые трансмиссивные инфекции, боррелиоз, эрлихиоз, анаплазмоз, хозяева, переносчики, ПЦР-анализ, Ростовская область.

Корреспондирующий автор: Романова Людмила Васильевна, e-mail: plague@aaanet.ru.

L.V.Romanova, I.V.Dvortsova, E.A.Moskvitina, T.N.Borodina, N.L.Pichurina, A.P.Savchenko, M.V.Zabashhta,
I.V.Orekhov, A.V.Zabashhta

PCR Results of Vector and Carrier Investigations for the Presence of Tick-Borne Borreliosis, Human Monocytic Ehrlichiosis, and Human Granulocytic Anaplasmosis Agents in Natural Foci of the Rostov Region

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

Objective of the study is to detect the circulation of the agents of ixodic tick-borne borreliosis (ITB), human monocytic ehrlichiosis (HME), and human granulocytic anaplasmosis (HGA) in samples collected from carriers and vectors of transmissible tick-borne infections using PCR-assay. **Materials and methods.** Field material was studied in PCR for evaluating the rate of infection by causative agents of tick-borne infections (tick-borne borreliosis, ehrlichiosis, anaplasmosis) in combined natural foci on the territory of the Rostov Region. **Results and conclusions.** The data obtained during epizootological investigations carried out in 21 administrative districts and 10 cities of the Rostov Region between 2014 and 2016 were used in the study. The results were indicative of spontaneous infection in ixodic ticks by ITB causative agent on the territory of the Rostov Region, as well as of presence of corresponding natural focus. Since 2013 the activity of different components of ITB natural focus was confirmed by the detection and official registration of patients. Moreover, in the Rostov Region for the first time ever the circulation of HME and HGA causative agents was recorded and territorially combined foci of HME and HGA with ITB were identified. The results obtained allow assuming the genesis of a focus of ixodic tick-borne borreliosis and monocytic and granulocytic ehrlichiosis owing to annual expansion of the areal of ticks, infected by these pathogens, and animals on which the ticks are feeding. PCR-analysis is of significant value for assessment of spread of causative agents of the “tick-borne” infections in the Rostov Region, forecasting of epidemiological situation, as well as implementation of preventive measures in the region.

Key words: combined natural foci, tick-borne transmissible infections, borreliosis, ehrlichiosis, anaplasmosis, hosts, vectors, PCR-analysis, the Rostov Region.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Ludmila V. Romanova, e-mail: plague@aaanet.ru.

Citation: Romanova L.V., Dvortsova I.V., Moskvitina E.A., Borodina T.N., Pichurina N.L., Savchenko A.P., Zabashhta M.V., Orekhov I.V., Zabashhta A.V. PCR Results of Vector and Carrier Investigations for the Presence of Tick-Borne Borreliosis, Human Monocytic Ehrlichiosis, and Human Granulocytic Anaplasmosis Agents in Natural Foci of the Rostov Region. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 4:81–85. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-81-85

В современный период при микробиологическом мониторинге как составляющей эпидемиологического надзора за природно-очаговыми, в том числе трансмиссивными, клещевыми инфекциями успешно используется ПЦР-анализ, основанный на детекции специфических участков ДНК/РНК их возбудителей. Этот метод, являющийся основным в молекулярной эпидемиологии, используется для обнаружения возбудителей иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ), моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ) и гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ). Возбудители боррелиоза и эрлихиозов являются сочленами природных биоценозов, их экология неразрывно связана с экологией позвоночных животных и кровососущих членистоногих, служащих индикаторами функционирования указанных микроорганизмов в естественных условиях [1, 3, 10]. Изучение данных инфекций приобретает особое значение для регионов с благоприятными для их циркуляции климатическими условиями, обилием и разнообразием видов членистоногих переносчиков и их теплокровных прокормителей. По уровню заболеваемости ИКБ занимает одно из первых мест среди природно-очаговых инфекций и представляет собой актуальную проблему для США, Австралии, ряда европейских стран и России [4, 6, 9, 11, 13, 14].

Современное неблагоприятное развитие эпидемиологической обстановки по иксодовым клещевым боррелиозам в России выдвигает на первый план задачу изучения природных очагов этой инфекции и проведение мониторинга даже в благополучных по данному заболеванию территорий. По уровню заболеваемости инфекция занимает в нашей стране одно из ведущих мест среди всех природно-очаговых зоонозов [4, 7, 8]. Официальная статистическая регистрация МЭЧ и ГАЧ в России введена в 2013 г. Резервуарные хозяева МЭЧ изучены недостаточно. Ими могут быть различные виды мышевидных грызунов, а также некоторые виды иксодовых клещей (*Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus bursa*, родов *Haemophysalis*, *Amblyomma*, *Dermacentor*). Возбудитель ГАЧ (*Anaplasma phagocytophilum*) имеет широкий круг резервуарных хозяев, включающий различных млекопитающих (мышевидные и более крупные грызуны, насекомоядные, ежи, дикие копытные, хищные, вплоть до медведей, а также лошади, коровы, овцы, собаки) и птиц. Основными компонентами паразитарной системы ГАЧ являются клещи *I. persulcatus*, *I. trianguliceps*, *I. ovatus*, *Haemophysalis concinna*, *Haem. longicornis*, *Dermacentor silvarum*, *D. marginatus* и *H. marginatum* [2, 4]. Актуальность проблемы определила цель настоящей работы: выявление циркуляции возбудителей иксодового клещевого боррелиоза, моноцитарного эрлихиоза и гранулоцитарного анаплазмоза человека в пробах от носителей и переносчиков трансмиссивных клещевых инфекций методом ПЦР.

Материалы и методы

В работе использованы материалы эпизоотологических обследований, проведенные специалистами Ростовского НИПЧИ в 21 административном районе и 10 городах Ростовской области, в том числе на стационарах многолетнего наблюдения. При проведении ПЦР-анализа для выявления ДНК маркеров *Borrelia spp.* и *Ehrlichia spp.* исследовали пробы шести видов иксодовых клещей (имаго самцы и самки, личинки, нимфы, напившиеся крови и голодные), 25 видов различных кровососущих членистоногих, пробы 12 видов грызунов и мелких млекопитающих (в том числе летучих мышей), пробы мозга 12 видов птиц.

Сбор объектов исследования в открытых стационарах (лесопосадки, балки, овраги и др.) и с прокормителей (крупного рогатого скота, собак) осуществляли по общепринятой методике согласно МУ 3.1.3012-12 и СП 3.1.3310-15 в период с апреля по сентябрь. Исследовали как единичные объекты, так и пулы, состоящие не более чем из 10 особей. При формировании пулов учитывали род, вид, фазу развития, дату и место сбора.

При исследовании использовали наборы для выявления ДНК (ООО «Лаборатория Изоген») и наборы реагентов для обнаружения ДНК возбудителей инфекционных болезней методом полимеразной цепной реакции (*B. burgdorferi*; *B. garinii*; *B. afzelii* и *Borrelia spp.* (*B. burgdorferi* + *B. garinii* + *B. afzelii*)), а также наборы реактивов для амплификации ДНК *Ehrlichia spp.*; *Ehrlichia (Anaplasma) phagocytophilum*; *Ehrlichia murris/yamadaguchi* (ООО «Лаборатория Изоген»). Амплификацию проводили согласно рекомендациям фирмы-производителя.

Результаты и обсуждение

Мониторинг трансмиссивных клещевых инфекций, в частности ИКБ, в Ростовской области в плане научных и прикладных исследований осуществляется с 2007 г., когда впервые была выявлена ДНК *Borrelia burgdorferi s.l.* в пробах от клещей *I. ricinus*, собранных в весенне-осенний период с последующим установлением геновида *B. afzelii* [5]. Ежегодно Ростовским НИПЧИ проводится мониторинг объектов окружающей среды с целью выявления ДНК возбудителей клещевых инфекций – боррелиоза и эрлихиозов (мониторинг последних с 2014 г.) с расширением списка видового разнообразия как переносчиков (клещи, кровососущие членистоногие), так и прокормителей (мелкие млекопитающие и птицы). В представленной работе приведены данные за последние три года.

В 2014 г. в плане мониторинга природных очагов на выявление ДНК возбудителей боррелиозов исследовано 320 проб (клещи – *I. ricinus*, *R. rossicus*, *D. marginatus*, *H. punctata*; насекомоядные – белозубка малая; грызуны – полевка обыкновенная, мышь

лесная, мышь домовая; птицы – цапля серая, чайка озерная, чайка-хохотунья, речная крачка, грач, ворона серая, скворец, воробей полевой). Положительными оказались 17 проб – все содержали ДНК боррелий, принадлежащих к генотипу *B. afzelii* (5,3 %). ДНК боррелий обнаружена в пробах клещей (имаго и нимфы, единичные экземпляры и пулы), насекомоядных, грызунов (единичные особи и пулы по 3–5 экз.: белозубка малая, мышь лесная, мышь домовая) и птиц (единичные особи и пулы по 3–5 экз.: чайка озерная, грач, ворона серая, воробей полевой). При выявлении в ПЦР ДНК эрлихий (240 проб), положительными оказались 22 пробы, содержащие ДНК *Ehrlichia spp.* (9,2 %) (имаго клещей, единичные и пулы; комары – пулы по 25–50 экз.; грызуны – единичные экземпляры и пулы: мышь лесная, мышь домовая, полевка обыкновенная; птицы – чайка озерная, грач, ворона серая, скворец, воробей полевой, воробей домовый). ДНК возбудителей моноцитарного эрлихиоза (*E. muris/yamodoguchi*) и гранулоцитарного анаплазмоза человека (*A. phagocytophilum*) не обнаружено.

В 2015 г. исследовано 228 проб (клещи *I. ricinus*, *R. rossicus*, *D. marginatus*, комары, мухи-кровососки, оводы и др.; насекомоядные – белозубка малая, бурозубка обыкновенная; грызуны – полевка обыкновенная, мышь лесная, мышь домовая и заяц-русак; птицы – баклан большой, цапля серая, чайка озерная, чайка-хохотунья, речная крачка, грач, ворона серая, галка, сорока, скворец, воробей полевой). При исследовании на боррелиоз 28 проб оказались положительными. Во всех пробах обнаружена ДНК *B. afzelii* (12,2 %) (имаго и нимфы клещей – все три вида; мухи-кровососки – пулы по 50–100 экз.; насекомоядные – белозубка малая; грызуны – полевка обыкновенная, мышь лесная, мышь домовая; птицы – чайка озерная, грач, ворона серая). При выявлении в ПЦР ДНК *Ehrlichia spp.* (2,6 %) положительными оказались 6 проб (имаго клещей – пулы по 10 экз.; грызуны – мышь домовая; птицы – чайка озерная, ворона серая, воробей полевой). В двух пробах обнаружена ДНК *A. phagocytophilum* (0,9 %) (имаго клещей *I. ricinus*, пулы по 10 экз.). В исследованных пробах ДНК *E. muris/yamodoguchi* не обнаружено.

В 2016 г. исследовано 469 проб (клещи *I. ricinus*, *R. rossicus*, *D. marginatus*, *H. marginatus*, *D. reticulatus*, комары, мухи-кровососки, оводы и др., всего 25 видов); насекомоядные – бурозубка обыкновенная, белозубка малая; рукокрылые – рыжая вечерница, нетопырь-карлик, нетопырь средиземноморский, поздний кожан; грызуны – полевка обыкновенная, мышь лесная, мышь домовая, мышь желтогорлая, крыса серая и заяц русак; птицы – баклан большой, цапля серая, чайка озерная, чайка-хохотунья, речная крачка, ласточка деревенская, галка, грач, ворона серая, сорока, скворец, воробей полевой. При ПЦР-анализе на наличие ДНК возбудителей боррелиоза 153 пробы (32,6 %) оказались положительными; все возбудители принадлежат к виду *B. afzelii*. При выявлении в ПЦР ДНК эрлихий положительными ока-

зались 100 проб (21,3 %). В десяти из них выявлена ДНК *E. muris/yamodoguchi* (2,1 %) (имаго клещей – все виды; грызуны – мышь лесная). В десяти пробах обнаружена ДНК *A. phagocytophilum* (2,1 %) (имаго клещей; рукокрылые – рыжая вечерница; грызуны – мышь лесная, мышь домовая).

Таким образом, процент обнаружения ДНК возбудителей клещевых инфекций в среднем за три года составил: *B. afzelii* – 16,7 %; *Ehrlichia spp.* – 11,0 %; *A. phagocytophilum* – 2,4 % и *E. muris/yamodoguchi* – 0,7 %.

ДНК *B. burgdorferi s.l.* генотипа *B. afzelii* выявлена в пробах клещей *I. ricinus*, собранных в открытых станциях, лесных биотопах Азовского, Веселовского, Матвеево-Курганского, Куйбышевского, Каменского, Аксайского, Усть-Донецкого, Шолоховского районов и городов Каменск-Шахтинский, Новошахтинск, Гуково, Зверево, Ростов-на-Дону; снятых с людей в Боковском, Тарасовском, Матвеево-Курганском, Семикаракорском, Шолоховском районах, городах Красный Сулин, Миллерово, Таганрог, Сальск; с крупного рогатого скота – в Шолоховском, Кагальницком районах; снятых с других прокормителей (собаки, ежи) в Шолоховском районе и в пробах от млекопитающих: белозубки малой, полевки обыкновенной, мышей домовой и лесной, крысы серой, зайца-русака, что подтверждает существование природного очага ИКБ на территории области. Положительный результат получен в пробах от летучих мышей (кожан поздний, нетопырь-карлик, вечерница рыжая), доставленных из Азовского района. По мнению В.В.Кучерука [6], эти находки следует расценивать как случайное вовлечение рукокрылых в эпизоотии, протекающие в популяциях других млекопитающих. Положительные результаты проб от баклана большого, цапли серой, чайки озерной, грача, вороны серой, сороки, скворца обыкновенного, воробья полевого, добытых в Азовском, Веселовском, Каменском, Мясниковском, Аксайском, Сальском, Неклиновском районах, указывают на экологическую связь боррелий с птицами, которые могут быть резервуаром возбудителей и носителями зараженных клещей [12].

Таким образом, с использованием ПЦР-диагностики установлено, что переносчиками и резервуаром *B. burgdorferi s.l.* генотипа *B. afzelii* в природных очагах преимущественно с интразональными лесными ландшафтами, а также в антропоургических очагах являются иксодовые клещи *I. ricinus*, *R. rossicus*, *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *H. punctata*, *H. marginatus*.

С учетом векторного и гостального компонентов природного очага ИКБ, а именно инфицированных клещей, их прокормителей и птиц, установлено, что ареал *B. burgdorferi s.l.* включает 21 административный район и 10 городов Ростовской области. С 2013 г. природный очаг ИКБ является валентным в связи с выявлением и официальной регистрацией больных ИКБ в Ростовской области.

В 2014 г. впервые проведены с применением ПЦР исследования сочленов паразитарной системы на спонтанную зараженность возбудителями моноцитарного эрлихиоза человека. ДНК *Ehrlichia spp.* выявлены в пробах клещей – *D. marginatus*, *R. rossicus*; в пробах мелких млекопитающих – полевка обыкновенная, мышь домовая и мышь лесная; в пробе от скворца обыкновенного. Далее география обнаружения (с помощью ПЦР-анализа) и видовой состав переносчиков расширился. Так, по состоянию на 2016 г. в паразитарную систему природного очага входят: *D. marginatus* (Азовский, Мясниковский, Веселовский, Неклиновский районы, Ростов-на-Дону), *D. reticulatus* (Азовский, Матвеево-Курганский районы), *R. rossicus* (Веселовский, Матвеево-Курганский районы, Ростов-на-Дону), *I. ricinus* (Ростов-на-Дону, Азовский, Каменский, Куйбышевский Неклиновский районы); полевка обыкновенная (Ростов-на-Дону, Неклиновский район), мыши лесная (Куйбышевский, Веселовский районы, Ростов-на-Дону) и домовая (Веселовский район, Ростов-на-Дону), крыса серая (Ростов-на-Дону), заяц-русак (Аксацкий район и Ростов-на-Дону); чайка озерная (Неклиновский район), ласточка деревенская (Ростов-на-Дону); галка (Сальский район); грач (Аксацкий и Веселовский районы); ворона серая (Аксацкий район); скворец обыкновенный (Азовский район); воробей полевой (Аксацкий район). Таким образом, ареал распространения эрлихий включает восемь административных районов и город Ростов-на-Дону.

В 2015–2016 гг. ДНК возбудителя гранулоцитарного анаплазмоза человека (*A. phagocytophilum*) обнаружена в пробах от клещей *I. ricinus*, собранных в Манычском лесу Веселовского района и в г. Шахты. Установлено включение в циркуляцию возбудителя ГАЧ клещей *D. marginatus* (Мясниковский район), *D. reticulatus* (Азовский район) и *R. rossicus* (Ростов-на-Дону, Матвеево-Курганский район); мелких млекопитающих – мышь лесная и рыжая вечерница (Ростов-на-Дону), мышь домовая (Мясниковский район); птиц – ворона серая (Неклиновский район).

В 2014 г. впервые на территории области проведены исследования сочленов паразитарной системы на наличие возбудителя МЭЧ и ГАЧ. *Ehrlichia spp.* выявлена в пробах клещей *D. marginatus*, *R. rossicus*, *H. punctata* и *I. ricinus*; в пробах комаров, кровососущих мух и в пробах мелких млекопитающих (в том числе летучих мышей) и птиц. Необходимо отметить, что территории, где выявлены *Ehrlichia spp.*, являются сочетанными с природными очагами клещевого вирусного энцефалита [1] и клещевыми боррелиозами.

Таким образом, использование ПЦР-диагностики, используемой в молекулярной эпидемиологии, позволило установить ежегодное расширение ареала боррелий с включением в циркуляцию новых видов иксодовых клещей, мелких млекопитающих и птиц. На территории области впервые выявлена

циркуляция возбудителей МЭЧ и ГАЧ и определенные территориально сочетанные очаги МЭЧ, ГАЧ и ИКБ. Сложившаяся ситуация требует комплексного подхода к профилактике заболеваний клещевыми инфекциями и диктует необходимость дальнейшего изучения всех компонентов паразитарных систем природных очагов. Проведение ПЦР-диагностики представляется важным для оценки распространения возбудителей клещевых инфекций на территории Ростовской области, прогнозирования эпидемиологической обстановки и проведение профилактических мероприятий в данном регионе.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дворцова И.В., Москвитина Э.А., Романова Л.В., Пичурина Н.Л., Орехов И.В., Забашта М.В., Савченко А.П. Сочетанные очаги «клещевых» природно-очаговых инфекций и микст-инфицированность на примере Ростовской области. *Пест-менеджмент*. 2015; 3:14–8.
2. Дворцова И.В., Москвитина Э.А., Романова Л.В., Пичурина Н.Л., Орехов И.В., Савченко А.П., Забашта М.В., Феров Д.А., Адаменко В.И. О выявлении «новых» для Ростовской области клещевых инфекций. *Пест-менеджмент*. 2016; 3:24–9.
3. Козлова И.В., Верхолина М.М., Демина Т.В., Джиоев Ю.П., Дорошенко Е.К., Лисак О.В., Карань Л.С., Колясников Н.М., Рар В.А., Фоменко Н.В., Ткачев С.Е., Богомазова О.Л., Борисов В.А., Злобин В.И. Сочетанные очаги трансмиссивных клещевых инфекций на территории Прибайкалья. *Эпидемиол. и вакцинопрофилактика*. 2010; 4(53):40–6.
4. Коренберг Э.И. Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами в лесной зоне, и стратегия их профилактики: изменение приоритетов. *Эпидемиол. и вакцинопрофилактика*. 2013; 5(72):7–17.
5. Кормиленко И.В., Пичурина Н.Л., Романова Л.В., Айдинов Г.Т., Швагер М.М., Москвитина Э.А. Выявление боррелий на территории Ростовской области методом ПЦР. *Вестник Российской военно-мед. академии*. 2008; (приложение, ч. 2):213–14.
6. Кучерук В.В. Млекопитающие – носители болезней, опасных для человека. В кн: Избранные труды по природной очаговости болезней. М.: Русаки; 2006. С. 306.
7. Орлова Т.Н., Василенко Н.Ф., Афанасьев Е.Н., Чумакова И.В., Санникова И.В., Куличенко А.Н. Изучение циркуляции возбудителя Лайм боррелиоза в Ставропольском крае. *Пробл. особо опасных инф.* 2008; 2(96):20–2.
8. Попов Н.В., Куклев Е.В., Топорков В.П., Адамов А.К., Щербак С.А., Малецкая О.В., Ковтунов А.И., Яшкуль К.Б., Кабин В.В., Подсвилов А.В., Кологоров А.И., Кузнецов А.А., Матросов А.Н., Князева Т.В., Григорьев М.П., Санджиев В.Б.Х., Осипов В.П., Пискунова Н.В., Сангаджиева Г.В. Сочетанные природные очаги бактериальных, риккетсионных и вирусных инфекционных болезней в регионе Северо-Западного Прикаспия. *Пробл. особо опасных инф.* 2010; 1(103):44–7.
9. Hubalek Z. Epidemiology of Lyme borreliosis. *Curr. Probl. Dermatol.* 2009; 37:31–50.
10. Mayne P.J. Emerging incidence of Lyme borreliosis, babesiosis and granulocytic ehrlichiosis in Australia. *Int. J. Gen. Med.* 2011; 4:845–52.
11. Rizzoli A., Hauffe H., Carpi G., Vourch G., Neteler M., Rosa R. (2011). Lyme borreliosis in Europe. *Euro Surveill.* 2011; 16:1–8.
12. Olsen B., Jaenson T.G., Bergstrom S. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infected tick on migrating birds. *App. Environ. Microbiol.* 1995; 61:3082–87.
13. Swaison K.J., Norris D.E. Co-circulation microorganisms in questing *Ixodes scapularis* nymphs in Maryland. *J. Vector Ecol.* 2007; 32(2):243–51.
14. Wilhelmsson P., Eryland L., Borjesson S., Nordgren J., Bergstrom S., Emerudt J., Torsberg P., Lidgren P.F. Prevalence and diversity of *Borrelia* species in ticks that have bitten humans in Sweden. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(11):4169–76.

References

1. Dvortsova I.V., Moskvitina E.A., Romanova L.V., Pichurina N.L., Orekhov I.V., Zabashita M.V., Savchenko A.P. [Combined foci of tick-borne

natural-focal infections and mixed infection by the example of the Rostov Region]. *Pest-Management*. 2015; 3:14–8.

2. Dvortsova I.V., Moskvitina E.A., Romanova L.V., Pichurina N.L., Orekhov I.V., Savchenko A.P., Zabashta M.V., Feronov D.A., Adamenko V.I. [Concerning the “new” for the Rostov Region tick-borne infections]. *Pest-Management*. 2016; 3:24–9.

3. Dzhiyev Yu.P., Doroshchenko E.K., Lisak O.V., Karan' L.S., Kolyasnikova N.M., Rar V.A., Fomenko N.V., Tkachev S.E., Bogomazova O.L., Borisov V.A., Zlobin V.I. [Combined foci of transmissible tick-borne infections in the territory of the Baikal region]. *Epidemiol. Vaksino prof.* 2010; 4(53):40–6.

4. Korenberg E.I. [Tick-borne infections in the forest landscapes and strategy for their prevention: shift of priorities]. *Epidemiol. Vaksino prof.* 2013; 5(72):7–17.

5. Kormilenko I.V., Pichurina N.L., Romanova L.V., Aidinov G.T., Shvager M.M., Moskvitina E.A. [Detection of *Borrelia* in the territory of the Rostov Region using PCR]. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2008; (Suppl., Pt 2):213–4.

6. Kucheruk V.V. [Mammals – carriers of the diseases hazardous for humans]. In: [Selected Works on Natural Focality of the Diseases]. M.: “Rusaki”, 2006; 306 p.

7. Orlova T.N., Vasilenko N.F., Afanasiev E.N., Chumakova I.V., Sannikova I.V., Kulichenko A.N. [Studying the circulation of etiological agent of Lyme borreliosis in Stavropol Region]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2008; 2(96):20–2.

8. Popov N.V., Kouklev E.V., Toporkov V.P., Adamov A.K., Scherbakova S.A., Maletskaya O.V., Kovtunov A.I., Yashkulov K.B., Kabin V.V., Podsvirov A.V., Kologorov A.I., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Knyazeva T.V., Grigoryev M.P., Sandzhiev V.B.-Kh., Ossipov V.P., Piskunova N.V., Sangadzhieva G.V. [Combined natural foci of bacterial, rickettsial, and viral infectious diseases in the north-west Precaspian Region]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2010; 1(103):44–7.

9. Hubalek Z. Epidemiology of Lyme borreliosis. *Curr. Probl. Dermatol.* 2009; 37:31–50.

10. Mayne P.J. Emerging incidence of Lyme borreliosis, babesiosis and granulocytic ehrlichiosis in Australia. *Int. J. Gen. Med.* 2011; 4:845–52.

11. Rizzoli A., Haufler H., Carpi G., Vourch G., Neteler M., Rosa R. (2011). Lyme borreliosis in Europe. *Euro Surveill.* 2011; 16:1–8.

12. Olsen B., Jaenson T.G., Bergstrom S. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infected tick on migrating birds. *App. Environ. Microbiol.* 1995; 61:3082–87.

13. Swaison K.J., Norris D.E. Co-circulation microorganisms in questing *Ixodes scapularis* nymphs in Maryland. *J. Vector Ecol.* 2007; 32(2):243–51.

14. Wilhelmsson P., Eryland L., Borjesson S., Nordgren J., Bergstrom S., Ernerud J., Torsberg P., Lidgren P.F. Prevalence and diversity of *Borrelia* species in ticks that have bitten humans in Sweden. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(11):4169–76.

Authors:

Romanova L.V., Dvortsova I.V., Moskvitina E.A., Borodina T.N., Pichurina N.L., Savchenko A.P., Zabashta M.V., Orekhov I.V., Zabashta A.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:

Романова Л.В., Дворцова И.В., Москвитина Э.А., Бородин Т.Н., Пичурин Н.Л., Савченко А.П., Забашта М.В., Орехов И.В., Забашта А.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 10.05.17.

Ю.В.Рыжков¹, Э.А.Москвитина²

ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ САНИТАРНО-КАРАНТИННОГО КОНТРОЛЯ В УСЛОВИЯХ ЧРЕЗВЫЧАЙНОЙ СИТУАЦИИ СОЦИАЛЬНОГО ХАРАКТЕРА НА СОПРЕДЕЛЬНОЙ ТЕРРИТОРИИ

¹Управление Роспотребнадзора по Ростовской области, Ростов-на-Дону; ²ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Цель работы. Исполнение государственной функции санитарно-карантинного контроля в режиме повышенной готовности и в условиях чрезвычайной ситуации на сопредельной с Российской Федерацией территории. **Материалы и методы.** Использованы информационные материалы и отчетные данные Управления Роспотребнадзора по Ростовской области о работе автомобильных пунктов пропуска через Государственную границу Российской Федерации в режиме повышенной готовности (2013–2016 гг.). Рассмотрены особенности проведения санитарно-карантинного контроля (СКК) области при чрезвычайной ситуации социального характера на сопредельной с Российской Федерацией территории. **Результаты и выводы.** Показатели работы санитарно-карантинных пунктов (СКП) в плане досмотра транспортных средств и населения свидетельствовали о стабильно высоком транспортном потоке мигрирующего населения через многосторонние автомобильные пункты пропуска (МАПП) (2014–2016 гг.) с последующим перераспределением их между МАПП с учетом складывающейся обстановки. СКК в пунктах пропуска через государственную границу осуществлялся в режиме повышенной готовности к выявлению больных с подозрением на инфекционные болезни различной этиологии – полиэтиологическим факторам риска. Показана целесообразность использования «симптомного» подхода для выявления лиц с подозрением на инфекционные болезни с максимальным использованием возможностей других государственных контрольных органов. Особенности режима повышенной готовности в условиях социального конфликта на сопредельной территории являлось усиление межведомственного взаимодействия с МЧС и организациями Федерального медико-биологического агентства России.

Ключевые слова: санитарно-карантинный контроль, чрезвычайная ситуация, миграция населения, пункт пропуска, симптомы.

Корреспондирующий автор: Рыжков Юрий Владимирович, e-mail: master@61.rospotrebnadzor.ru.

Yu.V.Ryzhkov¹, E.A.Moskvitina²

Peculiarities of Sanitary and Quarantine Control under the Emergency Situation of Social Nature on the Adjacent Territory

¹Rospotrebnadzor Administration in the Rostov Region, Rostov-on-Don, Russian Federation; ²Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Objective of the work is to perform the sanitary and quarantine control (SQC) in the under emergency situation of on the neighboring with the Russian Federation territory. **Materials and methods.** Utilized were information materials and report data of the Rospotrebnadzor Administration in the Rostov Region on the activities of automobile border-crossing points in high alert regime (2013–2016). Considered were some peculiarities of the sanitary and quarantine control (SQC) in the Rostov Region under emergency situations of social nature in the neighboring with the Russian Federation territories. **Results and conclusions.** Performance efficiency of the sanitary-quarantine facilities (SQF) in terms of inspection of vehicles and population testify to the consistently high traffic and flow of migration through multilateral automobile points of entry (APE) (2014–2016), followed by their redistribution between the APE in the context of the unfolding situation. SQC at state border checkpoints was carried out in the high alert regime to identify sick persons suspected of infectious diseases of various etiologies – the multi-etiological risk factors. Demonstrated is the expediency of “symptomatic” approach for identification of persons with suspected communicable diseases using the maximum of capacities of other government control agencies. The main peculiarities of the high alert regime under social conflict in the neighboring areas are the strengthening of interdepartmental cooperation with the Ministry of Emergency Situations (MES) and the Federal Medical-Biological Agency of Russia.

Key words: sanitary-quarantine control, emergency situation, migration, checkpoint, symptoms.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Yuriy V. Ryzhkov, e-mail: master@61.rospotrebnadzor.ru.

Citation: Ryzhkov Yu.V., Moskvitina E.A. Peculiarities of Sanitary and Quarantine Control under the Emergency Situation of Social Nature on the Adjacent Territory. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 4:86–91. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-86-91

В пунктах пропуска через государственную границу Российской Федерации функция исполнения санитарно-карантинного контроля (СКК) определена законодательно статьей 30, п. 3, ФЗ № 52

от 30 марта 1999 г.; порядок, сроки и административные процедуры проведения СКК – санитарно-эпидемиологическими правилами СП 3.4.2318-08, а также регламентированы приказом Роспотреб-

надзора от 17 июля 2012 г. № 767.

Необходимо отметить, что различным аспектам санитарно-карантинного контроля в международных пунктах пропуска посвящены работы А.Е.Шияновой и соавт. [10], Г.Г.Онищенко и соавт. [6], В.А.Вишнякова и соавт. [2]. С вводом ММСП (2005 г.) для научной оценки сложившейся практики осуществления государственного санитарно-эпидемиологического надзора и СКК в пунктах пропуска через государственную границу Российской Федерации был предложен алгоритм и модульный принцип подхода при их осуществлении с учетом эпидемиологической и санитарно-гигиенической составляющей [6]. Санитарно-карантинный контроль в рамках Таможенного союза (ТС), этапы его формирования с переносом СКК на внешнюю границу ТС и решением вопросов нормативно-правового обеспечения, результаты СКК транспортных средств, пассажиров и грузов в 207 пунктах пропуска в 2011 г. представлены в монографии [9].

Организационные и противоэпидемические мероприятия в пунктах пропуска для обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в период подготовки и проведения саммита «Группы двадцати» в Санкт-Петербурге в 2013 г., массовых мероприятий с международным участием – XXVII Всемирной летней Универсиады в городе Казани, XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр в Сочи отражены в работах [6, 7, 8].

Организация и проведение санитарно-карантинного контроля в условиях чрезвычайной ситуации (ЧС) на территории, сопредельной с Российской Федерацией, являются актуальными и имеют значение для обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения, однако в литературе практически не отражены.

Цель работы – оптимизация исполнения государственной функции санитарно-карантинного контроля в режиме повышенной готовности и в условиях чрезвычайной ситуации на сопредельной с Российской Федерацией территории.

Материалы и методы

Использованы информационные материалы и отчетные данные Управления Роспотребнадзора по Ростовской области о работе автомобильных пунктов пропуска через государственную границу Российской Федерации в режиме повышенной готовности (2013–2016 гг.). Текстовый материал оформлен на ПК с применением офисного пакета MS Office 2010. Статистическую обработку осуществляли с использованием электронных таблиц системы Microsoft Excel, 2007.

Результаты и обсуждение

В 1990–2000 гг. в связи с прекращением существования СССР как единого государства, а также

с учетом международных транспортных сообщений в Ростовской области через государственную границу Российской Федерации с Украиной организуются автомобильные и железнодорожные пункты пропуска. В соответствии с «Соглашением между Правительством Российской Федерации и Правительством Украины о пунктах пропуска через государственную границу между Российской Федерацией и Украиной» от 08 февраля 1995 г. (с изменениями от 15 февраля 2011 г.) в Ростовской области функционировали 15 пунктов пропуска всех видов транспортных сообщений: многосторонних автомобильных пунктов пропуска (МАПП) – семь, двусторонний автомобильный пункт пропуска (ДАПП) – один, морских (МПП) – три, воздушных (ВПП) и железнодорожных пунктов пропуска (ЖДПП) – по два.

В настоящее время Ростовская область имеет более 600 км сухопутной границы с Луганской и Донецкой областями Украины, где в 2013 г. функционировали восемь автомобильных пунктов пропуска, из которых один являлся ДАПП (Чертково) и семь – МАПП (Весело-Вознесенка, Матвеев-Курган, Куйбышево, Новошахтинск, Донецк, Гукково, Волошино). В 2013 г. через автомобильные пункты пропуска проследовало 961061 транспортное средство, 2291946 чел., 7180 партий груза. Кроме того, в соответствии с «Соглашением между Правительством Российской Федерации и Кабинетом Министров Украины о порядке пересечения российско-украинской государственной границы жителями приграничных регионов Российской Федерации и Украины от 18 октября 2011» на государственной границе Российской Федерации с Украиной, на территории Ростовской области, в 2013 г. действовало 10 пешеходных переходов, по которым жители сопредельных административных территорий могли переходить границу упрощенно, без проведения таможенного, санитарно-карантинного, фитосанитарного и ветеринарного контроля. В соответствии с имеющимся двусторонним соглашением между Украиной и Россией планировалось к открытию в течение 2014–2016 гг. 50 упрощенных пешеходных переходов и не имеющего аналогов МАПП «Куйбышево-2», где предполагалось совместное с Украиной проведение всех видов контроля.

В связи со вспышкой холеры в 2011 г. в Донецкой области Украины [1] был усилен СКК с введением режима повышенной готовности, который сохранился в последующие годы, носил сезонный характер и связан был с настороженностью относительно возможного осложнения эпидемиологической обстановки по этой инфекции в Донецкой и Луганской областях. Таким образом, эпидемиологический надзор за холерой начинался в пунктах пропуска через государственную границу [4].

Обстановка коренным образом изменилась с марта 2014 г. Ситуацию на сопредельной с

Ростовской областью территории с этого времени можно было охарактеризовать, как чрезвычайную ситуацию социального характера, причиной которой стал внутригосударственный военно-политический конфликт. Последствиями ЧС стали разрушение инфраструктуры жизнеобеспечения населения (водоснабжения и водоотведения, удаления отходов, электрообеспечения), здравоохранения, транспортной инфраструктуры, системы социального обеспечения, что, в свою очередь, привело к активизации межгосударственной миграции населения с переходом от естественной миграции к вынужденной.

На вышеуказанных ДАПП и МАПП положительное сальдо миграции достигало с мая 2014 г. до 3500 чел. в сутки. Основной поток беженцев из Украины с апреля 2014 г. был направлен в Россию, в частности в Ростовскую область, через МАПП Донецк, Новошахтинск, Куйбышево, Матвеев-Курган, Весело-Вознесенка. В этих пунктах пропуска, помимо существующих направлений движения для грузового, пассажирского и индивидуального транспорта, отдельно были открыты пешеходные. Сопредельный пункт пропуска с украинской стороны с МАПП Волошино был уничтожен в ходе боевых действий, дорога со стороны Украины в МАПП Гуково была значительно повреждена, что привело к перераспределению потоков вынужденно мигрирующего населения по другим пунктам пропуска с максимальной нагрузкой на МАПП Донецк. Через ДАПП Чертовко осуществлялся пешеходный переход только жителей Донецкой области.

Необходимо отметить, что до ЧС на сопредельной территории через МАПП Донецк, Новошахтинск, Куйбышево, Матвеев-Курган, Весело-Вознесенка проследовало в 2013 г. 844399 транспортных средств, в 2014–2016 гг. – 460527, 816590, 883160 и осуществлен СКК соответственно. При анализе досмотренных при СКК транспортных средств, проследовавших по каждому из указанных МААП, установлено, что доля их увеличилась в пунктах пропуска МАПП Донецк – с 19,8 (2014 г.) до 32,7 % (2016 г.); МАПП Куйбышево – с 8,9 до 15,3 %; МАПП Матвеев-Курган – с 5,6 до 16,7 % соответственно (рис. 1). В МААП Новошахтинск отмечено некоторое снижение досмотренных средств – с 30,4

до 29,3 % при увеличении потока в 2,8 раза. Следует отметить снижение удельного веса с 25,3 в 2014 г. до 6,0 % в 2016 г. в МАПП Весело-Вознесенка, расположенном на границе с Украиной.

Выявлена тенденция роста в динамике проследовавшего населения через пункты пропуска и проведенного санитарно-карантинного контроля (рис. 2).

Показатели работы пунктов пропуска в плане досмотра транспортных средств и населения свидетельствовали о стабильно высоком транспортном потоке и проследовавшего населения через МАПП (2014–2016 гг.) с последующим перераспределением их между МАПП с учетом складывающейся обстановки. Данные обстоятельства объясняются интенсивностью военных действий и степенью разрушения инфраструктуры с сопредельной стороны.

Необходимо отметить, что среди лиц, пересекающих границу, значительно увеличилась доля женщин, детей и лиц преклонного возраста (до 86 % в отдельные дни). Кроме того, регулярно регистрировали движение автомобилей с ранеными и нуждающимися в неотложной квалифицированной медицинской помощи. В то же время из-за разрушенной промышленности и закрытого транзита грузопоток упал практически до нуля. Наибольшее количество лиц, перешедших границу через МАПП Донецк, наблюдалось в 2015–2016 гг. в связи с маятниковой миграцией населения по вопросам социального обеспечения (транзит через пункты пропуска в Ростовской и Белгородской областях на территорию других областей Украины и обратно).

Учитывая вышеизложенное, в соответствии с ММСП (2005 г.), ситуацию на сопредельной территории можно было охарактеризовать как чрезвычайную в области общественного здравоохранения, а в соответствии с СП 3.4.2318-08 – ЧС в области санитарно-эпидемиологического благополучия или ЧС санитарно-эпидемиологического характера [3, 10].

Поэтому с первых дней вооруженного конфликта при отсутствии информации о состоянии санитарно-эпидемиологической обстановки на сопредельной территории и, учитывая на данном фоне возможность активизации эпидемического процесса не только холеры, но и других, в том числе природно-

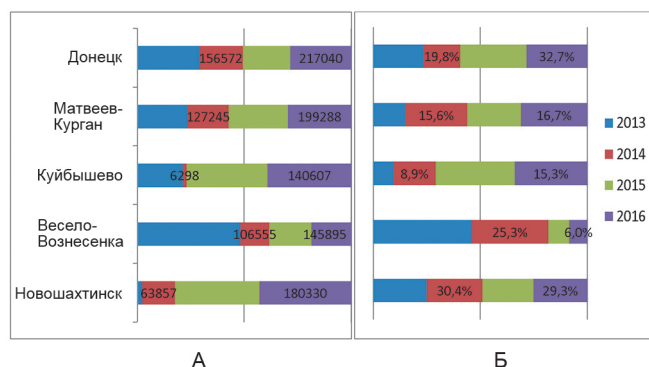


Рис. 1. Численность (А) и санитарно-карантинный контроль (Б) транспортных средств (%), проследовавших через МАПП

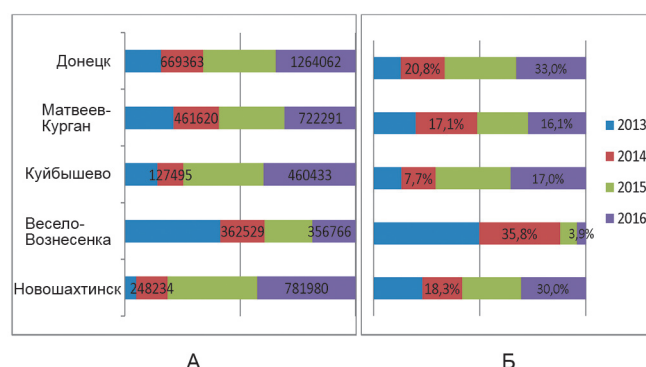


Рис. 2. Численность (А) и санитарно-карантинный контроль (Б) населения (%), проследовавшего через МАПП

очаговых инфекций, санитарно-карантинные пункты (СКП) в пунктах пропуска через государственную границу стали функционировать в режиме повышенной готовности по выявлению больных с подозрением на инфекционные болезни различной этиологии – полиэтиологическим факторам риска возникновения инфекционных заболеваний, представляющим опасность для санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Основной задачей работы санитарно-карантинных пунктов в режиме повышенной готовности было недопущение заноса опасных инфекционных болезней и активное выявление манифестных форм различных инфекционных болезней.

СКП укомплектован специалистами, имеющими среднее медицинское образование. Учитывая значительное увеличение потока беженцев и вынужденных переселенцев, формирование нескольких направлений движения через пункты пропуска и ограниченный кадровый ресурс специалистов, осуществляющих СКК, обеспечение выполнения поставленной задачи было возможно только в условиях формирования и поддержания настороженности, в том числе со стороны представителей других государственных контрольных органов (ГКО – пограничники, таможенники, служащие Россельхознадзора), к лицам с сигнальными признаками инфекционных болезней при осуществлении иных видов контроля.

Достигалось это посредством комплекса организационных мероприятий, осуществляемых в режиме повышенной готовности: направлением информационных писем по актуальным инфекционным болезням, проведением обучения специалистов государственных контрольных органов по эпидемиологии, сигнальным признакам актуальных болезней и их профилактики, вынесением вопросов по актуальным инфекциям на координационные советы пунктов пропуска, разработкой и выдачей памяток и проведением тактико-специальных учений с отработкой функциональных обязанностей каждого звена межведомственного взаимодействия. Необходимо отметить, что при этом учитывалась полиэтиологичность возможных факторов риска. Внимание сотрудников СКП и соответственно специалистов ГКО было направлено на возможное выявление больных с подозрением на холеру, чуму, оспу, полиомиелит, человеческий грипп, вызванный новым подтипом вируса, туберкулез, лихорадку Западного Нила, Крымскую геморрагическую лихорадку и другие, а также с учетом региональной инфекционной патологии.

Количество выявленных больных по основным автомобильным пунктам пропуска приведено в табл. 1.

Обращает на себя внимание не только значительный рост общего количества обнаруженных больных во всех пунктах пропуска, но и их высокая выявляемость со стороны представителей ГКО, что свидетельствовало об эффективности проведенных организационных мероприятий в режиме повышен-

ной готовности. Необходимо отметить, что из представителей ГКО больные были выявлены, в основном, сотрудниками пограничной службы, которые в силу своих функциональных (должностных и профессиональных) обязанностей проводят тщательный визуальный осмотр (контроль) лица человека, пересекающего границу, и при наличии должной настороженности, сформированной при выполнении мероприятий в режиме повышенной готовности, обращают внимание на внешние проявления болезни, сигнальные признаки – симптомы.

При ЧС санитарно-эпидемиологического характера, предположительно обусловленной инфекционной болезнью, вызванной патогенным биологическим агентом, согласно МУ 3.4.3008-12. Порядок эпидемиологической и лабораторной диагностики особо опасных, новых и возвращающихся инфекционных болезней, предусмотрено использование синдромного подхода. В существующем в МАПП режиме повышенной готовности, при отсутствии специалиста лечебного профиля, была применена и показала свою эффективность в охарактеризованной выше ситуации схема с первоначальным использованием так называемого «симптомного» подхода, когда сотрудники государственных контрольных органов выявляют возможного инфекционного больного, ориентируясь не на комплекс симптомов (синдром), а на сигнальный признак (симптом). Особенно такой подход актуален для специалистов других ГКО, он показал практическую значимость и для оперативного реагирования специалистов СКП в целях более раннего разобщения вероятного больного и окружающих. При получении информации от сотрудников других ГКО о выявлении лица, имеющего какой-либо из определенных симптомов инфекционной болезни, сотрудник, осуществляющий СКК, проводит первичную дифференциацию вероятности особо опасной инфекционной болезни, требующей проведения мероприятий по санитарной охране территории, используя синдромный подход с элементами эпидемиологического диагноза.

Такая организация и проведение СКК показала его применимость и целесообразность. Определены

Таблица 1

Выявление больных в пунктах пропуска при миграции населения с сопредельных с Ростовской областью территорий Украины в 2013–2016 гг.

Наименование пункта пропуска	Число выявленных больных в пунктах пропуска при миграции населения по годам					Выявлено сотрудниками других ГКО
	2013	2014	2015	2016	Всего	
Весело-Вознесенка	17	35	28	15	95	27
Донецк	8	27	125	281	441	49
Куйбышево	2	7	30	28	67	21
Матвеев-Курган	17	19	275	282	593	51
Новошахтинск	10	36	44	31	121	14
<i>Всего:</i>	54	124	502	637	1317	162

Таблица 2

Выявленные больные с подозрением на инфекционную болезнь в МАПП Ростовской области в 2013–2016 гг.

Наименование симптомов	Число выявленных больных по годам			
	2013	2014	2015	2016
Лихорадка (повышенная температура)	30	81	431	556
Сыпь	-	4	11	5
Тошнота, рвота	9	9	22	19
Диарея (понос)	6	12	17	24
Желтуха	1	-	2	2
Неврологические симптомы (судороги, потеря сознания, повышенная эмоциональность)	8	18	19	31
<i>Всего</i>	54	124	502	637

симптомы (лихорадка, сыпь, тошнота, рвота, понос, желтуха, неврологические симптомы), проявление которых при сформированной настороженности являлись основанием для реализации схем информации при выявлении больного с подозрением на инфекционную болезнь и проведения других мероприятий, предусмотренных межведомственным оперативным планом. Распределение выявленных больных с подозрением на инфекционную болезнь по указанным симптомам за 2013–2016 гг. в пунктах пропуска Донецк, Весело-Вознесенка, Матвеев-Курган, Новошахтинск, Куйбышево представлено в табл. 2.

Показатели выявления больных в МАПП на основе «симптомного» подхода в 2016 г. более чем в 11 раз превышали их количество в 2013 г.

При выявлении в пункте пропуска лица с одним из указанных клинических симптомов специалистами СКП осуществлялся вызов специалиста лечебного профиля (бригады скорой медицинской помощи) для оказания первой врачебной помощи, проведения дифференциальной диагностики с учетом собранного эпиданамнеза, постановки предварительного диагноза.

В значительной части случаев диагноз инфекционного заболевания при обследовании специалистами лечебного профиля не подтверждался, а симптоматика (повышенная температура, тошнота, рвота, диарея, слабость, головная боль) была обусловлена внешними неспецифическими факторами и психоэмоциональным состоянием лиц, вынужденных покинуть свои дома.

Особенностями режима повышенной готовности в условиях вооруженного социального конфликта на сопредельной территории являлось также усиление межведомственного взаимодействия, в том числе и со структурами, находящимися вне пунктов пропуска. На территории, прилегающей к пунктам пропуска, были развернуты полевые лагеря МЧС России, осуществляющие в том числе медицинскую сортировку беженцев и временных переселенцев. Налаженное взаимодействие позволило сделать санитарно-карантинный контроль лиц в пунктах

пропуска первым этапом сортировки и в то же время обеспечить оперативное реагирование специалистов лечебного профиля со стороны МЧС на факт выявления подозрительных на инфекционную болезнь в пункте пропуска, оказание первой квалифицированной медицинской помощи и проведение дифференциальной диагностики. Аналогичное взаимодействие налажено с организациями Федерального медико-биологического агентства России.

Следует отметить, что одной из основных особенностей работы СКП в этот период являлось функционирование их во время боевых действий, проходивших в непосредственной близости от пунктов пропуска. Сопредельные пункты пропуска несколько раз переходили из рук в руки различных вооруженных формирований. Украинский пункт пропуска Красная Таловка, сопредельный с МАПП Волошино, был полностью разрушен артиллерией. За 2014–2015 гг. специалисты СКП в пунктах пропуска на российско-украинской границе эвакуировались 27 раз из-за непосредственной угрозы жизни. Здание СКП в МАПП Новошахтинск было повреждено артиллерийским снарядом, вагончик СКП в МАПП Волошино получил пулевые отверстия. Работники СКП осуществляли свою деятельность в армейских касках и бронежилетах.

Таким образом, санитарно-карантинный контроль при чрезвычайной ситуации социального характера на сопредельной территории проводился при значительном увеличении количества населения, пересекающего границу, и направлений движения в пунктах пропуска; максимальном сокращении и прекращении грузовых перевозок и значительном увеличении пешеходных переходов через пункты пропуска; полиэтиологичности факторов риска для санитарно-эпидемиологического благополучия населения; значительном числе выявленных психоэмоциональных реакций у пересекающих границу лиц, имеющих внешнее проявление, сходное с симптомами инфекционных болезней; угрозе жизни и здоровью сотрудников СКП.

Особенности проведения санитарно-карантинного контроля в условиях ЧС на сопредельной территории основаны на межведомственном взаимодействии, включающем звенья, не используемые в обычном режиме, «симптомном» подходе при выявлении лиц с подозрением на инфекционные болезни, перераспределении сил и средств СКК с использованием возможностей других государственных контрольных органов при соблюдении максимально возможных условий безопасности специалистов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беломеря Т.А., Дараган Г.Н., Денисенко В.И., Родина Р.А., Домашенко О.Н., Акимов Л.С., Гусаков Г.Н., Антонова Л.П., Моховик С.В. Организация противоэпидемических мероприятий по локализации очага холеры в Донецкой области. *Мед.*

вестник юга России. 2014; (2):118–22.

2. Вишняков В.А., Носков А.К. Санитарная охрана территории субъекта Российской Федерации. Сообщение 3. Трехуровневая система управления эпидемиологическими рисками, ассоциированными с инфекционными болезнями, представляющими опасность для населения, на уровне муниципальных районов. *Бюл. ВШНЦ СО РАМН*. 2013; 2(1):145–8.

3. Международные медико-санитарные правила (2005 г.). ВОЗ. Женева; 2007. 82 с.

4. Москвитина Э.А. Современные тенденции в развитии седьмой пандемии холеры. *Пробл. особо опасных инф.* 2008; 1:22–6.

5. Онищенко Г.Г., редактор. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в период подготовки и проведения саммита АТЭС-2012. Новосибирск; 2013. 419 с.

6. Онищенко Г.Г., Кузькин Б.П., Ракитин И.А., Башкетова Н.С., Коржаев Ю.Н., Гречанинова Т.А., Дятлов И.А., Кутырев В.В., Топорков А.В., Карнаухов И.Г., Топорков В.П., Щербак С.А., Казакова Е.С., Шарова И.Н. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в период подготовки и проведения саммита «Группы двадцати» в Санкт-Петербурге в 2013 г. Сообщение 1. Эпидемиологические риски и основные направления мероприятий по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия в период подготовки к проведению саммита. *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 4:5–10.

7. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. XXVII Всемирная летняя универсиада 2013 года в Казани. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия. Тверь: Издательство «Триада»; 2013. 528 с.

8. Онищенко Г.Г., Куличенко А.Н., редакторы. XXII Олимпийские зимние игры и XI паралимпийские зимние игры 2014 года в Сочи. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия. Тверь: Издательство «Триада»; 2015. 576 с.

9. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Санитарная охрана территории Российской Федерации в современных условиях. Саратов: ООО «Буква»; 2014. 460 с.

10. Шиянова А.Е., Топорков В.П., Дмитриева Л.Н., Кабаев С.Ю. Правовые основы санитарно-эпидемиологических правил «Санитарная охрана территории Российской Федерации» (2008 г.) (материалы к разделам I–IV СП 3.4.2318-08). *Пробл. особо опасных инф.* 2009; 2(100):38–43.

References

1. Belomerya T.A., Daragan G.N., Denisenko V.I., Rodyna R.A., Domashenko O.N., Akimova L.S., Gusakov G.N., Antonova L.P., Mikhovik S.V. [Management of anti-epidemic measures on the containment of cholera focus in the Donetsk Region]. *Med. Bulletin of the South of Russia*. 2014; (2):118–22.

2. Vishnyakov V.A., Noskov A.K. [Sanitary protection of the territories of RF constituent entity. Communication 3. Three-level system of epidemiological risk management, associated with infectious diseases that pose a threat to the population at the level of municipal districts]. *Bulletin of the East Siberian Scientific Center; RAMS Siberian Branch*. 2013; 2(1):145–8.

3. International Health Regulations (2005). WHO. Geneva; 2007. 82 p.

4. Moskvitina E.A. [Current trends in the evolution of the seventh cholera pandemics]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2008; 1:22–6.

5. Onishchenko G.G., editor. [Provision of Sanitary-Epidemiological Welfare of the Population during APEC Summit-2012]. Novosibirsk; 2013. 419 p.

6. Onishchenko G.G., Kuz'kin B.P., Rakitin I.A., Bashketova N.S., Korzhaev Yu.N., Grechaninova T.A., Dyatlov I.A., Kutyrev V.V., Toporkov A.V., Karnaukhov I.G., Toporkov V.P., Shcherbakova S.A., Kazakova E.S., Sharova I.N. [Sanitary-epidemiological welfare provision in the preparations to and management of the "G-20" Summit in Saint-Petersburg, 2013. Communication 1. Epidemiological risks and core operations for sanitary-epidemiological welfare provision in the preparations to the Summit]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 4:5–10.

7. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [XXVII World Summer Universiade-2013 in Kazan. Provision of Sanitary-Epidemiological Welfare of the Population]. Tver: "Triada"; 2013. 528 p.

8. Onishchenko G.G., Kulichenko A.N., editors. [XXII Winter Olympic Games and XI Paralympics, 2014 in Sochi. Provision of Sanitary-Epidemiological Welfare of the Population]. Tver: "Triada"; 2015. 576 p.

9. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Sanitary Protection of the Territories of the Russian Federation under Current Conditions]. Saratov: "Bukva", Ltd.; 2014. 460 p.

10. Shiyanova A.E., Toporkov V.P., Dmitrieva L.N., Kabaev S.Yu. [Legal basis of sanitary and epidemiologic regulations "Sanitary Protection of the Russian Federation Territory" (2008) (Materials for Issues I–IV SR 3.4.2318-08)]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2009; 2:38–43.

Authors:

Ryzhkov Yu.V. Rospotrebnadzor Administration in the Rostov Region. 17, 18th Line, Rostov-on-Don, 344109, Russian Federation. E-mail: master@61.rospotrebnadzor.ru.

Moskvitina E.A. 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:

Рыжков Ю.В. Управление Роспотребнадзора по Ростовской области. Российская Федерация, Ростов-на-Дону, 344109, ул. 18 линия, 17. E-mail: master@61.rospotrebnadzor.ru.

Москвитина Э.А. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.

Поступила 22.08.17.

М.В.Цимбалистова, Н.В.Павлович, Н.В.Аронова, И.А.Чайка, С.О.Чайка, А.С.Водопьянов

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРИРОДНЫХ И АНТИГЕН-ИЗМЕНЕННЫХ ШТАММОВ ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА

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

Цель работы. Сравнительное изучение белковых профилей типичных вирулентных и изогенных авирулентных ЛПС-дефектных штаммов туляремии микроба с помощью масс-спектрометрического анализа. **Материалы и методы.** В работе использовали 6 родительских вирулентных (трех основных подвидов) и 8 изогенных авирулентных штаммов *Francisella tularensis*, имеющих различные повреждения в структуре ЛПС. Получение спектров исследуемых культур методом MALDI-TOF MS проводили с использованием масс-спектрометра Autoflex speed III Bruker Daltonics и программного обеспечения Flex Control, идентификацию – с помощью программы Biotyper, база данных которой была расширена нами ранее внесением масс-спектров 40 типичных штаммов *F. tularensis* трех основных подвидов. **Результаты и выводы.** При оценке влияния пробоподготовки образцов на качество снимаемых спектров с помощью трех методов (экстракция матрицей, ТФУ и этиловым спиртом) показано, что наиболее эффективным является метод обработки бактерий этиловым спиртом и муравьиной кислотой. Согласно полученным данным, типичные вирулентные штаммы туляремии микроба трех основных подвидов имеют существенные различия в мажорных пиках, что позволяет использовать MALDI-TOF MS для проведения подвидовой дифференциации. Вместе с тем при сравнительном изучении белковых спектров вирулентных и авирулентных штаммов *F. tularensis* принципиальных отличий не выявлено. При этом нам удалось обнаружить единичные масс-спектры m/z 4673, 6929, характерные для вирулентных, и m/z 7256 – для авирулентных штаммов. Таким образом, метод MALDI-TOF MS дает возможность достоверно определять подвидовую принадлежность штамма, однако не позволяет проводить дифференциацию штаммов разной степени вирулентности. Результаты выявили, что MALDI-TOF может быть полезным как при идентификации типичных, так и антиген-измененных ЛПС-дефектных штаммов *F. tularensis*.

Ключевые слова: *F. tularensis* трех основных подвидов, авирулентные ЛПС-дефектные мутанты, MALDI-TOF, вирулентность.

Корреспондирующий автор: Павлович Наталья Владимировна, e-mail: tularemia@antiplague.ru.

M.V.Tsimbalistova, N.V.Pavlovich, N.V.Aronova, I.A.Chaika, S.O.Chaika, A.S.Vodop'yanov

Mass Spectrometric Analysis of Natural and Antigen-Modified Strains of Tularemia Agent

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

Objective. Comparative study of the protein profiles of typical virulent strains and their isogenic avirulent LPS-defective mutants of *Francisella tularensis* using mass spectrometric analysis. **Materials and methods.** Six typical virulent strains of *F. tularensis* of three main subspecies and eight isogenic avirulent variants which have different lesions in LPS structure were used in this investigation. Protein spectra were obtained by MALDI-TOF MS using mass spectrometer Autoflex speed III Bruker Daltonics and Flex Control software of Biotyper. Earlier we expanded the database by introduction of the mass spectra of 40 typical *F. tularensis* strains of the three main subspecies. **Results and conclusions.** It was shown that the high quality spectrograms were obtained by means of the extraction of bacteria with ethanol supplemented with formic acid, as compared with two other methods (extraction matrix or TFA). According to the data received, the typical virulent strains of tularemia agent of the three main subspecies have significant differences in the major peaks of protein profiles. This suggests that MALDI-TOF MS can be used for the subspecies differentiation of *F. tularensis*. However, a comparative study of the protein spectra of virulent and isogenic avirulent *F. tularensis* strains of the same subspecies did not detect any essential differences. We were able to identify only two individual peaks (m/z 4673, 6929) which were characteristic of all virulent strains and one peak (m/z 7256) – of all avirulent strains. Thus, MALDI-TOF MS allows for reliable determination of the subspecies affiliation of *F. tularensis* strains but does not allow for evaluation of the strains' virulence. The results indicate that MALDI-TOF MS is a useful method for identification of typical and antigen-modified LPS-defective *F. tularensis* strains.

Key words: *F. tularensis* of three main subspecies, LPS-defective avirulent mutants, MALDI-TOF, virulence.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Natalia V. Pavlovich, e-mail: tularemia@antiplague.ru.

Citation: Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V., Aronova N.V., Chaika I.A., Chaika S.O., Vodop'yanov A.S. Mass Spectrometric Analysis of Natural and Antigen-Modified Strains of Tularemia Agent. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2017; 4:92–96. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-92-96

Туляремия относится к опасным инфекционным болезням человека, природные очаги которой широко распространены в северном полушарии Земли. В

Российской Федерации активные эндемичные очаги туляремии зарегистрированы от западных границ до Дальнего Востока и от полуострова Таймыр до юж-

ных границ. Это определяет необходимость постоянного эпидемиологического контроля за состоянием очагов. В то же время полиморфизм клинической картины заболевания, отсутствие настороженности врачей инфекционистов и снижение иммунной прослойки населения увеличивают риск возникновения эпидемических осложнений. Иллюстрацией может служить недавняя вспышка туляремии в Ханты-Мансийске, когда на фоне снижения вакцинации населения заболело более 1000 человек [2].

Нельзя не учитывать и тот факт, что *Francisella tularensis* может быть использована в биотеррористических целях (список А наиболее опасных инфекционных агентов) [12]. При этом потенциальным противником возможно применение вариантов с измененной антигенной структурой, маркерами антибиотикоустойчивости или генетическими модификациями, что существенно осложнит индикацию и идентификацию возбудителя. В связи с вышеперечисленным совершенствование методов лабораторной диагностики туляремии, которые позволят выявлять не только типичные природные штаммы туляремиального микроба, но и бактерии с измененными свойствами, сохраняет свою актуальность.

В настоящее время лабораторная диагностика туляремии базируется как на традиционных (бактериологические, биологические, иммунологические, аллергические), так и современных молекулярно-биологических методах (ПЦР-анализ, иммунохроматографические, протеомные). Однако выделение чистой культуры и идентификация возбудителя трудоемки и требуют нескольких дней, иммунологические методы эффективны не ранее, чем с 7-го дня заболевания. Более того, большинство серологических методов (РА, РНГА, ИФА, ИХ-тесты), основанных на детекции антител против специфических эпитопов ЛПС, становятся малоинформативными при изменении антигенной структуры туляремиального микроба.

Безусловными преимуществами обладают молекулярно-биологические методы – ПЦР- и масс-спектрометрический анализ. Например, ПЦР позволяет в течение 3 ч определить наличие в пробе от 10^2 до 10^3 м.к., включая антиген-измененные штаммы. Вместе с тем присутствие в пробе контаминации (ДНК других бактерий) может приводить к ложноположительным результатам или ингибировать реакцию [8].

MALDI-TOF уже зарекомендовал себя как высокоспецифичный и быстрый метод при идентификации различных микроорганизмов. Так, база данных MALDI-TOF Biotyper включает белковые профили более 4000 видов бактерий. Однако в поставляемой в Российскую Федерацию версии идентификационной базы отсутствуют данные референсных спектров микроорганизмов I–II групп патогенности, в том числе возбудителей чумы, холеры, туляремии, бруцеллеза, сибирской язвы [1]. Более того, масс-спектрометрическому изучению возбудителя туляремии посвящено незначительное количество работ,

которые выполнены, в подавляющем большинстве, на ограниченном наборе типичных природных штаммов [1, 9, 10]. Результаты единичных исследований, посвященных белковому профилированию антиген-измененных вариантов, не позволяют сделать однозначные выводы о возможности использования масс-спектрометрии при их идентификации и оценке вирулентности. В этой связи представляет интерес накопление экспериментальных данных по характеристике белковых профилей более широкого набора антиген-измененных штаммов, что и определило цель настоящего исследования.

Целью исследования было сравнительное изучение белковых профилей типичных вирулентных и изогенных авирулентных ЛПС-дефектных штаммов туляремиального микроба с помощью масс-спектрометрического анализа.

Материалы и методы

В работе использовали 6 родительских вирулентных (трех основных подвидов) и 8 изогенных авирулентных штаммов *F. tularensis*, имеющих различные повреждения в структуре ЛПС, из авторской коллекции д.м.н. Н.В.Павлович. Получение и характеристика антиген-измененных вариантов описаны нами ранее [4]. Все культуры хранились в лиофилизированном состоянии в музее живых культур ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора. Бактерии выращивали на специальной плотной среде Т [3].

Изучение антигенных свойств штаммов проводили с помощью РНАт с туляремиальным антигенным эритроцитарным диагностикумом (производства ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора) согласно рекомендациям МУК 4.2.2939-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики туляремии для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней».

Вирулентность бактерий изучали на модели беспородных белых мышей, зараженных 10^1 – 10^8 м.к./мышь, по соотношению павших животных к выжившим.

Получение спектров исследованных культур методом MALDI-TOF масс-спектрометрии проводили с использованием масс-спектрометра Autoflex speed III Bruker Daltonics (Германия) и программного обеспечения Flex Control, идентификацию – с помощью программы Biotyper, база данных которой была расширена нами ранее внесением масс-спектров 40 типичных штаммов *F. tularensis* трех основных подвидов (государственная регистрация базы данных № 2014621080 от 04.08.2014 г.).

Для оценки влияния пробоподготовки на качество получаемых спектров образцы из авирулентных антиген-измененных штаммов экстрагировали с помощью 3 методов: экстракция органическим растворителем (α -циано-гидроксикоричная кислота, мат-

рица), ТФУ и этанолом/муравьиной кислотой. Во всех случаях в качестве матрицы использовали α -циано-гидроксикоричную кислоту. Пробоподготовку образцов вирулентных штаммов (II группа патогенности) проводили методом экстракции этиловым спиртом и муравьиной кислотой в соответствии с рекомендациями МР 4.2.0089-14 «Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) для индикации и идентификации возбудителей I–II групп патогенности».

Конвертацию полученных raw-файлов проводили с использованием программы ProteoWizard [6], нормализацию и выравнивание пик-листов – с помощью программы MassUp [11]. Построение дендрограммы проводили с использованием программы MALDI-Tree (ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора). При этом соседние пики, отличающиеся на 3 и менее m/z , расценивали как один и тот же пик.

Результаты и обсуждение

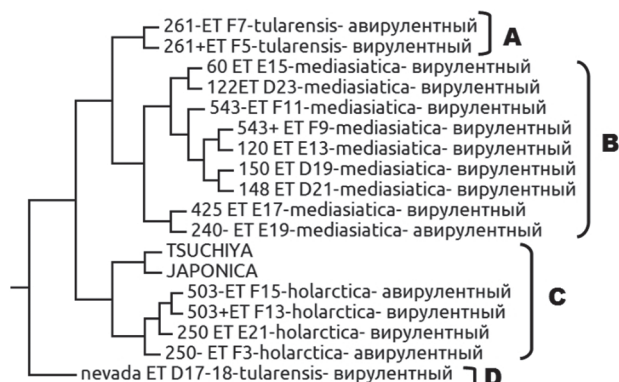
Проведенное нами ранее исследование свойств антиген-измененных штаммов показало, что, в отличие от родительских вирулентных штаммов туляремиального микроба, 6 из 8 вариантов не вступали в реакцию с туляремиальным антигенным эритроцитарным диагностикумом (РНАт) ($\geq 10^8$ м.к./мл) и не вызывали гибель лабораторных животных при больших дозах заражения ($DCL \geq 10^6$ м.к.). Эти штаммы синтезировали R-ЛПС, полностью лишенный О-полисахаридной цепи. Два из 8 антиген-измененных штаммов взаимодействовали с диагностикумом в РНАт (10^{7-8} м.к./мл), однако характеризовались сниженной вирулентностью для белых мышей ($DCL - 10^4 - 10^5$ м.к.). При этом они обладали дефектным S-ЛПС, отличающимся по частотному распределению и электрофоретической подвижности от S-ЛПС родительских типичных штаммов.

С целью оценки влияния методов пробоподготовки на качество снимаемых спектров использовали экстракцию белков из авирулентных вариантов

с помощью органического растворителя (матрица), ТФУ или этилового спирта/муравьиной кислоты. Сравнительный анализ показал, что наиболее качественные спектры получены при спиртовой экстракции. В частности, именно этот метод обеспечивал максимальное количество четких пиков. Подтверждением могут служить дендрограммы штаммов, обработанных разными методами, когда именно экстракция этиловым спиртом приводила к четкому распределению штаммов на четыре кластера, соответствующие трем основным подвидам с высоким уровнем достоверности (Score $\geq 2,3$), рисунок. Интересно, что один штамм, относящийся по биологическим и биохимическим свойствам к *F. tularensis subsp. tularensis*, образовывал отдельный кластер. В случае использования других методов пробоподготовки столь четких результатов не получено. Наши результаты согласуются с данными M. Drevinek *et al.* (2012), которые продемонстрировали, что максимальный выход белков при наилучшем соотношении уровня сигнал/шум в отношении возбудителей чумы, сапа, мелиоидоза, туляремии и бруцеллеза обеспечивает именно экстракция этиловым спиртом и муравьиной кислотой [7].

Следующий этап исследования включал сравнительное изучение белковых профилей типичных и антиген-измененных штаммов возбудителя туляремии. Как установлено, вне зависимости от структуры ЛПС (родительский S-, мутантный R или дефектный S-ЛПС) все исследованные вирулентные и авирулентные штаммы характеризовались идентичными белковыми профилями с незначительными индивидуальными различиями по пикам малой интенсивности. Анализ полученных белковых профилей вирулентных и авирулентных ЛПС-дефектных штаммов туляремиального микроба суммирован в таблице.

Согласно полученным данным, типичные вирулентные штаммы туляремиального микроба трех основных подвидов имеют существенные различия в мажорных пиках, что позволяет использовать MALDI-TOF MS для проведения подвидовой дифференциации. Вместе с тем при сравнительном изучении белковых спектров вирулентных и авирулентных штаммов *F. tularensis* принципиальных отличий не выявлено. При этом нам удалось обнаружить единич-



Дендрограмма, полученная на основе кластерного анализа образцов с обработкой этиловым спиртом и муравьиной кислотой

Сравнительный анализ пиков высокой интенсивности у штаммов туляремиального микроба, отличающихся по подвидовой принадлежности и уровню вирулентности для лабораторных животных

Штаммы <i>F. tularensis</i> трех основных подвидов	Пики, m/z
<i>subsp. tularensis</i> (AE-261 cap ⁺ , вирулентный)	5767, 5810, 6580, 8104, 11532
<i>subsp. holarctica</i> (503 cap ⁺ , вирулентный)	2748, 3338, 3438, 4452, 5145, 5243, 5312, 5555, 6610, 8904, 10289, 13217
<i>subsp. mediasiatica</i> (543 cap ⁺ , вирулентный)	2030, 2440, 2473, 2553, 3120, 3231, 3274, 3862, 4393, 4517, 4929, 6707, 7326, 7348, 8961
Штаммы Cap ⁺ (вирулентные)	4673, 6929
Штаммы Cap ⁻ (авирулентные)	7256

ные масс-спектры m/z 4673, 6929, характерные для вирулентных, и m/z 7256 – для авирулентных штаммов. Нельзя исключить, что они коррелируют со степенью вирулентности возбудителя туляремии, однако это предположение нуждается в подтверждении с использованием других программ для анализа белков с помощью масс-спектрометрического анализа.

Результаты проведенного исследования показали, что метод MALDI-TOF может быть использован при идентификации как типичных, так и антиген-измененных штаммов тулярийного микроба, имеющих повреждения в структуре ЛПС.

Таким образом, в настоящее время отсутствуют достоверные сведения о возможности циркуляции в природных очагах антиген-измененных вариантов возбудителя туляремии с ослабленной патогенностью. Однако активность эндемичных очагов в течение длительного времени не позволяет исключить вероятность существования подобных вариантов в природе (например, в межэпизоотийный период). При этом использование наиболее широко применяемых в эпизоотологических обследованиях традиционных методов (бактериологического, серологического или биологического) является малоэффективным. Поэтому для совершенствования эпидемического надзора за тулярией необходимо внедрение новых методов, позволяющих идентифицировать как типичные, так и атипичные штаммы *F. tularensis*. Одним из таких современных методов может быть идентификация бактерий по профилям наиболее консервативных рибосомальных белков с помощью MALDI-TOF. Вместе с тем в литературе мы встретили единственную работу по масс-спектрометрическому изучению аттенуированных мутантов штамма *F. tularensis* Schu4, дефектных по различным генам синтеза ЛПС. Как было показано, такие штаммы имели либо идентичный с родительским белковый профиль, либо незначительное снижение высоты основных пиков в зависимости от локализации мутаций [13]. В нашей работе мы провели сравнительный анализ масс-спектров коллекции из 8 изогенных ЛПС-дефектных (с различными повреждениями структуры ЛПС) и родительских вирулентных штаммов трех основных подвидов. Как установлено, наиболее эффективным методом пробоподготовки для возбудителя туляремии является экстракция этиловым спиртом/муравьиной кислотой. Выявлено, что вне зависимости от подвиговой принадлежности, степени повреждения ЛПС (дефектный S или R-хемотип) и степени аттенуации все измененные варианты возбудителя характеризовались сходным белковым профилем и идентифицированы как *F. tularensis* соответствующего подвида. Следовательно, внедрение в практику эпизоотологического обследования окружающей среды масс-спектрометрического анализа позволит расширить возможность обнаружения антиген-измененных культур возбудителя, уклоняющихся от традиционных методов лабораторной диагностики туляремии.

Полученные в настоящей работе результаты подтверждают сделанные нами ранее выводы о важной роли ЛПС в реализации патогенных свойств тулярийного микроба [5]. Можно предположить, что различия у вирулентных и авирулентных штаммов касаются не качественной композиции белков, а их, по-видимому, различной функциональной активности. Нельзя исключить также, что существенное значение при этом имеет полноценный ЛПС, представляющий белки в наиболее функционально активной форме. Однако этот вывод нуждается в более углубленном исследовании.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афанасьев М.В., Миронова Л.В., Балахонов С.В. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ для идентификации возбудителей чумы, холеры и туляремии. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2015; 33(2):3–8. DOI: 10.3103/S0891416815020020.
2. Мещерякова И.С., Добровольский А.А., Демидова Т.Н., Кормилицына М.И., Михайлова Т.В. Трансмиссивная эпидемическая вспышка туляремии в г. Ханты-Мансийске в 2013 году. *Эпидемиол. и вакцинопрофилактика.* 2014; 5(78):14–20.
3. Павлович Н.В., Мишанькин Б.Н. Прозрачная питательная среда для культивирования *Francisella tularensis*. *Антибиотики и мед. биотехнол.* 1987; 32(2):133–7.
4. Павлович Н.В., Мишанькин Б.Н., Шиманюк Н.Я., Рыжкова В.В., Данилевская Г.И., Михалевич Р.В. Характеристика биологических свойств бескапсульных вариантов *Francisella tularensis*. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 1993; 3:21–30.
5. Павлович Н.В., Тынянова В.И. Возможные механизмы реализации токсического потенциала липополисахаридов патогенных бактерий. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2005; 2:9–12.
6. Chambers M.C., Maclean B., Burke R., Amodi D., Ruderman D.L., Neumann S., Gatto L., Fischer B., Pratt B., Egerton J., Hoff K., Kessner D., Tasman N., Shulman N., Frewen B., Baker T.A., Brusniak M.Y., Paulse C., Creasy D., Flashner L., Kani K., Moulding C., Seymour S.L., Nuwaysir L.M., Lefebvre B., Kuhlmann F., Roark J., Rainer P., Detlev S., Hemenway T., Huhmer A., Langridge J., Connolly B., Chadick T., Holly K., Eckels J., Deutsch E.W., Moritz R.L., Katz J.E., Agus D.B., MacCoss M., Tabb D.L., Mallick P. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat. Biotechnol.* 2012; 30:918–20. DOI: 10.1038/nbt.2377.
7. Drevinek M., Dresler J., Klimentova J., Pisa L., Hubalek M. Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 2012; 55(1):40–4. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2012.03255.x.
8. Jiang J.J., Parker C.E., Fuller J.R., Kawula T.H., Borchers C.H. An Immunoaffinity tandem mass spectrometry (iMALDI) assay for detection of *Francisella tularensis*. *Anal. Clin. Acta.* 2007; 605(1):70–9.
9. Karatuna O., Celebi B., Can S., Akyar I., Kiliç S. The use of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry in the identification of *Francisella tularensis*. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* 2016; 16(2):132–8. DOI: org/10.17305/bjbm.2016.894.
10. Lai X.H., Zhao L.F., Chen X.M., Ren Y. Rapid identification and characterization of *Francisella* by molecular biology and other techniques. *Open Microbiol. J.* 2016; 10(suppl. 1):64–77. DOI: 10.2174/1874285801610010064.
11. López-Fernández H., Santos H.M., Capelo J.L., Fdez-Riverola F., Glez-Peña D., Reboiro-Jato M. Mass-Up: an all-in-one open software application for MALDI-TOF mass spectrometry knowledge discovery. *BMC Bioinformatics.* 2015; 16:318. DOI: org/10.1186/s12859-015-0752-4.
12. McLendon M.K., Apicella M.A., Allen L.A.H. *Francisella tularensis* taxonomy, genetics and immunopathogenesis of potential agent of biowarfare. *Annu. Rev. Microbiol.* 2006; 60:167–185. DOI: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142126.
13. Twine S., Vinogradov E., Lindgren H., Sjostedt A., Conlan J. Roles for wbtC, wbtL, and kdtA genes in lipopolysaccharide biosynthesis, protein glycosylation, virulence, and immunogenicity in *Francisella tularensis* strain SCHU S4. *Pathogens.* 2012; 1:12–29. DOI: 10.3390/pathogens1010012.

References

1. Afanas'ev M., Mironova L., Balakhonov S. [MALDI-TOF mass-spectrometric analysis for identification of plague agent, cholera and tularemia agents]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2015; 33(2):3–8. DOI: 10.3103/S0891416815020020.
2. Meshcheryakova I.S., Dobrovol'sky A.A., Demidova T.N., Kormilitsyna M.I., Mikhailova T.V. [Transmissible epidemic outbreak of tularemia in 2013 in Khanty-Mansiysk]. *Epidemiol. Vaksino prof.* 2014; 5(78):14–20.
3. Pavlovich N.V., Mishan'kin B.N. [Transparent nutrient medium for *Francisella tularensis* cultivation]. *Antibiotiki i Med. Biotehnol.* 1987; 32(2):133–7.
4. Pavlovich N.V., Mishan'kin B.N., Shimanyuk N.Ya., Ryzhkova V.V., Danilevskaya G.I., Mikhalevich R.V. [Characteristics of biological properties of acapsular *Francisella tularensis* variants]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1993; 3:21–30.
5. Pavlovich N.V., Tynyanova V.I. [Possible mechanisms of toxic lipopolysaccharides potential realization of pathogenic bacteria]. *Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol.* 2005; 2:9–12.
6. Chambers M.C., Maclean B., Burke R., Amodei D., Ruderman D.L., Neumann S., Gatto L., Fischer B., Pratt B., Egerton J., Hoff K., Kessner D., Tasman N., Shulman N., Frewen B., Baker T.A., Brusniak M.Y., Paulse C., Creasy D., Flashner L., Kani K., Moulding C., Seymour S.L., Nuwaysir L.M., Lefebvre B., Kuhlmann F., Roark J., Rainer P., Detlev S., Hemenway T., Huhmer A., Langridge J., Connolly B., Chadick T., Holly K., Eckels J., Deutsch E.W., Moritz R.L., Katz J.E., Agus D.B., MacCoss M., Tabb D.L., Mallick P. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat. Biotechnol.* 2012; 30:918–20. DOI: 10.1038/nbt.2377.
7. Drevinek M., Dresler J., Klimentova J., Pisa L., Hubalek M. Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria *Lett. Appl. Microbiol.* 2012; 55(1):40–4. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2012.03255.x.
8. Jiang J.J., Parker C.E., Fuller J.R., Kawula T.H., Borchers C.H. An Immunoaffinity tandem mass spectrometry (iMALDI) assay for detection of *Francisella tularensis*. *Anal. Clin. Acta.* 2007; 605(1):70–9.
9. Karatuna O., Çelebi B., Can S., Akyar I., Kiliç S. The use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in the identification of *Francisella tularensis*. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* 2016; 16(2):132–8. DOI: org/10.17305/bjbm.2016.894.
10. Lai X.H., Zhao L.F., Chen X.M., Ren Y. Rapid identification and characterization of *Francisella* by molecular biology and other techniques. *Open Microbiol. J.* 2016; 10(suppl. 1):64–77. DOI: 10.2174/1874285801610010064.
11. López-Fernández H., Santos H.M., Capelo J.L., Fdez-Riverola F., Glez-Peña D., Reboiro-Jato M. Mass-Up: an all-in-one open software application for MALDI-TOF mass spectrometry knowledge discovery. *BMC Bioinformatics.* 2015; 16:318. DOI: org/10.1186/s12859-015-0752-4.
12. McLendon M.K., Apicella M.A., Allen L.-A.H. *Francisella tularensis* taxonomy, genetics and immunopathogenesis of potential agent of biowarfare. *Annu. Rev. Microbiol.* 2006; 60:167–185. DOI: 10.1146/annurev.micro.60.080805.142126.
13. Twine S., Vinogradov E., Lindgren H., Sjostedt A., Conlan J. Roles for wbtC, wbtI, and kdtA genes in lipopolysaccharide biosynthesis, protein glycosylation, virulence, and immunogenicity in *Francisella tularensis* strain SCHU S4. *Pathogens.* 2012; 1:12–29. DOI: 10.3390/pathogens1010012.

Authors:

Tsimbalistova M.V., Pavlovich N.V., Aronova N.V., Chaika I.A., Chaika S.O., Vodop'yanov A.S. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.

Об авторах:

Цимбалистова М.В., Павлович Н.В., Аронова Н.В., Чайка И.А., Чайка С.О., Водопьянов А.С. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.

Поступила 20.04.17.

С.В.Балахонов¹, М.Б.Шаракшанов¹, Е.А.Вершинин¹, И.М.Махинова², Н.Г.Ревенская², А.Б.Мошкин²,
С.А.Косилко¹, Б.Бямбажав³, Ц.Ганхуяг³, Л.Эрдэнэчимэг⁴, Ц.Ууганбаяр⁴, Ч.Эрдэнэчимэг⁴,
Н.Цогбадрах³, Д.Цэрэнноров³, Д.Гандболд³

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКОГО ОБСЛЕДОВАНИЯ МОНГОЛЬСКОЙ ЧАСТИ ЗАБАЙКАЛЬСКОГО СТЕПНОГО ПРИРОДНОГО ОЧАГА ЧУМЫ В 2017 г.

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Иркутск; ²ФКУЗ «Читинская противочумная станция», Чита, Российская Федерация; ³Национальный центр по изучению зоонозных инфекций, Уланбаатор, Монголия; ⁴Центр по изучению зоонозных инфекций Хэнтийского аймака, Чингис хот, Монголия

Цель работы – получение данных о состоянии Северокеруленского очага чумы Монголии, примыкающего с юга к Забайкальскому степному очагу. Проведено рекогносцировочное обследование по чуме на территории аймака Дорнод силами совместной российско-монгольской группы специалистов. Материал исследовали по расширенной схеме с применением бактериологического, биологического, серологического и молекулярно-генетического методов. Отрицательные результаты исследований на чуму позволяют констатировать отсутствие рисков развития здесь интенсивных и экстенсивных эпизоотий и завоза возбудителя на российскую территорию. Необходимо продолжить обследование на территории аймака Хэнтий, где отмечено наличие активных очагов чумы.

Ключевые слова: Забайкальский степной природный очаг чумы, эпизоотологическое обследование, лабораторное исследование полевого материала, Дорнод аймак, Монголия.

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

S.V.Balakhonov¹, M.B.Sharakshanov¹, E.A.Vershinin¹, I.M.Makhinova², N.G.Revenskaya², A.B.Moshkin²,
S.A.Kosilko¹, B.Byambazhav³, Ts.Gankhuyag³, L.Erdenechimeg⁴, Ts.Uuganbayar⁴, Ch.Erdenechimeg⁴,
N.Tsogbadrakh³, D.Tserennorov³, D.Gandbold³

Results of Epizootiological Survey of the Mongolian Part of Trans-Baikal Steppe Natural Plague Focus in 2017

¹Irkutsk Research Anti-Plague Institute, Irkutsk, Russian Federation; ²Chita Plague Control Station, Chita, Russian Federation;
³National Center on Studies of Zoonotic Infections, Ulanbaator, Mongolia; ⁴Center on Studies of Zoonotic Infections of Khentii
Aimak, Chingis Khot, Mongolia

Objective of the study is to obtain the data on the state of Severokerulensky plague focus in Mongolia, adjacent to the Trans-Baikal steppe focus in the south. A reconnaissance investigation on plague in the territory of Dornod aimak was carried out by efforts of the joint Russian-Mongolian group of specialists. Material samples were tested under extended scheme using bacteriological, biological, serological, and molecular-genetic methods. Negative test results on plague allow for reporting the absence of risks of intensive and extensive epizooty development and agent importation into the territory of Russia. Though it is necessary to continue the survey in the territory of Khentii aimak, where the presence of active plague foci is registered.

Key words: Trans-Baikal steppe natural plague focus, epizootic survey, laboratory investigation of the field material, Dornod aimak, Mongolia.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

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

Citation: Balakhonov S.V., Sharakshanov M.B., Vershinin E.A., Makhinova I.M., Revenskaya N.G., Moshkin A.B., Kosilko S.A., Byambazhav B., Gankhuyag Ts., Erdenechimeg L., Uuganbayar Ts., Erdenechimeg Ch., Tsogbadrakh N., Tserennorov D., Gandbold D. Results of Epizootiological Survey of the Mongolian Part of Trans-Baikal Steppe Natural Plague Focus in 2017. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2017; 4:97–98. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-97-98

Северо-восточная часть Центрально-Азиатской зоны природной очаговости чумы представлена на территории России и Монголии Забайкальским степным и Тамсаг-Булагским (Северокеруленским) природными очагами. Очаги не имеют между собой естественных границ, располагаются в идентичных ландшафтно-географических условиях, имеют однородный состав животного мира и разделяются только пограничной линией.

Рекогносцировочное эпизоотологическое обследо-

дование монгольской части трансграничного Забайкальского природного очага чумы проводилось с 1 по 16 августа 2017 г. В ходе обследования установлено, что вдоль границы аймака Дорнод (Монголия) с Забайкальским краем (Российская Федерация) численность носителей возбудителя чумы находится на среднем и низком уровнях. При этом наиболее значимый в эпидемиологическом отношении монгольский сурок (тарбаган) представлен лишь единичными экземплярами. Массового размножения мелких млеко-

питающих не зарегистрировано. Отмечается неравномерное распределение обитаемых нор суслика даурского и полевки Брандта, а также малочисленность и разобщенность резерватов пищухи даурской.

Исследование полевого материала на наличие возбудителя *Y. pestis* проводилось серологическим, молекулярно-генетическим (ПЦР), бактериологическим и биологическим методами. Всего исследовано 117 суспензий эктопаразитов 14 видов, в том числе две нимфы иксодовых клещей, 43 пробы от мелких млекопитающих трех видов, 43 погадки хищных птиц и костный мозг павшего верблюда, итого 204 пробы.

В ходе исследования полевого материала в 16 пробах выявлено превышение сигнала флуоресценции над пороговыми значениями. Детекция специфической ДНК *Y. pestis* проводилась по «конечной точке» с использованием тест-системы «Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК возбудителя чумы (*Yersinia pestis*). *Yersinia pestis* pla *Yersinia pestis* caf» производства ООО «ДНК-Технология» – по стандартному протоколу для детектора флуоресцентного «ДЖИН» (формат FLASH) (ООО «ДНК-Технология»). При обнаружении положительных находок ДНК чумного микроба в образцах проводилось их дополнительное исследование с помощью тест-системы «Набор реагентов «Амплисенси *Yersinia pestis*-FL» (ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб») по адаптированной программе амплификации для четырехканального ДНК-амплификатора «Терцик» (ООО «ДНК-Технология»). В связи с тем, что полученные по двум тест-системам пороговые значения «геноположительных образцов» не превышали показатели положительных контролей, результаты исследований интерпретировались как предварительные и подлежали дальнейшему более углубленному изучению на базе стационарных лабораторий Национального центра по изучению зоонозных инфекций Министерства здравоохранения Монголии.

Для подтверждения полученных результатов полевой материал был исследован группой монгольских и российских специалистов по расширенной схеме, включавшей, помимо применения серологического и молекулярно-генетического методов, бактериологический и биологический.

При серологическом исследовании материала с использованием диагностических препаратов производства РГКП «Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций им. М.Айкимбаева» КГСЭН МЗ РК (РТНГА, РНГА, РНАт и РНАГ) и тест-системы иммуноферментной для выявления антител к чумному микробу (ИФА-АТ-Ф1 *Yersinia pestis*) производства ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» положительных результатов не зарегистрировано.

Для окончательного подтверждения или опровержения результатов полевых ПЦР исследований использовались «Тест-система для выявления ДНК *Yersinia pestis* методом полимеразной цепной реак-

ции (ГенПест)» и «Набор реагентов для выявления ДНК *Yersinia pestis* методом полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (Ген *Yersinia pestis* индикация – РГФ)» (ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»). Результаты дополнительных молекулярно-генетических исследований свидетельствуют об отсутствии в пробах специфических участков ДНК *Yersinia pestis*. Выявлено превышение сигнала флуоресценции в 16 пробах, полученных при использовании тест-систем «Комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК возбудителя чумы (*Yersinia pestis*). *Yersinia pestis* pla *Yersinia pestis* caf» и «Набор реагентов «Амплисенси *Yersinia pestis*-FL» в совокупности с низкими пороговыми значениями трактовались нами как детекция неспецифических продуктов реакции.

Результаты совместного международного рекогносцировочного эпизоотологического обследования монгольской части Забайкальского степного природного очага чумы свидетельствуют о том, что в случае обострения эпизоотической ситуации по чуме в Восточной Монголии, развитие эпизоотий разлитого типа на данной территории в настоящее время маловероятно, при этом не исключаются потенциальные риски возникновения локальных проявлений инфекции. В связи с этим риск завоза возбудителя чумы с обследованной территории Монголии на прилегающие приграничные участки Российской Федерации в данный момент находится на низком уровне. Однако наличие активных природных очагов чумы на территории соседнего аймака Хэнтий требует продолжения обследовательских работ для определения степени их активности и возможности обострения эпидемиолого-эпизоотологической ситуации по чуме.

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

Authors:

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

Makhinova I.M., Revenskaya N.G., Moshkin A.B. Chita Plague Control Station. 1, Biologicheskaya St., Chita, 672041, Russian Federation. E-mail: pchs.chita@mail.ru.

Byambazhav B., Gankhuyag Ts., Tsogbadrakh N., Tserennorov D., Gandbold D. National Center on Studies of Zoonotic Infections. Ulanbaator, Mongolia.

Erdenechimeg L., Uuganbayar Ts., Erdenechimeg Ch. Center on Studies of Zoonotic Infections of Khentii Aymak. Chingis Khot, Mongolia.

Об авторах:

Балахонov С.В., Шарахшонов М.Б., Вершинин Е.А., Косилко С.А. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Триллсера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Махинова И.М., Ревенская Н.Г., Мошкин А.Б. Читинская противочумная станция. Российская Федерация, Чита, 672041, ул. Биологическая, 1. E-mail: pchs.chita@mail.ru.

Бямбажав Б., Ганхуяг Ц., Цогбадрах Н., Цэрэнноров Д., Гандболд Д. Национальный центр по изучению зоонозных инфекций. Монголия, Уланбаатор.

Эрдэнэчимэг Л., Ууганбаяр Ц., Эрдэнэчимэг Ч. Центр по изучению зоонозных инфекций Хэнтийского аймака. Чингис хот, Монголия.

Поступила 17.11.17.

Д.А.Левченко, В.Д.Кругликов, И.В.Архангельская, М.И.Ежова, Э.А.Москвитина, С.В.Титова

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ МОНИТОРИНГА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА АДМИНИСТРАТИВНЫХ ТЕРРИТОРИЯХ РОССИИ С ПОМОЩЬЮ ГИС «ХОЛЕРА 1989–2014»*ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация*

Цель настоящей работы заключалась в сравнительном анализе результатов мониторинговых исследований штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных на территориях федеральных округов, входящих в них субъектов и из конкретных водных объектов в период 2006–2016 гг. На основе методологии с использованием популяционной геоинформационной системы «Холера 1989–2014» проведено сравнительное изучение динамики выделения и биологических свойств 586 штаммов холерных вибрионов O1, O139 и Р-вариантов, изолированных из водных объектов окружающей среды на административных территориях России. В результате установлено, что штаммы *Vibrio cholerae* различных серогрупп обнаруживались на территории всех федеральных округов, но не всех субъектов, входящих в них. Показано, что за изучаемый период наибольшее количество изолированных штаммов было зарегистрировано в Южном федеральном округе. Подавляющее количество штаммов холерных вибрионов, выделенных в стране, являлись нетоксигенными. Отмечено, что на фоне эпидблагополучия продолжалось обнаружение единичных эпидзначимых штаммов (Ростовская область). Штаммы ctxA⁺tcpA⁺ обнаруживались в Южном, Дальневосточном и Северо-Западном федеральных округах. Установлено, что до 2013 г. в пяти субъектах штаммы холерных вибрионов O1 и O139 в водных объектах не обнаруживались. Нетоксигенные штаммы холерных вибрионов O1 Эль Тор серовара Огава преобладали на территориях Южного и Уральского, а серовара Инаба – на территории остальных федеральных округов. Наиболее часто выделялись нетоксигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 с фаготипом 15, а изоляты с фаготипами 4, 5, 10, 14 и 17 встречались только на территории Южного федерального округа. Полученные данные обозначили подход, способствующий комплексной оценке эпидситуации по холере на территории России, и подчеркнули перспективы применения ГИС для повышения эффективности мониторинга холерных вибрионов в водных объектах окружающей среды.

Ключевые слова: геоинформационная система, федеральные округа России и их субъекты, объекты окружающей среды, холерные вибрионы, фено- и генотип.

Корреспондирующий автор: Левченко Дарья Александровна, e-mail: levchenko_da@antiplague.ru.

D.A.Levchenko, V.D.Kruglikov, I.V.Arkhangel'skaya, M.I.Ezhova, E.A.Moskvitina, S.V.Titova

Analysis of the Results of Cholera Vibrios Monitoring in Environmental Objects in the Administrative Territories of the Russian Federation Using GIS "CHOLERA 1989–2014"*Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation*

Objective of the work was to compare the results of monitoring of *Vibrio cholerae* strains isolated in the territories of federal districts, their constituent entities and from certain water bodies between 2006–2016. Based on the methodology, using updated geo-information system "Cholera 1989–2014", a comparative study of the dynamics of isolation and biological properties of 586 *Vibrio cholerae* O1, O139 strains and R-variants, collected from the surface water bodies in the administrative territories of Russia, was carried out. Eventually it is established that *Vibrio cholerae* strains of various serogroups are found in the territory of all federal districts, but not in all the entities included in them. It is shown that the greatest number of isolated strains was registered in the Southern Federal District. The overwhelming number of *Vibrio cholerae* strains, isolated in the country, were non-toxicogenic. It was noted that against the background of epidemiological welfare, the detection of single epidemiologically significant strains continued (Rostov Region). ctxA⁺tcpA⁺ strains were found in the Southern, Far Eastern and North-Western Federal Districts. It is established that until 2013 in five constituent entities strains of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in water bodies were not detected. Non-toxicogenic strains of *Vibrio cholerae* O1 El Tor Ogawa serovar prevailed in the territories of the Southern and Ural, and Inaba serovar – in the remaining Federal Districts. The most frequently isolated were non-toxicogenic *Vibrio cholerae* O1 strains with phagotype 15, while isolates with phagotypes 4, 5, 10, 14 and 17 were traced only in the Southern Federal District. The data obtained formed the basis of the approach that contributes to a comprehensive assessment of the epidemiological situation on cholera in the territory of Russia and highlighted the prospects for using GIS to improve the effectiveness of cholera vibrio monitoring in surface water bodies.

Key words: geo-information system, Federal Districts of Russia and their constituent entities, environmental objects, *Vibrio cholerae*, pheno- and genotypes.

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

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Corresponding author: Dar'ya A. Levchenko, e-mail: levchenko_da@antiplague.ru.

Citation: Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaya I.V., Ezhova M.I., Moskvitina E.A., Titova S.V. Analysis of the Results of Cholera Vibrios Monitoring in Environmental Objects in the Administrative Territories of the Russian Federation Using GIS "CHOLERA 1989–2014". *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 4:99–102. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-99-102

С позиции многофакторной оценки эпидемиологической ситуации по холере в нашей стране представляется целесообразным проведение выборочного анализа комплексных результатов мониторинга холерных вибрионов в объектах окружающей среды (ООС) на основе административного деления территории Российской Федерации (РФ), в частности, за последнее десятилетие.

Цель настоящей работы заключалась в сравнительном анализе результатов мониторинговых исследований по параметрам, характеризующим количество и биологические свойства штаммов *Vibrio cholerae* различных серогрупп и токсигенности, выделенных на территориях федеральных округов (ФО), входящих в них субъектов и из конкретных водных объектов в период 2006–2016 гг.

В работе использовано 586 штаммов холерных вибрионов с различной фенотипической и генетической характеристикой, идентифицированных в референс-центре по мониторингу холеры на территории Российской Федерации. Выборку штаммов по заданным параметрам осуществляли с помощью авторской пополняемой геоинформационной системы (ГИС) «Холера 1989–2014» [1, 2]. В ГИС вошли данные по ретроспективному анализу динамики выделения, характеристике фено- и генотипических свойств ранее изолированных штаммов, а также по количественной динамике обнаружения и результатам идентификации вновь выделенных штаммов на разных административных территориях нашей страны в 2015 и 2016 гг. [3].

При проведении анализа результатов мониторинга холерных вибрионов в ООС на территории России, в первую очередь, нами установлено, что из 586 штаммов *V. cholerae*, выделенных из ООС за изучаемый период, наибольшее их количество (398) обнаружено на территории Южного федерального округа (ЮФО). Обобщение данных по анализу динамики выделения *V. cholerae* на территории ЮФО по субъектам и конкретным ООС показало, что с 2006 по 2016 год изолировано наибольшее количество на территории шести субъектов: Республик Калмыкия и Крым, Краснодарского края, Астраханской, Волгоградской и Ростовской областей. В Республике Калмыкия нетоксигенные штаммы холерных вибрионов O1 Эль Тор и Р-вариант выделены из девяти ООС. Наибольшее количество культур *V. cholerae* O1 El Tor выделено из пр. Заячий (79 штаммов). Кроме того, среди изолированных нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 Эль Тор обнаружены 18 штаммов с генетической характеристикой *ctx-tcpA*⁺. Краснодарский край условно занимал второе место по количеству выделенных из ООС нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 Эль Тор. Так, наряду с выделением трех штаммов *V. cholerae* O1 Ogawa из р. Агура в 2007 г. и по одному штамму *V. cholerae* O1 Inaba из р. Мацеста в 2007 г. и из Азовского моря в 2013 г., стоит отметить, что в 2015 г. в референс-центре идентифицировано 98 нетоксигенных штам-

мов *V. cholerae* O1 El Tor Inaba одного клона, изолированных из р. Агура в течение трех месяцев, что связано с созданием на то время благоприятных условий для роста и размножения этих микроорганизмов. В 2016 г. на данной территории штаммов *V. cholerae* O1 El Tor не выделено [3]. Ростовская область (РО) за исследуемый период занимала третье место по количеству выделенных штаммов холерных вибрионов O1 из ООС из рек Дон и Темерник. Только на территории данного субъекта на фоне эпидемического благополучия регистрировалось обнаружение токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor Inaba (по одному в 2011 г. – Азовское море, Таганрогский залив пляж «Солнечный» и в 2014 г. – р. Темерник соответственно). А также были установлены случаи выделения штаммов холерных вибрионов O1 Эль Тор с генетической характеристикой *ctxA-tcpA*⁺ (семь). На территории Республики Крым из ООС выделено четыре нетоксигенных штамма, из которых три – *V. cholerae* O1 El Tor Inaba (р. Салгир, 2014 г.) и один – *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa (р. Водопадная, 2016 г.). На территории Астраханской области изолировано пять нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 Inaba Эль Тор (три – из р. Волга и два – из р. Енотаевка, 2012 г.). В Волгоградской области – три нетоксигенных штамма *V. cholerae* O1 Inaba El Tor (два – из р. Сухона и одна – из р. Човка, 2010 г.).

На территории ДФО установлено выделение 48 нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 Эль Тор из открытых водоемов трех субъектов РФ: Республика Саха (Якутия), Приморский и Хабаровский края. Территория Приморского края занимала четвертое место по количественному обнаружению штаммов холерных вибрионов O1 и Р-вариант в ООС (40 штаммов). Из ООС Хабаровского края изолировано шесть нетоксигенных штаммов холерных вибрионов: два штамма *V. cholerae* Р-вариант из р. Амур – 2006 г., один штамм *V. cholerae* O1 El Tor Inaba из р. Черная – 2006 г., два штамма *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa (*ctxA-tcpA*⁺) из р. Черная – 2013 г. и один штамм с такой же характеристикой изолирован из стоков – 2016 г. На территории Республики Саха за исследуемый период только в 2009 г. выделено по одному штамму холерных вибрионов O1 Эль Тор Огава из двух озер (Сергилях и Хатынг-Юрях).

На территории Сибирского федерального округа (СФО), по данным ГИС, за исследуемый период выделено 65 нетоксигенных штаммов холерных вибрионов Эль Тор из ООС в шести субъектах, входящих в состав данного округа: Республики Бурятия, Алтайский, Забайкальский края, Иркутская, Кемеровская, Новосибирская области. В Иркутской области изолировано 24 нетоксигенных штаммов холерных вибрионов с различной фенотипической характеристикой, а именно: 17 штаммов *V. cholerae* O1 Inaba El Tor обнаружено в следующих ООС: р. Ангара (пять штаммов в 2011 г. и один – в 2015 г.), р. Ушаковка (один – в 2009 г.), р. Сарафановка (че-

тыре – в 2010 г., два – в 2013 г.), р. Иркут (один – в 2010 г.), р. Белая (один – в 2011 г.), а также озеро у храма Михаила Архангела (два – в 2010 г.). Одна культура *V. cholerae* O1 Ogawa El Tor была изолирована из р. Ангара в 2009 г. Нетоксигенные штаммы холерных вибрионов O139 и Р-варианта выделены из р. Ангара в 2006 г. (пять и один соответственно). В Новосибирской области в 2006 г. из р. Обь было выделено по одному штамму *V. cholerae* O1 Ogawa El Tor и Р-вариант. На территории Забайкальского края из открытых водоемов изолирован 33 нетоксигенных штамма холерных вибрионов. Культуры холерных вибрионов O1 Инаба Эль Тор изолированы из следующих ООС: р. Борзянка (один – в 2008 г.), р. Ингода (по одному – 2008 и 2015 гг.), р. Борзя (десять – в 2016 г., по два – в 2010 и 2015 гг., по одному – в 2009, 2011, 2012 гг. соответственно), р. Читинка (три – в 2015 г., один – в 2016 г.), оз. Кенон (два – в 2013 г. и по одному штамму в 2014 и 2015 гг.), оз. Харанор (один – в 2012 г.). А также установлено выделение штаммов *V. cholerae* O1 Ogawa El Tor из рек Читинка (два – в 2009 г.) и Борзя (по одному в 2012 и 2013 гг. соответственно). На территории Алтайского края из ООС изолировано по одному штамму *V. cholerae* O1 El Tor Inaba из р. Обь в 2009 г. и *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa из р. Барнаулка в 2011 г. В Кемеровской области в 2011 г. выделено два штамма холерных вибрионов O1 Инаба Эль Тор из рек Бачат и Малый Бачат. Что касается Республики Бурятия, то за изучаемый период из р. Селенга выделено два нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor Inaba в 2013 г. *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa в 2016 г.

На территории Приволжского федерального округа (ПФО) изолировано 14 штаммов нетоксигенных холерных вибрионов на двух административных территориях (Республика Татарстан и Кировская область). Из ООС Кировской области выделено девять нетоксигенных штаммов холерных вибрионов из р. Вятка: четыре штамма холерных вибрионов O1 Эль Тор Инаба в 2002 г. и пять – в 2007 г. На территории Республики Татарстан изолировано пять нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 Инаба Эль Тор из следующих водоемов рек: Меша (три штамма – в 2011 г.), Волга (один – в 2012 г.), Ик (один – в 2016 г.).

В Центральном федеральном округе (ЦФО) в разные годы выделен 21 штамм холерного вибриона на территории трех субъектов: Воронежская, Липецкая, Московская области. Наибольшее количество штаммов *V. cholerae* (12) изолировано в Московской области. Установлено выделение культур холерных вибрионов O139 серогруппы из р. Москва в 2006 и 2008 гг. (по одному штамму соответственно). В 2011 г. отмечено выделение штаммов *V. cholerae* O1 Inaba El Tor (один штамм) и *V. cholerae* O1 Ogawa El Tor (шесть штаммов). В 2012 г. выделен один штамм холерного вибриона O1 Огава Эль Тор из р. Москва. Обнаружены единичные случаи выделения нетоксигенных культур холерных вибрионов

O1 Инаба Эль Тор в 2014 г. из Курьяновской станции аэрации и в г. Рыбное. На территории Воронежской области из ООС в 2007 г. изолировано восемь нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 Эль Тор Инаба из р. Битюг. Из водоемов Липецкой области в 2011 г. изолирована одна нетоксигенная культура *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa.

На территории Уральского федерального округа (УФО) выделено 26 нетоксигенных штаммов холерных вибрионов на территории трех субъектов (Свердловская, Тюменская и Челябинская области). Из водоемов Свердловской области изолировано девять штаммов со следующими фенотипическими характеристиками: пять культур холерных вибрионов O1 Эль Тор Огава (оз. Червяное, 2008 г.), четыре штамма *V. cholerae* O1 El Tor Inaba (Калиновские разрезы – 2016 г.). На территории Тюменской области выделено 14 штаммов, из которых 13 относились к *V. cholerae* O1 Ogawa El Tor (оз. Верхнее Кривое, 2012 г.), а одна культура холерного вибриона O1 Эль Тор Инаба, которая была выделена из стоков в 2008 г. Из ООС Челябинской области изолировано три штамма *V. cholerae* O1 Inaba El Tor, из пруда пос. Кирзавод (один – в 2012 г.), оз. Курочкино (один – в 2015 г.) и Мостки (один – в 2016 г.).

На территории Северо-Кавказского федерального округа (С-КФО) в 2006 г. в водоемах Ставропольского края обнаружено четыре нетоксигенных штамма холерных вибрионов O1 Эль Тор Инаба: из рек Подкумок (три) и Кума (один).

На территории Северо-Западного федерального округа (С-ЗФО) изолировано десять штаммов холерных вибрионов, выделенных на территориях пяти субъектов (Республика Коми, Архангельская, Калининградская, Ленинградская, Псковская области). В ООС Ленинградской, Псковской и Архангельской областей выделено по одному штамму холерных вибрионов O1 Эль Тор Инаба из рек Нева (2009 г.), Великая (2014 г.) и Северная Двина (2009 г.). На территории Калининградской области изолировано два штамма *V. cholerae* O1 Inaba El Tor из р. Неман (2014 г.). В Республике Коми в 2013 г. обнаружены четыре штамма холерных вибрионов O1 Эль Тор Инаба (три – из р. Вычегда и один – из р. Сысола). В 2016 г. из р. Вычегда выделен штамм *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa (ctxA⁺tcpA⁺).

Таким образом, в результате проведенного анализа результатов мониторинга холерных вибрионов из ООС на основе административного деления территории России установлено, что штаммы *V. cholerae* различных серогрупп обнаруживались на территории всех ФО РФ, но не всех субъектов, входящих в них. Показано, что за период 2006–2016 гг. наибольшее количество изолированных штаммов зарегистрировано в ЮФО. Подавляющее количество штаммов холерных вибрионов O1, O139 и Р-варианта являлись нетоксигенными (584 из 586). Среди них встречались штаммы холерных вибрионов с генетической характеристикой ctxA⁺tcpA⁺ только в ЮФО,

ДФО и СЗФО. Холерные вибрионы O139 серогруппы с 2013 по 2016 год из ООС на всех административных территориях РФ не выделены. Полученные данные, определившие новизну исследования, обозначили подход, способствующий комплексному и конкретному отражению эпидситуации по холере на территории России, и подчеркнули перспективы применения ГИС для повышения эффективности мониторинга ООС на *V. cholerae*.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зубкова Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б., Водопьянов С.О. Генетические особенности штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы *ctxA*⁺*tcpA*⁺, выделенных из водных объектов РФ, охарактеризованные с помощью новой геоинформационной системы. *Здоровье населения и среда обитания*. 2014; 9:32–5.
2. Зубкова Д.А., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б., Шестиалтынова И.С., Архангельская И.В., Ежова М.И., Ускова Н.Н. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2014621055. Геоинформационная система «Холера 1989–2014».
3. Титова С.В., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Самородова А.В., Тюленева Е.Г., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Архангельская И.В., Иванова С.М., Ковалева Т.В., Водопьянов С.О. Холера: оценка эпидемиологической об-

становки в мире и России в 2006–2015 гг. Прогноз на 2016 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2016; 1:20–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-20-27.

References

1. Zubkova D.A., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaya I.V., Vodop'yanov A.S., Nepomnyashchaya N.B., Vodop'yanov S.O. [Genetic peculiarities of cholera vibrio O1 strains *ctxA*⁺*tcpA*⁺, isolated from surface water bodies of the Russian Federation, characterized using new geo-information system]. *Zdor. Naselen. Sreda Obit.* 2014; 9:32–5.
2. Zubkova D.A., Kruglikov V.D., Vodop'yanov A.S., Nepomnyashchaya N.B., Shestialtyanova I.S., Arkhangel'skaya I.V., Ezhova M.I., Uskova N.N. [Certificate of the State Registration of a database No 2014621055. Geo-information system "Cholera 1989–2014"].
3. Titova S.V., Moskvitina E.A., Kruglikov V.D., Samorodova A.V., Tyuleneva E.G., Monakhova E.V., Pisanov R.V., Vodop'yanov A.S., Arkhangel'skaya I.V., Ivanova S.M., Kovaleva T.V., Vodop'yanov S.O. [Cholera: Analysis of Epidemiological Situation across the World and in Russia within a Period of 2006–2015]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2016; 1: 20–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-20-27.

Authors:

Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaya I.V., Ezhova M.I., Moskvitina E.A., 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:

Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Ежова М.И., Москвитина Э.А., 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 07.03.17.