

# 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  
Журнал индексируется в Scopus*

**Выпуск 3**

**2019**

**САРАТОВ**

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 № ФС77-74153  
от 29 октября 2018 г.

Журнал «Проблемы особо опасных  
инфекций» является рецензируемым  
изданием

Все рукописи проходят проверку  
системой «Антиплагиат»

Журнал «Проблемы особо опасных  
инфекций» индексируется в РИНЦ  
и Scopus

Ответственность за достоверность  
информации, содержащейся  
в рекламных материалах,  
несут рекламодатели

**Адрес редакции:**  
410005, Саратов,  
ул. Университетская, д. 46  
E-mail: jour@microbe.ru  
Сайт: <http://journal.microbe.ru>

Начальник редакционно-  
издательского отдела *Е.С. Герасимова*  
Тел. (845-2) 51-82-22  
Факс (845-2) 51-52-12

Редакторы  
*А.А. Ковалева, В.В. Россошанская*  
Технический редактор *Т.К. Меркулова*  
Перевод на английский  
*А.П. Ножкиной, Т.Б. Караваевой*

Проблемы особо опасных инфекций  
2019. Вып. 3. 126 с.

Подписано в печать 27.09.19  
Формат 60×88 1/8  
Бумага мелованная  
Печать офсетная  
Усл. печ. л. 15,435  
Гарнитура Таймс. Заказ 3105-19/04109

Журнал отпечатан в типографии  
ООО «Амирит». 410004, Саратов,  
ул. Чернышевского, д. 88, литер У

© Федеральное казенное учреждение  
здравоохранения «Российский научно-  
исследовательский противочумный  
институт «Микроб», 2019

## ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР

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

## РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

*Акимкин В.Г.*, докт. мед. наук, академик РАН (Москва, Россия)  
*Балахонов С.В.*, докт. мед. наук, профессор (Иркутск, Россия)  
*Бондарев В.П.*, докт. мед. наук, профессор (Москва, Россия)  
*Борисевич С.В.*, докт. биол. наук, профессор, член-корр. РАН (Сергиев  
Посад, Россия)  
*Гинцбург А.Л.*, докт. мед. наук, академик РАН (Москва, Россия)  
*Дятлов И.А.*, докт. мед. наук, академик РАН (Оболенск, Россия)  
*Куличенко А.Н.*, докт. мед. наук, член-корр. РАН (Ставрополь, Россия)  
*Львов Д.К.*, докт. мед. наук, академик РАН (Москва, Россия)  
*Малеев В.В.*, докт. мед. наук, академик РАН (Москва, Россия)  
*Онищенко Г.Г.*, докт. мед. наук, академик РАН (Москва, Россия)  
*Рудаков Н.В.*, докт. мед. наук, профессор (Омск, Россия)  
*Сергиев В.П.*, докт. мед. наук, академик РАН (Москва, Россия)  
*Топорков А.В.*, докт. мед. наук (Волгоград, Россия)

## ИНОСТРАННЫЕ ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА:

*Абдикаримов С.Т.*, докт. мед. наук, доцент (Бишкек, Кыргызстан)  
*Кейта С.*, канд. мед. наук (Конакри, Гвинейская Республика)  
*Мотин В.Л.*, профессор (Галвестон, США)  
*Скурник М.*, профессор (Хельсинки, Финляндия)  
*Титов Л.П.*, докт. мед. наук, профессор, член-корр. НАН Беларуси,  
иностраннный член РАН (Минск, Беларусь)  
*Цогбадрах Нямдорж*, канд. мед. наук (Улаанбаатар, Монголия)

## РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

*Альховский С.В.*, докт. биол. наук (Москва, Россия)  
*Андаев Е.И.*, докт. мед. наук (Иркутск, Россия)  
*Бугоркова С.А.*, докт. мед. наук (Саратов, Россия)  
*Викторов Д.В.*, докт. биол. наук (Волгоград, Россия)  
*Гулий О.И.*, докт. биол. наук (Саратов, Россия)  
*Ерошенко Г.А.*, докт. биол. наук (Саратов, Россия)  
*Жарникова И.В.*, докт. биол. наук (Ставрополь, Россия)  
*Карпунина Л.В.*, докт. биол. наук, профессор (Саратов, Россия)  
*Кругликов В.Д.*, докт. мед. наук, с. н. с. (Ростов-на-Дону, Россия)  
*Малецкая О.В.*, докт. мед. наук, профессор (Ставрополь, Россия)  
*Микеров А.Н.*, докт. биол. наук (Саратов, Россия)  
*Микишис Н.И.*, докт. мед. наук (Саратов, Россия)  
*Пеньевская Н.А.*, докт. мед. наук, доцент (Омск, Россия)  
*Попов Н.В.*, докт. биол. наук, профессор (Саратов, Россия)  
*Саяпина Л.В.*, докт. мед. наук (Москва, Россия)  
*Смирнова Н.И.*, докт. биол. наук, профессор (Саратов, Россия)  
*Топорков В.П.*, докт. мед. наук, профессор (Саратов, Россия)  
*Шемякин И.Г.*, докт. биол. наук, профессор (Оболенск, Россия)  
*Щербакова С.А.*, докт. биол. наук (Саратов, Россия)

## ИНОСТРАННЫЕ ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОЙ КОЛЛЕГИИ:

*Красько А.Г.*, канд. мед. наук, доцент (Минск, Беларусь)  
*Магассубо Н.*, канд. биол. наук (Гвинейская Республика)  
*Мека-Меченко Т.В.*, докт. мед. наук (Алматы, Казахстан)  
*Усенбаев Н.Т.*, канд. мед. наук (Бишкек, Кыргызстан)  
*Церенноров Дамнидорж*, канд. мед. наук, (Улаанбаатар, Монголия)

## Ответственный секретарь

Т.Б. Караваева  
Тел. (845-2) 51-82-22. Факс (845-2) 51-52-12  
E-mail: jour@microbe.ru

# Problemy Osobo Opasnykh Infektsii

Problems of Particularly Dangerous Infections

2019, Issue 3

Scientific and Practical Peer-Reviewed 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.*, Doctor of Medical Science, Professor, Member of the RAS

## Editorial Council

*Abdikarimov S.T.*, Doctor of Medical Science, Associate Professor (Bishkek, Kyrgyzstan)

*Akimkin V.G.*, Doctor of Medical Science, Professor, Member of the RAS (Moscow, Russia)

*Balakhonov S.V.*, Doctor of Medical Science, Professor (Irkutsk, Russia)

*Bondarev V.P.*, Doctor of Medical Science, Professor (Moscow, Russia)

*Borisevich S.V.*, Doctor of Biological Science, Professor, Corresponding Member of the RAS (Sergiev Possad, Russia)

*Gintsburg A.L.*, Doctor of Medical Science, Professor, Member of the RAS (Moscow, Russia)

*Dyatlov I.A.*, Doctor of Medical Science, Professor, Member of the RAS (Obolensk, Russia)

*Keita S.*, Ph. D., Conakry, Republic of Guinea

*Kulichenko A.N.*, Doctor of Medical Science, Professor, Corresponding Member of the RAS (Stavropol, Russia)

*Lvov D.K.*, Doctor of Medical Science, Professor, Member of the RAS (Moscow, Russia)

*Maleev V.V.*, Doctor of Medical Science, Professor, Member of the RAS (Moscow, Russia)

*Motin V.L.*, Ph. D., Professor (Galveston, USA)

*Onishchenko G.G.*, Doctor of Medical Science, Professor, Member of the RAS (Moscow, Russia)

*Rudakov N.V.*, Doctor of Medical Science, Professor (Omsk, Russia)

*Sergiev V.P.*, Doctor of Medical Science, Professor, Member of the RAS (Moscow, Russia)

*Skurnik M.*, Professor (Helsinki, Finland)

*Titov L.P.*, Doctor of Medical Science, Professor, Corresponding Member of the NAS of Belarus, Foreign Member of the RAS (Minsk, Belarus)

*Toporkov A.V.*, Doctor of Medical Science (Volgograd, Russia)

*Tsogbadrakh Namdorj*, Ph. D. (Ulaanbaatar, Mongolia)

## Editorial Board

*Alkhovsky S.V.*, Doctor of Biological Science (Moscow, Russia)

*Andaev E.I.*, Doctor of Medical Science (Irkutsk, Russia)

*Bugorkova S.A.*, Doctor of Medical Science (Saratov, Russia)

*Victorov D.V.*, Doctor of Biological Science (Volgograd, Russia)

*Guliy O.I.*, Doctor of Biological Science (Saratov, Russia)

*Eroshenko G.A.*, Doctor of Biological Science (Saratov, Russia)

*Zharnikova I.V.*, Doctor of Biological Science (Stavropol, Russia)

*Karpunina L.V.*, Doctor of Biological Science, Professor (Saratov, Russia)

*Kras'ko A.G.*, Ph. D., Associate Professor (Minsk, Belarus)

*Kruglikov V.D.*, Doctor of Medical Science, (Rostov-on-Don, Russia)

*Magassouba N.*, Ph. D., Conakry, Republic of Guinea

*Maletskaya O.V.*, Doctor of Medical Science, Professor (Stavropol, Russia)

*Meka-Mechenko T.V.*, Doctor of Medical Science (Almaty, Kazakhstan)

*Mikero A.N.*, Doctor of Biological Science (Saratov, Russia)

*Mikshis N.I.*, Doctor of Medical Science (Saratov, Russia)

*Pen'evskaya N.A.*, Doctor of Medical Science, Associate Professor (Omsk, Russia)

*Popov N.V.*, Doctor of Biological Science, Professor (Saratov, Russia)

*Sayapina L.V.*, Doctor of Medical Science (Moscow, Russia)

*Smirnova N.I.*, Doctor of Biological Science, Professor (Saratov, Russia)

*Shemyakin I.G.*, Doctor of Biological Science, Professor (Obolensk, Russia)

*Shcherbakova S.A.*, Doctor of Biological Science (Saratov, Russia)

*Toporkov V.P.*, Doctor of Medical Science, Professor (Saratov, Russia)

*Tserennov Damdindorj*, Ph. D., (Ulaanbaatar, Mongolia)

*Usenbaev N.T.*, Ph. D (Bishkek, Kyrgyzstan)

## 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>

Попова А.Ю., Смоленский В.Ю., Демина Ю.В., Малеев В.В., Кутырев В.В., Щербакова С.А., Максютлов Р.А., Пьянков О.В., Keita S., Buaro M.Y., Magassouba N., Ицков Я.Ю., Колмоец Е.В. Вклад Российской Федерации в укрепление эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями на территории Гвинейской Республики..... 6

## Обзоры

Липницкий А.В., Маркин А.М., Суркова Р.С., Викторов Д.В., Топорков А.В. Молекулярная диагностика гистоплазмоза..... 14

Плеханов Н.А., Заднова С.П., Крицкий А.А. Биопленка *Vibrio cholerae*: механизмы, регулирующие образование, и сигналы внешней среды, способствующие ее формированию..... 19

Сизикова Т.Е., Сахаров Р.В., Писцов М.Н., Пашченко Ю.И., Лебедев В.Н., Борисевич С.В. Вирус чикунгунья как возбудитель эмерджентного вирусного заболевания..... 26

## Оригинальные статьи

Балахонov С.В., Ярыгина М.Б., Гладких А.С., Миронова Л.В., Феранчук С.И., Бочалгин Н.О., Рождественский Е.Н., Витязева С.А., Нацагдорж Б., Цэрэнноров Д., Цогбадрах Н., Косилко С.А., Корзун В.М. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Yersinia pestis*, выделенных на монгольской территории трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы..... 34

Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Писаренко С.В., Буравцева Н.П., Печковский Г.А., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Варфоломеева Н.Г., Головинская Т.М., Чмеренко Д.К., Ковалев Д.А., Жиров А.М., Шапаков Н.А., Куличенко А.Н. Новые генетические маркеры для молекулярного типирования штаммов *Bacillus anthracis*..... 43

Ерошенко Г.А., Попов Н.В., Альхова Ж.В., Балыкова А.Н., Куклева Л.М., Червякова Н.С., Майканов Н.С., Сармулдина А.Х., Кутырев В.В. Пространственно-временной анализ циркуляции *Yersinia pestis* в Волго-Уральском песчаном очаге..... 51

Зайцева О.А., Котенев Е.С., Артюшина Ю.С., Кот Л.А., Шапошникова Л.И., Чишениук Т.И., Гнусарева О.А., Куличенко А.Н. Современная эпидемиолого-эпизоотологическая ситуация по иксодовому клещевому боррелиозу на юге европейской части России..... 58

Popova A.Yu., Smolensky V.Yu., Demina Yu.V., Maleev V.V., Kutyrev V.V., Shcherbakova S.A., Maksyutov R.A., Pyankov O.V., Keita S., Buaro M.Y., Magassouba N., Itskov Y.Yu., Kolomoets E.V. Contribution of the Russian Federation to Strengthening of Epidemiological Surveillance Over Dangerous Infectious Diseases in the Republic of Guinea

## Reviews

Lipnitsky A.V., Markin A.M., Surkova R.S., Victorov D.V., Toporkov A.V. Molecular Diagnostics of Histoplasmosis

Plekhanov N.A., Zadnova S.P., Kritsky A.A. *Vibrio cholerae* Biofilm: Mechanisms, Regulating Formation and Signals of External Environment, Factoring Its Production

Sizikova T.E., Sakharov R.V., Pistsov M.N., Pashchenko Yu.I., Lebedev V.N., Borisevich S.V. Chikungunya Virus as the Agent of Emergent Viral Disease

## Original articles

Balakhonov S.V., Yarygina M.B., Gladkikh A.S., Mironova L.V., Feranchuk S.I., Bochalgin N.O., Rozhdestvensky E.N., Vityazeva S.A., Natsagdorzh B., Tserennorov D., Tsogbadrakh N., Kosilko S.A., Korzun V.M. Molecular-Genetic Characteristics of *Yersinia pestis* Strains Isolated in the Mongolian Territory of Transboundary Sailyugem Natural Plague Focus

Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Pisarenko S.V., Buravtseva N.P., Pechkovsky G.A., Aksenova L.Yu., Semenova O.V., Varfolomeeva N.G., Golovinskaya T.M., Chmerenko D.K., Kovalev D.A., Zhirov A.M., Shapakov N.A., Kulichenko A.N. New Genetic Markers for Molecular Typing of *Bacillus anthracis* Strains

Eroshenko G.A., Popov N.V., Alkhova Zh.V., Balykova A.N., Kukleva L.M., Chervyakova N.S., Maykanov N.S., Sarmuldina A.Kh., Kutyrev V.V. Circulation of *Yersinia pestis* in the Volga-Ural Sandy Focus: Spatiotemporal Analysis

Zaitseva O.A., Kotenev E.S., Artyushina Yu.S., Kot L.A., Shaposhnikova L.I., Chishenyuk T.I., Gnusareva O.A., Kulichenko A.N. Modern Epidemiological and Epizootiological Situation on Ixodic Tick-Borne Borreliosis in the South of the European Part of Russia

Львов Д.К., Бурцева Е.И., Мукашева Е.А., Колобухина Л.В., Богданова В.С., Бовин Н.В., Феодоритова Е.Л., Трушаклова С.В., Бреслав Н.В., Кириллов И.М., Меркулова Л.Н., Федякина И.Т., Краснослободцев К.Г., Воронина О.Л., Аксенова Е.И., Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Альховский С.В., Варганян Р.В., Кистенева Л.Б., Росаткевич А.Г., Кружкова И.С., Базарова М.В., Сметанина С.В. Особенности циркуляции и свойств вирусов гриппа в эпидемическом сезоне 2018–2019 гг. в России и странах Северного полушария ..... 66

Монахова Е.В., Архангельская И.В., Титова С.В., Писанов Р.В. MSHA-подобные пили нетоксигенных штаммов холерных вибрионов ..... 75

Полтавченко А.Г., Терновой В.А., Ерш А.В., Филатов П.В., Баяндин Р.Б., Семенцова А.О., Еремеева Л.И., Локтев В.Б., Агафонов А.П. Выявление маркеров лихорадки денге методом ДОТ-иммуноанализа ..... 81

Суханова С.М., Саяпина Л.В., Бердникова З.Е., Тихонова А.С., Климов В.И. Проблемы оценки «стерильности» живых бактериальных вакцин ..... 87

Терентьев А.И., Жуков В.А., Сергеев Ар.А., Пастушенко С.Б., Рогожкина С.В., Борисевич С.В., Максимов В.А., Сергеев Ал.А., Титова К.А., Галахова Д.О. Опыт получения рекомбинантной таблетированной вакцины «Ревакс ВЗТ» ..... 94

Уткин Д.В., Найденова Е.В., Никифоров К.А., Бойко А.В., Агафонов Д.А., Ляпин М.Н., Лопатин А.А., Bangoura I., Camara T.D., Boumbaly S., Boiro M.Y. Изучение иммунной прослойки к возбудителю холеры у лиц, проживающих на территории Гвинейской Республики ..... 100

Фролов Д.М., Сенина Т.В., Замарина Т.В., Храпова Н.П. Использование реакции латекс-агглютинации в ускоренном определении патогенных буркхольдерий ..... 106

Чехвалова Е.В., Манин Е.А., Куличенко А.Н., Оробей В.Г., Швец О.Г. Современная эпизоотолого-эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекциям в городе-курорте Сочи ..... 111

Щемелев А.Н., Останкова Ю.В., Зуева Е.Б., Boumbaly S., Balde T.A.L., Семенов А.В. Характеристика вируса гепатита В и вируса иммунодефицита человека среди пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГВ из Гвинейской Республики ..... 118

#### Юбилеи

К 80-летию со дня рождения Лидии Степановны Прониной ..... 125

К 60-летию со дня рождения Ивана Алексеевича Дятлова ..... 125

#### Памяти коллеги

Памяти Анисимова Павла Ивановича ..... 126

Lvov D.K., Burtseva E.I., Mukasheva E.A., Kolobukhina L.V., Bogdanova V.S., Bovin N.V., Feodoritova E.L., Trushakova S.V., Breslav N.V., Kirillov I.M., Merkulova L.N., Fedyakina I.T., Krasnoslobodtsev K.G., Voronina O.L., Aksenova E.I., Kunda M.S., Ryzhova N.N., Alkhovsky S.V., Vartanyan R.V., Kisteneva L.B., Rosatkevich A.G., Kruzhkova I.S., Bazarova M.V., Smetanina S.V. Peculiarities of the influenza viruses circulation and their properties during 2018–2019 epidemic season in Russia and countries of the Northern Hemisphere

Monakhova E.V., Arkhangelskaya I.V., Titova S.V., Pisanov R.V. MSHA-like pili of non-toxicogenic *Vibrio cholerae* strains

Poltavchenko A.G., Ternovoi V.A., Eorsh A.V., Filatov P.V., Bayandin R.B., Sementsova A.O., Eremeeva L.I., Loktev V.B., Agafonov A.P. Identification of Dengue Fever Markers by Dot Immunoassay

Sukhanova S.M., Sayapina L.V., Berdnikova Z.E., Tikhonova A.S., Klimov V.I. Problems of Assessment of Live Bacterial Vaccine Sterility

Terent'ev A.I., Zhukov V.A., Sergeev Ar.A., Pastushenko S.B., Rogozhkina S.V., Borisevich S.V., Maksimov V.A., Sergeev Al.A., Titova K.A., Galakhova D.O. Experience in the Design and Production of Recombinant Oral Vaccine «Revax VZT»

Utkin D.V., Naidenova E.V., Nikiforov K.A., Boiko A.V., Agafonov D.A., Lyapin M.N., Lopatin A.A., Bangoura I., Camara T.D., Boumbaly S., Boiro M.Y. The Study of the Immune Layer to the Cholera Agent in Individuals Living in the Republic of Guinea

Frolov D.M., Senina T.V., Zamarina T.V., Khrapova N.P. Application of Latex-Agglutination for Rapid Detection of Pathogenic Burkholderia

Chekhvalova E.V., Manin E.A., Kulichenko A.N., Orobey V.G., Shvets O.G. Modern Epizootiological-Epidemiological Situation on Natural-Focal Infections in the Resort City of Sochi

Shchemelev A.N., Ostankova Yu.V., Zueva E.B., Boumbaly S., Balde T.A.L., Semenov A.V. Characterization of Hepatitis B Virus and Human Immunodeficiency Virus among HIV/HBV Co-Infected Patients from the Republic of Guinea

#### Anniversaries

To the 80-th Anniversary of Lidiya S. Pronina

To the 60-th Anniversary of Ivan A. Dyatlov

#### Revering the Memory of the Colleague

Of blessed memory of Pavel I. Anisimov

А.Ю. Попова<sup>1,2</sup>, В.Ю. Смоленский<sup>1</sup>, Ю.В. Демина<sup>1,2</sup>, В.В. Малеев<sup>3</sup>, В.В. Кутырев<sup>4</sup>, С.А. Щербакова<sup>4</sup>, Р.А. Максютлов<sup>5</sup>, О.В. Пьянков<sup>5</sup>, S. Keita<sup>6</sup>, M.Y. Buaro<sup>7</sup>, N. Magassouba<sup>8</sup>, Я.Ю. Ицков<sup>9</sup>, Е.В. Коломоец<sup>9</sup>

## ВКЛАД РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В УКРЕПЛЕНИЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ОПАСНЫМИ ИНФЕКЦИОННЫМИ БОЛЕЗНЯМИ НА ТЕРРИТОРИИ ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

<sup>1</sup>Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Российская Федерация;  
<sup>2</sup>ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования», Москва, Российская Федерация;  
<sup>3</sup>Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Москва, Российская Федерация;  
<sup>4</sup>ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация;  
<sup>5</sup>ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», п. Кольцово, Российская Федерация;  
<sup>6</sup>Национальное агентство санитарной безопасности, Конакри, Гвинейская Республика;  
<sup>7</sup>Научно-исследовательский институт прикладной биологии, Киндия, Гвинейская Республика;  
<sup>8</sup>Национальная лаборатория геморрагических лихорадок, Конакри, Гвинейская Республика;  
<sup>9</sup>Объединенная компания «РУСАЛ», Москва, Российская Федерация

В обзоре подведены основные итоги пятилетнего сотрудничества специалистов Российской Федерации и Гвинейской Республики в сфере борьбы с опасными инфекционными болезнями. С самого начала эпидемии болезни, вызванной вирусом Эбола в странах Западной Африки, Россия приняла активное участие в международной деятельности по ее ликвидации. Научно-техническое взаимодействие Российской Федерации и Гвинейской Республики, основными составляющими которого являются укрепление лабораторной и госпитальной базы, а также подготовка специалистов, можно разделить на два этапа. Первый (в период эпидемии) – направление в Гвинейскую Республику группы российских специалистов и мобильных лабораторий из состава мобильного комплекса специализированной противоэпидемической бригады Роспотребнадзора и открытие первого в Гвинейской Республике стационарного инфекционного госпиталя для больных лихорадкой Эбола; второй (после завершения эпидемии) – создание высокотехнологичного Центра, позволяющего выполнять как диагностические, так и научные исследования широкого спектра. В ходе реализации Российской Федерацией программ помощи Гвинейской Республике по противодействию инфекционным болезням задействованы механизмы государственно-частного партнерства с ОК РУСАЛ, позволившие сделать максимально эффективным участие России в ликвидации эпидемии болезни, вызванной вирусом лихорадки Эбола, и последующем укреплении национального потенциала Гвинеи в борьбе с биологическими угрозами. Итогами пятилетнего взаимодействия Российской Федерации и Гвинейской Республики стали укрепление национального потенциала Гвинеи по противодействию биологическим угрозам, создание лабораторных и госпитальных ресурсов, обеспечивающих потребности по купированию эпидемиологических угроз, обусловленных особо опасными инфекционными болезнями, не только в Гвинейской Республике, но и в соседних странах Западной Африки, развитие научно-технического сотрудничества, направленного на совершенствование системы эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями в Гвинейской Республике.

*Ключевые слова:* болезнь, вызванная вирусом Эбола, эпидемия, биологические угрозы, Западная Африка, российско-гвинейское сотрудничество.

*Корреспондирующий автор:* Щербакова Светлана Анатольевна, e-mail: rusrap1@microbe.ru.

*Для цитирования:* Попова А.Ю., Смоленский В.Ю., Демина Ю.В., Малеев В.В., Кутырев В.В., Щербакова С.А., Максютлов Р.А., Пьянков О.В., Keita S., Buaro M.Y., Magassouba N., Ицков Я.Ю., Коломоец Е.В. Вклад Российской Федерации в укрепление эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями на территории Гвинейской Республики. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 3:6–13. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-6-13

A.Yu. Popova<sup>1,2</sup>, V.Yu. Smolensky<sup>1</sup>, Yu.V. Demina<sup>1,2</sup>, V.V. Maleev<sup>3</sup>, V.V. Kuttyrev<sup>4</sup>, S.A. Shcherbakova<sup>4</sup>, R.A. Maksyutov<sup>5</sup>, O.V. Pyankov<sup>5</sup>, S. Keita<sup>6</sup>, M.Y. Buaro<sup>7</sup>, N. Magassouba<sup>8</sup>, Y.Yu. Itskov<sup>9</sup>, E.V. Kolomoets<sup>9</sup>

## Contribution of the Russian Federation to Strengthening of Epidemiological Surveillance Over Dangerous Infectious Diseases in the Republic of Guinea

<sup>1</sup>Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumer Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation;  
<sup>2</sup>Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Moscow, Russian Federation;  
<sup>3</sup>Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;  
<sup>4</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" of Rospotrebnadzor, Saratov, Russian Federation;  
<sup>5</sup>State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation;  
<sup>6</sup>National Agency for Sanitary Safety, Conakry, Republic of Guinea;  
<sup>7</sup>Research Institute of Applied Biology, Kindia, Republic of Guinea;  
<sup>8</sup>National Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Conakry, Republic of Guinea;  
<sup>9</sup>UC "RUSAL", Moscow, Russian Federation

**Abstract.** The review summarizes the main results of a five-year cooperation activities of the specialists from the Russian Federation and the Republic of Guinea in the fight against dangerous infectious diseases. From the very beginning of the Ebola virus disease epidemic in West Africa, Russia has been actively involved in international efforts to control it. The scientific and technical interaction of the Russian Federation and the Republic of Guinea, the main components of which are strengthening of the laboratory and hospital facilities, training of specialists, can be divided into two stages. The first one (during the period of the epidemic) is sending to Guinea a group of Russian specialists and mobile

laboratories from the mobile complex of the specialized anti-epidemic team of the Rospotrebnadzor and opening of the first in the Republic of Guinea inpatient infectious disease hospital for Ebola patients. The second one (after the end of the epidemic) is the creation of a high-tech Center, which allows performing both diagnostic and scientific researches of a wide range. In the course of implementation of the programs on assistance to the Republic of Guinea on combating infectious diseases, public-private partnership mechanisms with UC RUSAL were involved, which made it possible for Russia to participate in the eradication of the Ebola epidemic and the subsequent strengthening of Guinea's national potential in combating biological threats as efficiently as possible. The five-year interaction between the Russian Federation and the Republic of Guinea resulted in the build-up of Guinea's national potential to counter biological threats, the creation of laboratory and hospital resources that meet the needs for the elimination of epidemiological threats caused by particularly dangerous infectious diseases, not only in the Republic of Guinea, but also in neighboring countries of West Africa, development of scientific and technical cooperation aimed at improving the system of epidemiological surveillance of communicable diseases in the Republic of Guinea.

*Key words:* Ebola virus disease, epidemic, biological threats, West Africa, Russian-Guinean cooperation.

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

*Corresponding author:* Svetlana A. Shcherbakova, e-mail: rusrap1@microbe.ru.

*Citation:* Popova A.Yu., Smolensky V.Yu., Demina Yu.V., Maleev V.V., Kutuyev V.V., Shcherbakova S.A., Maksyutov R.A., Pyankov O.V., Keita S., Buaro M.Y., Magassouba N., Itskov Y.Yu., Kolomoets E.V. Contribution of the Russian Federation to Strengthening of Epidemiological Surveillance Over Dangerous Infectious Diseases in the Republic of Guinea. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 3:6–13. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-6-13

*Received* 24.09.19. *Accepted* 26.09.19.

Российскую Федерацию и ряд стран Африки связывают длительные и тесные отношения в политической, экономической, гуманитарной, культурной и иных областях. Приоритетным направлением системного развития всего комплекса российско-африканского взаимодействия является укрепление сотрудничества по противодействию вызовам и угрозам региональной и глобальной безопасности. В современном мире инфекционные болезни, эндемичные для африканского континента и имеющие потенциал глобального распространения, представляют серьезную угрозу как для населения стран Африки, так и в целом для всего мирового сообщества [1]. Примерами таких угроз являются масштабные вспышки и эпидемии, вызванные возбудителями особо опасных инфекционных болезней: лихорадки Эбола, чумы, холеры и др. [2–8].

Для большинства африканских стран характерен низкий уровень развития национальных систем здравоохранения, не способных самостоятельно противостоять этим вызовам, противодействие которым часто требует участия ВОЗ и ряда зарубежных партнеров. Так, ликвидация эпидемии болезни, вызванной вирусом Эбола (БВВЭ), охватившей Гвинею, Либерию и Сьерра-Леоне в 2013–2016 гг., стала возможной только благодаря успешному взаимодействию национальных структур здравоохранения пострадавших стран с различными международными организациями и структурами здравоохранения стран Европы, Азии и Африки, принявшими участие в борьбе с лихорадкой Эбола [9].

Сложившаяся в тот период чрезвычайная ситуация стала вызовом не только мировому здравоохранению, но и глобальному экономическому развитию. Потери среди населения Гвинеи, Либерии и Сьерра-Леоне составили свыше 11 тыс. человек [10]. По оценкам специалистов Всемирного банка, ущерб от эпидемии БВВЭ в мировом масштабе превысил \$ 7 млрд. Среди основных причин, обусловивших столь масштабное распространение БВВЭ, можно выделить необычность локализации эпидемии (все предыдущие вспышки лихорадки Эбола имели ме-

сто в центральной Африке, как правило, в удаленных сельских районах), и, как следствие, неготовность национальных систем здравоохранения к реагированию на эпидемические проявления этой особо опасной инфекционной болезни; запоздалые ответные действия ВОЗ (первый случай – декабрь 2013, объявление ВОЗ чрезвычайной ситуации в области общественного здравоохранения, имеющей международное значение, – 8 августа 2014); занос вируса в крупные города и столицы всех трех пораженных стран и последующее экспоненциальное распространение БВВЭ за счет вовлечения в процесс населения городских трущоб [11, 12].

В числе первых в международную стратегию противодействия крупнейшей эпидемии БВВЭ в Западной Африке включилась Российская Федерация. Учитывая особенности сложившейся ситуации, помощь, оказываемая со стороны России, носила многокомпонентный и целенаправленный характер, ключевыми составляющими стали укрепление лабораторной и госпитальной базы, оказание консультативно-методической помощи, финансовой и гуманитарной поддержки. Высокая эффективность вклада Российской Федерации в ликвидацию эпидемии лихорадки Эбола была обеспечена за счет четкого межведомственного взаимодействия и скоординированного участия в проведении мероприятий по борьбе с эпидемией следующих ведомств: Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), Министерства иностранных дел, Министерства обороны, Министерства по делам гражданской обороны, чрезвычайным ситуациям и ликвидации последствий стихийных бедствий [13].

Участие Российской Федерации в укреплении национальных возможностей Гвинейской Республики по противодействию БВВЭ и другим инфекционным болезням условно можно разделить на два этапа. Первый этап (в период эпидемии) – направление в Гвинейскую Республику группы российских специалистов и двух мобильных лабораторий (лаборатория индикации и бактериологическая лаборатория) из состава мобиль-

ного комплекса специализированной противоэпидемиологической бригады (МК СПЭБ) Роспотребнадзора для проведения диагностических исследований; усиление госпитальной базы за счет ввода в эксплуатацию первого стационарного госпиталя для больных БВВЭ (г. Киндия); оказание консультативной помощи гвинейским государственным структурам; второй (после завершения эпидемии БВВЭ) – создание высокотехнологического центра, позволяющего выполнять диагностические и научные исследования по широкому спектру проблем, обеспечивать подготовку кадров и проводить санитарно-просветительную работу.

Программы помощи Гвинейской Республики как в период эпидемии БВВЭ, так и после ее завершения осуществляются при поддержке Правительства Российской Федерации и реализации механизмов государственно-частного партнерства, в соответствии с двусторонними соглашениями между Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Министерством науки и высшего образования и Министерством здравоохранения Гвинейской Республики.

Российские мобильные лаборатории начали свою работу в Гвинее 22 августа 2014 г.

Этому предшествовала напряженная организационная и консультативная работа российских специалистов в Гвинее, которая позволила оценить существующие на тот период проблемы по организации противоэпидемиологических мероприятий, предложить конкретные программы помощи, а также перспективы взаимодействия. Консультативно-методическая помощь со стороны Российской Федерации основывалась на базовых принципах организации эпидемиологического надзора и требованиях биологической безопасности и оказывалась государственным структурам Гвинейской Республики в разгар эпидемии БВВЭ.

Учитывая недостаточность лабораторного обеспечения, выражавшуюся в том, что только часть выявленных случаев БВВЭ получала лабораторное подтверждение, и отсутствовало лабораторное тестирование контактных, актуальным направлением российской помощи стало укрепление лабораторной сети в Гвинейской Республике. Проведенная подготовительная организационная работа позволила максимально оперативно интегрировать российские мобильные лаборатории в международную лабораторную сеть, осуществляющую выявление и диагностику случаев заболевания лихорадкой Эбола и объединяющую лаборатории различных стран и международных организаций. Количество таких лабораторий в период эпидемии БВВЭ на территории Западной Африки достигло 45, включая 26 мобильных лабораторных комплексов [13].

Базовые принципы, положенные в основу функционирования СПЭБ Роспотребнадзора (мобильность, многопрофильность, автономность, биологическая безопасность) позволили обеспечить оперативность, высокий методический уровень диагностических исследований и бесперебойное функционирование лабораторий российского мобильного ком-

плекса СПЭБ [14]. Работа российских специалистов в Гвинейской Республике осуществлялась в тесном взаимодействии с Посольством Российской Федерации в Гвинейской Республике и Республике Сьерра-Леоне, Объединенной компанией «РУСАЛ» ОКРУСАЛ, органами здравоохранения Гвинейской Республики, а также с различными международными организациями (ВОЗ, ООН, «Врачи без границ» и др.).

Материал для лабораторного исследования поступал от больных и умерших людей с подозрением на БВВЭ, госпитализированных в обсервационно-изоляционный центр «Врачи без границ» (MSF) на территории Национального госпиталя «Донка» (г. Конакри) (август 2014 г.–январь 2015 г.), госпиталя Научного клинико-диагностического центра эпидемиологии и микробиологии (НКДЦЭМ), Дирекции здравоохранения префектуры Киндия – DPS, Общественного транзитного центра – STCom, Региональной больницы Киндии – HRK (январь 2015 г. – январь 2016 г.).

Надежность и достоверность результатов, получаемых в российской мобильной лаборатории, подтверждена в ходе процедуры валидации, проведенной с 25 августа по 3 сентября 2014 г. Одним из условий успешной интеграции в международную систему ответных мер стало строгое соответствие проводимых исследований требованиям Руководства ВОЗ по лабораторной диагностике, а организации лабораторных исследований – требованиям ИСО [13].

Всего в лаборатории МК СПЭБ Роспотребнадзора в период эпидемии БВВЭ (с августа 2014 г. по январь 2016 г.) поступило 3077 образцов, проведено 17454 исследования. Положительный результат детекции вируса Эбола получен в 349 пробах (11,3 %). Кроме этого, выявлены маркеры возбудителей гепатитов В, С, А, ВИЧ, малярии, лихорадки денге, лихорадки Западного Нила и др. [15].

После завершения эпидемии БВВЭ мобильные лаборатории переданы гвинейской стороне, что значительно расширило национальные возможности по выявлению и расшифровке случаев опасных инфекционных болезней, особенно в труднодоступных регионах.

Ключевой момент деятельности лабораторий – обеспечение требований биологической безопасности, поэтому работу осуществляли сотрудники профильных организаций Роспотребнадзора (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» и ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»), специалисты по работе с возбудителями I группы патогенности (опасности). Четкая организация и неуклонное соблюдение требований к обеспечению биологической безопасности при работе в лабораториях позволила исключить инфицирование российских специалистов и не допустить завоза БВВЭ на территорию Российской Федерации, несмотря на «вахтовый» метод работы и регулярную смену личного состава [16]. Актуальность проблемы, связанной с высоким риском заражения лихорадкой Эбола в странах Западной Африки медицинских работников [17, 18], сотрудников различных меж-

дународных организаций, принимавших участие в ликвидации эпидемии, и высокой вероятностью завоза в страны за пределами Африки, подтверждена заносами БВВЭ в этот период в страны Европы и США из Сьерра-Леоне и Либерии. По данным общедоступных источников информации, в четырех странах (США, Италия, Испания и Великобритания) зарегистрировано 7 случаев инфицирования вирусом Эбола (1 случай с летальным исходом в США).

Таким образом, российские специалисты, работая в лабораториях МК СПЭБ в автономном режиме при соблюдении требований биологической безопасности, обеспечили проведение диагностических исследований с помощью передовых технологий (ПЦР, ИФА, ИХА, секвенирование) и защиту персонала от инфицирования ПБА.

Максимальная суточная мощность мобильной лаборатории Роспотребнадзора составляла до 140 образцов, что полностью сопоставимо с расчетной производительностью других мобильных лабораторий, функционировавших в Западной Африке в период эпидемии БВВЭ. Однако в отличие от зарубежных лабораторий, в лабораториях МК СПЭБ Роспотребнадзора выполнялись исследования на широкий спектр опасных природно-очаговых и социально-значимых инфекционных болезней (более 20 нозологий), имеющих сходные с БВВЭ клинические симптомы, что способствовало своевременному установлению диагноза и правильному выбору тактики ведения пациентов.

Еще одним преимуществом российских лабораторий является их мобильность. В начале пребывания в Гвинейской Республике, с 23 августа 2014 г. по 11 января 2015 г. лабораторные модули располагались на территории Национального госпиталя «Донка» в столице страны Конакри. В январе 2015 г. мобильные лаборатории передислоцированы в г. Киндия, где ОК РУСАЛ завершила строительство первого стационарного инфекционного госпиталя НКДЦЭМ. Время, затраченное на передислокацию мобильных лабораторий из Конакри в Киндию (более 140 км) и их подготовку к приему материала для проведения исследований, составило около 24 ч. Необходимо отметить, что на территории префектуры Киндия лабораторий, осуществлявших лабораторную диагностику БВВЭ, не было, и все пробы биологического материала от больных направляли для исследования в столичный госпиталь «Донка». Передислокация МК СПЭБ сделала возможным проведение лабораторных исследований материала от пациентов с подозрением на БВВЭ непосредственно в этом регионе, что значительно сократило время проведения этиологической расшифровки.

Кроме диагностических исследований на БВВЭ и другие инфекционные болезни, актуальные для региона Западной Африки, российские специалисты проводили подготовку кадров медицинских учреждений Гвинеи по вопросам биологической безопасности, эпидемиологии и лабораторной диагностики БВВЭ, оказывали консультативно-методическую

помощь по организации профилактических мероприятий и проведению эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями, осуществляли санитарно-гигиеническое просвещение населения.

В период эпидемии БВВЭ в 2014–2015 гг. Роспотребнадзором осуществлены поставки медицинских изделий, мобильных изоляторов и средств индивидуальной защиты для нужд гвинейских медиков. Поставлено более 10 тыс. комплектов средств индивидуальной защиты.

Как отмечено выше, одна из главных составляющих российской помощи Гвинейской Республике – укрепление госпитальной базы. В январе 2015 г. в префектуре Киндия открыт первый стационарный инфекционный госпиталь НКДЦЭМ для больных БВВЭ. Проектирование, строительство и оснащение госпиталя обеспечивала РУСАЛ. Следует подчеркнуть, что при планировании и строительстве госпиталя максимально учитывались требования биологической безопасности, направленные на снижение риска внутрибольничного инфицирования. Это, а также подготовка специалистов по вопросам биологической безопасности (использование средств индивидуальной защиты, организация противоэпидемического режима работы), мониторинг выполнения указанных требований позволили избежать случаев внутрибольничного заражения медицинского персонала НКДЦЭМ, в то время, как в период эпидемии БВВЭ в Гвинее, Либерии и Сьерра-Леоне пострадал 881 медицинский работник, из которых 513 погибли (летальность 58,2 %). С января по сентябрь 2015 г. в госпиталь поступило 104 пациента. У 31 больного лабораторными методами подтвержден диагноз «БВВЭ», из них у 11 болезнь закончилась смертельным исходом. Летальность составила 35 % (ниже, чем в целом по Гвинее).

Помощь Российской Федерации в ликвидации эпидемии БВВЭ высоко оценена Президентом и Правительством Гвинейской Республики.

Тесное и высокоэффективное российско-гвинейское взаимодействие послужило базой дальнейшего научно-технического сотрудничества после завершения эпидемии БВВЭ и фактически заложило основы для реализации второго этапа по укреплению национальных возможностей Гвинейской Республики по противодействию опасным инфекционным болезням.

15 февраля 2017 г. Роспотребнадзором при реализации распоряжения Правительства Российской Федерации и использовании механизма государственно-частного партнерства с ОК РУСАЛ открыт Российско-Гвинейский научно-исследовательский центр эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней. Роспотребнадзором осуществлена поставка лабораторного оборудования, автотранспорта и мобильной лаборатории. По уровню оснащенности аналитическим оборудованием, оборудованием для обеспечения биологической безопасности проводимых работ этот Центр не имеет аналогов в регионе Западной Африки. Приборная

база Центра позволяет проводить лабораторную диагностику всех особо опасных инфекционных болезней, включая БВВЭ, лихорадку Ласса, желтую лихорадку, холеру и другие инфекционные болезни, актуальные для Гвинейской Республики, с использованием современных диагностических технологий при мощности до 500 исследований в сутки. Оснащение Центра расходными материалами и диагностическими препаратами осуществляется на регулярной основе, что обеспечивает постоянную готовность к проведению диагностических исследований. Необходимо подчеркнуть возможность проведения на базе Центра верифицирующих исследований, что позволяет рассматривать его в качестве референс-лаборатории по особо опасным инфекционным болезням в регионе.

В настоящее время материал для исследования поступает из всех префектур Гвинеи (Конакри, Киндия, Боке, Н'Зерекоре, Маму, Канкан, Лабе, Фарана). За пять лет (с августа 2014 г. и по август 2019 г.) российскими специалистами проведено свыше 70 тыс. исследований более 20 тыс. проб клинического, биологического и полевого материала на наличие маркеров возбудителей инфекционных болезней.

Одним из важнейших аспектов российско-гвинейского взаимодействия является сотрудничество с национальными структурами, курирующими вопросы контроля и противодействия инфекционным болезням. В период эпидемии БВВЭ координацию работы медицинских учреждений Гвинейской Республики, взаимодействие с международными организациями и зарубежными партнерами осуществлял Национальный комитет по борьбе с Эбола, который впоследствии реорганизован в Национальное агентство санитарной безопасности – Agence Nationale de Sécurité Sanitaire (ANSS) – орган государственного управления в сфере обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия. ANSS отвечает за реализацию стратегических направлений Министерства здравоохранения в области безопасности здоровья: создание национальной системы мониторинга и реагирования на эпидемии и чрезвычайные ситуации; развитие систем раннего предупреждения и ответных мер, выполнение ММСП (2005). Учитывая эти приоритетные направления деятельности ANSS, Роспотребнадзор осуществляет тесное сотрудничество с агентством, продолжая развивать взаимодействие, начало которому положено в период эпидемии БВВЭ. В частности, в рамках сотрудничества с ANSS проводятся исследования по контролю за реконвалесцентами БВВЭ, обеспечена лабораторная диагностика желтой лихорадки при возникновении подозрительных случаев. Российской стороной оказана помощь при ликвидации эпидемических осложнений по кори, эпидемия которой охватила страны Западной Африки. В 2017 г. госпитальная база НКДЦЭМ использована для лечения больных корью, медицинским учреждениям Гвинеи поставлено 40 тыс. доз коревой вакцины российского производства, в оперативном режиме обе-

спечена этиологическая диагностика заболеваний. В 2018 г. в связи с непрекращающейся регистрацией кори в Гвинее продолжено взаимодействие по лабораторному обеспечению расшифровки случаев и проведена работа по изучению напряженности иммунитета к вирусу кори среди населения Гвинейской Республики, которая показала необходимость кампании дополнительной иммунизации, в связи с чем ANSS и российскими специалистами разработана программа по оценке эффективности вакцинации против кори в Гвинейской Республике.

В 2015–2017 гг. Роспотребнадзор при взаимодействии с ANSS и участии российского бизнеса осуществил поставку 5 тыс. доз холерной вакцины и 20 тыс. доз вакцины для профилактики желтой лихорадки.

Ключевым вопросом российско-гвинейского взаимодействия является укрепление кадрового потенциала. Развивая это направление сотрудничества, Роспотребнадзором и подведомственными организациями к настоящему времени обучено более 800 специалистов медицинских и научных учреждений Гвинеи, в том числе и на базе ведущих научных организаций Роспотребнадзора (НИИЭМ им. Пастера и ЦНИИЭ). Большое внимание уделяется повышению гигиенической грамотности населения. Российско-Гвинейским научно-исследовательским центром эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней организована санитарно-просветительная работа с населением. Разработаны информационные раздаточные материалы о мерах, позволяющих предотвратить опасные инфекционные заболевания, актуальные для Гвинейской Республики (БВВЭ, корь, туберкулез, гепатиты, СПИД, холера, острые кишечные инфекции и др.).

Новый импульс получило научно-техническое сотрудничество, которое имеет многолетнюю историю. С 1977 по 1992 год в г. Киндия функционировала Советско-Гвинейская научно-исследовательская вирусологическая и микробиологическая лаборатория, основным направлением деятельности которой являлось изучение экологии и распространения возбудителей опасных и природно-очаговых инфекционных болезней.

В настоящее время на базе Российско-Гвинейского научно-исследовательского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней продолжают научные исследования, начатые еще в период эпидемии БВВЭ, а также осуществляются широкомасштабные экспедиционные работы, направленные на изучение распространения возбудителей природно-очаговых инфекционных болезней, в первую очередь вирусов Эбола, Ласса, желтой лихорадки, возбудителя малярии на территории Гвинейской Республики, а также новых, ранее не выявленных патогенов [19, 20].

Благодаря уникальной возможности для апробации диагностических препаратов непосредственно в очагах инфекционных болезней за пять лет разработано 18 новых тест-систем для выявления возбу-

телей, актуальных как для Гвинейской Республики, так и для Российской Федерации, в рамках обеспечения санитарной охраны территории и биологической безопасности в целом. Особую актуальность приобрела разработка в сжатые сроки в ЦНИИЭ тест-системы для детекции РНК вируса Эбола Заир «Амплиценс®ЕВОВ(Zair)-FL», которая по своим аналитическим характеристикам не уступает ведущим зарубежным аналогам, а по диагностическим – в ряде случаев превосходит их. Именно с использованием этой тест-системы проведена большая часть исследований по диагностике БВВЭ в российских мобильных лабораториях. [21, 22,]. Учитывая актуальность исследований, направленных на изучение всех аспектов эпидемического распространения БВВЭ, также необходимо иметь в арсенале диагностические препараты, позволяющие выявлять не только РНК вируса Эбола, но и специфические антитела к этому возбудителю. С этой целью в ГНЦ ВБ «Вектор» разработан и апробирован на базе МК СПЭБ Роспотребнадзора набор реагентов для выявления специфических антител – «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин». Тест-система предназначена для совместного и раздельного выявления антител классов G и M к вирусу Эбола в сыворотке и плазме крови человека методом иммуноферментного анализа [23].

В рамках Программы по противодействию эпидемии БВВЭ, реализуемой Роспотребнадзором, в ГНЦ ВБ «Вектор» сконструированы платформы для создания на их основе вакцин для профилактики БВВЭ, лихорадок Марбург и Ласса. Вакцина «ЭпиВакЭбола» зарегистрирована в Российской Федерации в установленном порядке [24].

Разработана технология получения терапевтических гуманизированных рекомбинантных антител для лечения особо опасных вирусных инфекционных болезней.

Помимо практических результатов, получены данные, позволяющие по-новому рассмотреть развитие эпидемии БВВЭ в Западной Африке. Как известно, одним из звеньев эпидемического процесса при БВВЭ является длительная персистенция возбудителя в организме реконвалесцентов, обуславливающая риск возникновения новых случаев заболевания [25]. К приоритетным результатам, полученным в ходе реализации российско-гвинейского научного сотрудничества, относятся данные о продолжительности сохранения вируса Эбола в грудном молоке и возможности передачи возбудителя от кормящей матери здоровому ребенку. Показано, что в грудном молоке вирус сохранялся в жизнеспособном состоянии на 12-й день отсутствия клинических симптомов, при отрицательных результатах исследования крови в ОТ-ПЦР, а детекция вирусной РНК продолжалась до 43-го дня клинического выздоровления [26].

Одним из ключевых моментов установления этиологического агента эпидемии БВВЭ в Западной Африке являлось определение генетических характеристик вируса, вызвавшего столь масштабные эпидемические осложнения. Согласно проведенным

исследованиям, занос вируса Заир из природного резервуара Центральной Африки в природный резервуар Западной Африки произошел приблизительно в 2004 г. [12]. Анализ генетических последовательностей, опубликованных в базе данных NCBI GenBank, позволил выявить изменения, произошедшие в геноме возбудителя в 2014–2015 гг. В период эпидемии вирус Заир эволюционировал по двум направлениям: первый путь характеризуется равномерным эпидемическим процессом; второй – интенсивным развитием эпидемического процесса и наличием определенной группы единичных маркерных мутаций, полностью отсутствующих у вариантов генома вируса Заир из первого эволюционного пути. Вирус Заир, имеющий геном второго эволюционного пути развития, в абсолютном большинстве случаев (около 90 %) послужил причиной заболевания людей лихорадкой Эбола в Западно-Африканском регионе в 2014–2015 гг. На территории Гвинеи представлены два параллельных варианта эволюционного пути развития генома вируса Заир, в отличие от Сьерра-Леоне и Либерии, где выявлен преимущественно второй вариант [27].

В настоящее время совместные научные исследования продолжают в рамках реализации программы научно-технического взаимодействия, поддержанной Правительством Российской Федерации и запланированной на период 2018–2020 гг. При этом ключевыми направлениями научных разработок являются: формирование системы эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями, актуальными для Гвинеи; поиск новых, ранее не известных возбудителей и выяснение причин возникновения эпидемии БВВЭ в Западной Африке в 2014–2016 гг. [28–30].

Таким образом, итогами пятилетнего сотрудничества Российской Федерации и Гвинейской Республики стали: укрепление национального потенциала Гвинеи по противодействию биологическим угрозам, что позволяет существенно снизить объемы внешней помощи при выявлении и оперативном реагировании на эпидемиологические угрозы; создание лабораторных и госпитальных ресурсов, обеспечивающих потребности по купированию эпидемиологических угроз, обусловленных особо опасными инфекционными болезнями, не только в Гвинейской Республике, но и в соседних странах Западной Африки; развитие научно-технического сотрудничества, направленного на совершенствование системы эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями в Гвинейской Республике.

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

#### Список литературы

1. Fenollar F, Mediannikov O. Emerging infectious diseases in Africa in the 21st century. *New Microbes New Infect.* 2018; 26:S10–S18. DOI: 10.1016/j.nmni.2018.09.004.
2. Coltart C.E.M., Lindsey B., Ghinai I., Johnson A.M., Heymann D.L. The Ebola outbreak, 2013–2016: old lessons for new epidemics. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2017; 372(1721):B372:20160297. DOI: 10.1098/rstb.2016.0297.

3. Malvy D., McElroy A.K., de Clerck H., Günther S., van Griensven J. Ebola virus disease. *Lancet*. 2019; 393(10174):936–48. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)33132-5.
4. Grácio A.J.D.S., Grácio M.A.A. Plague: A Millenary Infectious Disease Reemerging in the XXI Century. *Biomed. Res. Int*. 2017; 2017:5696542. DOI: 10.1155/2017/5696542.
5. Gaffga N.H., Tauxe R.V., Mintz E.D. Cholera: a new homeland in Africa? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007; 77(4):705–13. PMID:17978075.
6. Mengel M.A., Delrieu I., Heyerdahl L., Gessner B.D. Cholera Outbreaks in Africa. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014; 379:117–44. DOI: 10.1007/82\_2014\_369.
7. Ajayi A., Smith S.I. Recurrent cholera epidemics in Africa: which way forward? A literature review. *Infection*. 2019; 47(3):341–9. DOI: 10.1007/s15010-018-1186-5.
8. Garske T., Van Kerkhove M.D., Yactayo S., Ronveaux O., Lewis R.F., Staples J.E., Perea W., Ferguson N.M. Yellow Fever Expert Committee. Yellow Fever in Africa: estimating the burden of disease and impact of mass vaccination from outbreak and serological data. *PLoS Med.* 2014; 11(5):e1001638. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001638.
9. Ravi S.J., Snyder M.R., Rivers C. Review of international efforts to strengthen the global outbreak response system since the 2014–16 West Africa Ebola Epidemic. *Health Policy Plan.* 2019; 34(1):47–54. DOI: 10.1093/heapol/czy102.
10. World Health Organization Ebola virus disease. Situation report 10 June 2016. [Электронный ресурс] URL: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/208883/ebolasitrep\\_10Jun2016\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/208883/ebolasitrep_10Jun2016_eng.pdf) (дата обращения 13.08.2019 г.)
11. Kaner J., Schack S. Understanding Ebola: the 2014 epidemic. *Global Health*. 2016; 12(1):53. DOI: 10.1186/s12992-016-0194-4.
12. Baize S., Pannetier D., Oestereich L., Rieger T., Koivogui L., Magassouba N., Soropogui B., Sow M.S., Keita S., De Clerck H., Tiffany A., Dominguez G., Loua M., Traoré A., Kolié M., Malano E.R., Heleze E., Bocquin A., Mély S., Raoul H., Caro V., Cadar D., Gabriel M., Pahlmann M., Tappe D., Schmidt-Chanasit J., Impouma B., Diallo A.K., Formenty P., Van Herp M., Günther S. Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371(15):1418–25. DOI: 10.1056/NEJMoal1404505.
13. Попова А.Ю., Кутырев В.В., редакторы. Ликвидация эпидемии Эбола в Гвинейской Республике: опыт работы специализированной противозидемической бригады Роспотребнадзора. 2-е изд., перераб. и доп. Ижевск: ООО «Принт-2»; 2017. 388 с.
14. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Специализированные противозидемические бригады (СПЭБ): эволюция научной концепции и практического применения. Саратов: ООО «Буква»; 2014. 572 с.
15. Попова А.Ю., редактор. Актуальные инфекции в Гвинейской Республике: эпидемиология, диагностика и иммунитет. СПб.: Изд-во С-Пб НИИ эпид. и микробиол. им. Пастера; 2017. 288 с.
16. Найденова Е.В., Лопатин А.А., Сафронов В.А., Коломоец Е.В., Левковский А.Е., Силла А.Л., Старшинов В.А., Щербаква С.А., Малеев В.В. Обеспечение биологической безопасности при проведении противозидемических мероприятий в период ликвидации эпидемии лихорадки Эбола в Гвинейской Республике. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2018; 7(3):102–8. DOI 10.24411/2305-3496-2018-13015.
17. Health worker Ebola infections in Guinea, Liberia and Sierra Leone Preliminary report. WHO/EVD/SDS/REPORT/2015.1 [Электронный ресурс] URL: <https://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/health-worker-infections/en/> (дата обращения 21.08.2019 г.)
18. World Health Organization (WHO), 2014b. Unprecedented Number of Medical Staff Infected with Ebola. [Электронный ресурс] URL: <http://www.who.int/mediacentre/news/ebola/25-august-2014/en>. (дата обращения 09.08.2019 г.)
19. Найденова Е.В., Карташов М.Ю., Бойко А.В., Сафронов В.А., Лопатин А.А., Кутырев И.В., Васар I., Voumbaly S., Коломоец Е.В., Kalivogui S., Voiro M.Y., Щербаква С.А. Определение уровня иммунной прослойки населения Гвинейской Республики к возбудителям лептоспироза. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2019; 9(2):39–43. DOI: 10.18565/epidem.2019.9.2.39-43.
20. Лаврентьева И.Н., Хамитова И.В., Слита А.В., Левковский А.Е., Диало А.А., Диало А.К., Соу Т.С., Найденова Е.В., Агафонов Д.А., Сенчикина А.М. Влияние коинфицирования РВВ19 и *Plasmodium falciparum* на течение и прогноз малярии. *Инфекция и иммунитет*. 2018; 8(3):383–7. DOI: 10.15789/2220-7619-2018-3-383-387.
21. Дедков В.Г., Сафонова М.В., Боднев С.А., А.С. Кабанов, В.А. Сафронов, А.А. Лопатин, В.Е. Куклев, Д.В. Уткин, В.В. Малеев, Г.А. Шипулин. Совершенствование диагностической системы в формате ОТ-ПЦР в реальном времени «Амплиценс ЕВОУ (ZAIRE)-FL» для детекции РНК вируса Эбола Заир. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; (3):55–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-3-55-57.
22. Dedkov V.G., Magassouba N., Safonova M.V., Camara J., Sylla B., Agafonov A.P., Maleev V.V., Shipulin G.A., Bodnev S.A., Pyankov O.V. Sensitive multiplex real-time RT-PCR assay for the detection of filoviruses. *Health Secur.* 2018; 16(1):14–21. DOI: 10.1089/hs.2017.0027.
23. Пьянков С.А., Пьянков О.В., Найденова Е.В., Агафонов А.П., Воиро М.У., Солодкий В.В., Зайковская А.В., Максимов Н.Л., Мареникова С.С., Бочаров Е.Ф., Офицеров В.И., Лопатин А.А., Щербаква С.А., Демина Ю.В., Кутырев В.В., Михеев В.Н. Опыт использования метода ИФА для выявления антител к вирусу Эбола при работе бригады СПЭБ в Гвинейской Республике. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; (3):71–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-71-75.
24. Рыжиков А.Б., Пьянков О.В., Даниленко Е.Д., Гамалей С.Г., Шимина Г.Г., Сысоева Г.М., Батенева А.В., Таранов О.С., Агафонов А.П., Максютов Р.А. Вакцина против лихорадки Эбола «ЭпиВакЭбола»: результаты доклинического исследования иммуногенности и безопасности. Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения. Материалы XI съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. СПб.: Изд-во С-Пб НИИ эпид. и микробиол. им. Пастера; 2017. 257 с.
25. Chughtai A.A., Barnes M., Macintyre C.R. Persistence of Ebola virus in various body fluids during convalescence: evidence and implications for disease transmission and control. *Epidemiol. Infect.* 2016; 144(8):1652–60. DOI: 10.1017/S0950268816000054.
26. Лопатин А.А., Найденова Е.В., Сафронов В.А., Раздорский А.С., Уткин Д.В., Касьян Ж.А., Крицкий А.А., Терновой В.А., Нестеров А.Е., Сергеев А.А., Sylla A.L., Kanomou V., Voiro M.Y., Демина Ю.В., Хорошилов В.Ю., Попова А.Ю., Кутырев В.В. Изучение сохранения вируса Эбола в биологических жидкостях пациента на поздних стадиях выздоровления. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; (3):73–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-3-73-76.
27. Краснов Я.М., Сафронов В.А., Носов Н.Ю., Кутырев В.В., Попова А.Ю. Сравнительный анализ секвенированных образцов вируса Zaire Ebolavirus из Гвинейской Республики. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; (3):65–72. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-3-65-72.
28. Дедков В.Г., Сафонова М.В., Найденова Е.В., Magassouba N.F., Айгинин А.А., Soropogui B., Kouroouma F., Camara A.V., Camara J., Крицкий А.А., Щелканов М.Ю., Малеев В.В. Разработка и испытание метода выявления РНК вируса Ласса на основе полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 4:39–47. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-4-39-47.
29. Dedkov V.G., Magassouba N.F., Safonova M.V., Naydenova E.V., Ayginin A.A., Soropogui B., Kouroouma F., Camara A.V., Camara J., Kritzkiy A.A., Tuchkov I.V., Shchelkanov M.Y., Maleev V.V. Development and Evaluation of a One-Step Quantitative RT-PCR Assay for Detection of Lassa Virus. *J. Virol. Methods*. 2019; 271:113674. DOI: 10.1016/j.jviromet.2019.113674.
30. Дедков В.Г., Сафонова М.В., Девяткин А.А., Долгова А.С., Пьянков О.В., Сергеев А.А., Агафонов А.П., Малеев В.В., Шипулин Г.А. Разработка диагностической системы в формате ОТ-ПЦР в реальном времени для выявления РНК вируса Эбола Заир. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2015; 2:26–32.

## References

1. Fenollar F., Mediannikov O. Emerging infectious diseases in Africa in the 21st century. *New Microbes New Infect.* 2018; 26:S10–S18. DOI: 10.1016/j.nmni.2018.09.004.
2. Coltart C.E.M., Lindsey B., Ghinai I., Johnson A.M., Heymann D.L. The Ebola outbreak, 2013–2016: old lessons for new epidemics. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2017; 372(1721):B372:20160297. DOI: 10.1098/rstb.2016.0297.
3. Malvy D., McElroy A.K., de Clerck H., Günther S., van Griensven J. Ebola virus disease. *Lancet*. 2019; 393(10174):936–48. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)33132-5.
4. Grácio A.J.D.S., Grácio M.A.A. Plague: A Millenary Infectious Disease Reemerging in the XXI Century. *Biomed. Res. Int*. 2017; 2017:5696542. DOI: 10.1155/2017/5696542.
5. Gaffga N.H., Tauxe R.V., Mintz E.D. Cholera: a new homeland in Africa? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007; 77(4):705–13. PMID:17978075.
6. Mengel M.A., Delrieu I., Heyerdahl L., Gessner B.D. Cholera Outbreaks in Africa. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014; 379:117–44. DOI: 10.1007/82\_2014\_369.
7. Ajayi A., Smith S.I. Recurrent cholera epidemics in Africa: which way forward? A literature review. *Infection*. 2019; 47(3):341–9. DOI: 10.1007/s15010-018-1186-5.
8. Garske T., Van Kerkhove M.D., Yactayo S., Ronveaux O., Lewis R.F., Staples J.E., Perea W., Ferguson N.M. Yellow Fever Expert Committee. Yellow Fever in Africa: estimating the burden of disease and impact of mass vaccination from outbreak and serological data. *PLoS Med.* 2014; 11(5):e1001638. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001638.
9. Ravi S.J., Snyder M.R., Rivers C. Review of international

efforts to strengthen the global outbreak response system since the 2014–16 West Africa Ebola Epidemic. *Health Policy Plan.* 2019; 34(1):47–54. DOI: 10.1093/heapol/czy102.

10. World Health Organization Ebola virus disease. Situation report 10 June 2016. (Cited 13 Aug 2019.) [Internet] Available from: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/208883/ebolasitrep\\_10Jun2016\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/208883/ebolasitrep_10Jun2016_eng.pdf)

11. Kaner J., Schaack S. Understanding Ebola: the 2014 epidemic. *Global Health.* 2016; 12(1):53. DOI: 10.1186/s12992-016-0194-4.

12. Baize S., Pannetier D., Oestereich L., Rieger T., Koivogui L., Magassouba N., Soropogui B., Sow M.S., Keita S., De Clerck H., Tiffany A., Dominguez G., Loua M., Traoré A., Kolié M., Malano E.R., Heleze E., Bocquin A., Mély S., Raoul H., Caro V., Cadar D., Gabriel M., Pahlmann M., Tappe D., Schmidt-Chanasit J., Impouma B., Diallo A.K., Formenty P., Van Herp M., Günther S. Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371(15):1418–25. DOI: 10.1056/NEJMoal1404505.

13. Popova A.Yu., Kutyrév V.V., editors. Elimination of the Ebola epidemic in the Republic of Guinea: experience of the specialized anti-epidemic brigade of Rosпотребнадзор. 2nd edition, revised and supplemented. Izhevsk: "Print-2"; 2017. 388 p.

14. Onishchenko G.G., Kutyrév V.V., editors. Specialized Anti-Epidemic Teams (SAET): Evolution of Scientific Concept and Practical Application. Saratov: "Bukva"; 2014. 572 p.

15. Popova A.Yu., editor. Actual Infections in the Republic of Guinea: Epidemiology, Diagnosis and Immunity. SPb; 2017. 288 p.

16. Naydenova E.V., Lopatin A.A., Safronov V.A., Kolomoets E.V., Levkovsky A.E., Silla A.L., Starshinov V.A., Scherbakova S.A., Maleev V.V. Ensuring biological safety of anti-epidemic measures during the eradication of the Ebola epidemic in the Republic of Guinea. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie [Infectious Diseases: News, Opinions, Education]*. 2018; 3 (26):102–8.

17. Health worker Ebola infections in Guinea, Liberia and Sierra Leone Preliminary report. WHO/EVD/SDS/REPORT/2015.1 (Cited 21 Aug 2019). [Internet] Available from: <https://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/health-worker-infections/en/>

18. World Health Organization (WHO), 2014b. Unprecedented Number of Medical Staff Infected with Ebola. (Cited 09 Aug 2019). [Internet] Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/ebola/25-august-2014/en>.

19. Naydenova E.V., Kartashov M.Yu., Boyko A.V., Safronov V.A., Lopatin A.A., Kutyrév I.V., Bacar I., Boumbaly S., Kolomoets E.V., Kalivogui S., Boiro M.Y., Scherbakova S.A. Determination of the level of the immune layer of the population of the Republic of Guinea to the causative agents of leptospirosis. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy [Epidemiology and Infectious Diseases. Actual Issues]*. 2019; 9(2):39–43.

20. Lavrentyeva I.N., Khamitova I.V., Slita A.V., Levkovski A.E., Diallo A.A., Diallo A.K., Sow T.C., Naydenova E.V., Agafonov D.A., Senichkina A.M. Impact of coinfection of PV B19 on the course and prognosis of malaria caused by Plasmodium falciparum. *Infektsiya i immunitet [Russian Journal of Infection and Immunity]*. 2018; 8(3):383–7. DOI: 10.15789/2220-7619-2018-3-383-38.

21. Dedkov V.G., Safonova M.V., Bodnev S.A., Kabanov A.S., Safronov V.A., Lopatin A.A., Kuklev V.E., Utkin D.V., Maleev V.V., Shipulin G.A. Improvement of Diagnostic System in a Real-Time RT-PCR "AmpliSens EBOV (ZAIRE)-FL" Format for Zaire ebolavirus RNA Detection. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; 3:55–7.

22. Dedkov V.G., Magassouba N., Safonova M.V., Camara J., Sylla B., Agafonov A.P., Maleev V.V., Shipulin G.A., Bodnev S.A., Pyankov O.V. Sensitive multiplex real-time RT-QPCR assay for the detection of filoviruses. *Health Secur.* 2018; 16(1):14–21. DOI: 10.1089/hs.2017.0027.

23. P'yankov S.A., P'yankov O.V., Naydenova E.V., Agafonov A.P., Boiro M.Y., Solodkiy V.V., Zaykovskaya A.V., Maksimov N.L., Marennikova S.S., Bocharov E.F., Ofitserov V.I., Lopatin A.A., Shcherbakova S.A., Demina Y.V., Kutyrév V.V., Mikheev V.N. Experience of Application of the ELISA Method for Detection of Antibodies to Ebola Virus during the SAET Team Work in the Republic of Guinea. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016;(3):71–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-71-75.

24. Ryzhikov A.B., Pyankov O.V., Danilenko E.D., Gamaley S.G., Shimina G.G., Sysoeva G.M., Bateneva A.V., Taranov O.S., Agafonov A.P., Maksyutov R.A. EpiVacEbola Ebola Vaccine: Results from a Preclinical Study of Immunogenicity and Safety. In: Ensuring the epidemiological well-being: challenges and decisions. Materials of the XI Congress of the All-Russian Scientific and Practical Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists; 2017. P. 257.

25. Chughtai A.A., Barnes M., Macintyre C.R. Persistence of Ebola virus in various body fluids during convalescence: evidence and implications for disease transmission and control. *Epidemiol. Infect.* 2016; 144(8):1652–60. DOI: 10.1017/S0950268816000054.

26. Lopatin A.A., Naidenova E.V., Safronov V.A., Razdorsky A.S., Utkin D.V., Kas'yan Z.A., Kritsky A.A., Ternovoy V.A., Nesterov A.E., Sergeev A.A., Sylla A.L., Kanomou V., Boiro M.Y., Demina Y.V., Khoroshilov V.Y., Popova A.Y., Kutyrév V.V. Studies of

Ebola Virus persistence in the Body Fluids of a Patient at Advanced Stages of Convalescence. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; (3):73–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-3-73-76.

27. Krasnov Y.M., Safronov V.A., Nosov N.Y., Kutyrév V.V., Popova A.Y. Comparative Analysis of the Sequenced Zaire ebolavirus Samples from the Republic of Guinea. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; (3):65–72. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-3-65-72.

28. Dedkov V.G., Safonova M.V., Naydenova E.V., Magassouba N.F., Aginin A.A., Soropogui B., Kourouma F., Camara A.B., Camara J., Kritsky A.A., Shchelkanov M.Yu., Maleev V.V. Development and testing of Lassa virus RNA detection method based on real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; 4:39–47. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-4-39-47.

29. Dedkov V.G., Magassouba N.F., Safonova M.V., Naydenova E.V., Ayginin A.A., Soropogui B., Kourouma F., Camara A.B., Camara J., Kritskiy A.A., Tuchkov I.V., Shchelkanov M.Y., Maleev V.V. Development and Evaluation of a One-Step Quantitative RT-PCR Assay for Detection of Lassa Virus. *J. Virol. Methods.* 2019; 271:113674. DOI: 10.1016/j.jviromet.2019.113674.

30. Dedkov V.G., Safonova M.V., Devyatkin A.A., Dolgova A.S., Pyankov O.V., Sergeev A.A., Agafonov A.P., Maleev V.V., Shipulin G.A. BUT. Development of a real-time RT-PCR diagnostic system for the detection of Ebola Zair virus RNA. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy [Epidemiology and Infectious Diseases. Actual Issues]*. 2015; 2:26–32.

**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.

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

Maleev V.V. Central Research Institute of Epidemiology. 3a, Novogireevskaya St., Moscow, 111123, Russian Federation. E-mail: [crie@pcr.ru](mailto:crie@pcr.ru).

Kutyrév V.V., Shcherbakova S.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru).

Maksyutov R.A., Pyankov O.V. State Scientific Centre of Virology and Biotechnology "Vector". Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: [vector@vector.nsc.ru](mailto:vector@vector.nsc.ru).

Keita S. National Agency for Sanitary Safety. Conakry, Republic of Guinea.

Buaro M.Y. Research Institute of Applied Biology. Kindia, Republic of Guinea.

Magassouba N. National Laboratory of Hemorrhagic Fevers. Conakry, Republic of Guinea.

Itskov Y.Yu., Kolomoets E.V. UC "RUSAL". Moscow, Russian Federation.

**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, строения 5 и 7. Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования; Российская Федерация, 125993, Москва, ул. Баррикадная, 2/1.

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

Малеев В.В. Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии. Российская Федерация, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а. E-mail: [crie@pcr.ru](mailto:crie@pcr.ru).

Кутырев В.В., Щербаклова С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru).

Максютов Р.А., Пьянков О.В. Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: [vector@vector.nsc.ru](mailto:vector@vector.nsc.ru).

Keita S. Национальное агентство санитарной безопасности. Гвинейская Республика, Конакри.

Buaro M.Y. Научно-исследовательский институт прикладной биологии, Гвинейская Республика, Киндия.

Magassouba N. Национальная лаборатория геморрагических лихорадок. Гвинейская Республика, Конакри.

Ицков Я.Ю., Коломоец Е.В. Объединенная компания «РУСАЛ». Российская Федерация, Москва.

Поступила 24.09.19.

Принята к публ. 26.09.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-14-18

УДК 616.928.6+616.992.282

А.В. Липницкий, А.М. Маркин, Р.С. Суркова, Д.В. Викторов, А.В. Топорков

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГИСТОПЛАЗМОЗА

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

Гистоплазмоз – системный микоз, который распространен по всему миру. Наибольшая встречаемость болезни описана на Американском континенте, но она также отмечается в Китае, Индии, Юго-Восточной Азии, Африке, Австралии и Европе. Клинические синдромы гистоплазмоза не специфичны и у большинства иммунокомпетентных индивидуумов не проявляются или отмечаются в виде легкой гриппоподобной болезни. У иммунокомпрометированных пациентов, особенно у больных СПИДом, может развиваться тяжелая и смертельная инфекция в связи с диссеминацией возбудителя во многие органы. Этиологический агент гистоплазмоза – диморфный гриб *Histoplasma capsulatum*, который обитает в почве, контаминированной выделениями птиц или летучих мышей. Установлены три биологических варианта этого гриба: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* и *H. capsulatum* var. *farciminosum*. Генетические отличия отмечены среди штаммов из различных регионов мира. Основные молекулярные методологии для генетического типирования гриба базируются на выявлении ДНК. Они являются важным инструментом идентификации возможных источников инфекции при вспышках гистоплазмоза. Генетические профили изолятов *H. capsulatum* от летучих мышей и людей помогли установить распределение болезни в определенных эндемичных регионах. Традиционная диагностика гистоплазмоза проводится путем культурального и микроскопического исследования образцов из респираторного тракта и биологических жидкостей. Однако эти приемы дают положительные результаты только в 50 % случаев. В последние два десятилетия на основе технологии ПЦР разработаны подходы по выявлению *H. capsulatum* в клинических образцах с помощью различных молекулярных мишеней. Их использование для подтверждения диагноза может существенно сократить сроки анализа. Молекулярные методы обладают высокой специфичностью и чувствительностью, а также уменьшают риск инфицирования персонала лаборатории. В данном обзоре авторы обсудили недавно опубликованные данные об использовании основных молекулярных методов для диагностики гистоплазмоза.

**Ключевые слова:** гистоплазмоз, *Histoplasma capsulatum*, молекулярные методы, ПЦР.

Корреспондирующий автор: Липницкий Анатолий Васильевич, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Для цитирования: Липницкий А.В., Маркин А.М., Суркова Р.С., Викторов Д.В., Топорков А.В. Молекулярная диагностика гистоплазмоза. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 3:14–18. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-14-18

A.V. Lipnitsky, A.M. Markin, R.S. Surkova, D.V. Victorov, A.V. Toporkov

## Molecular Diagnostics of Histoplasmosis

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, Russian Federation

**Abstract.** Histoplasmosis is a systemic fungal disease that occurs worldwide. The highest incidence of the disease is reported on the American continent. It also occurs in China, India, South-Eastern Asia, Africa, Australia and Europe. Clinical syndromes of histoplasmosis are not specific and in most cases immunocompetent individuals are asymptomatic or present mild influenza-like disease. Immunocompromised patients especially individuals with AIDS, can develop a severe and fatal disease due to fungal dissemination to many organs. Etiological agent of histoplasmosis is the dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*, which inhabits the soils contaminated with bird or bat droppings. Three biological varieties are considered for this fungus: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* and *H. capsulatum* var. *farciminosum*. Genetic differences are observed among *H. capsulatum* strains from diverse regions of the world. The main molecular methodologies for genetic typing of fungi are based on DNA fingerprinting. They have been an important instrument to identify possible sources of infection in outbreaks of histoplasmosis. Genetic profiles of *H. capsulatum*, isolated from bats and humans, helped to understand the distribution of the disease in certain endemic regions. The conventional diagnosis of histoplasmosis is performed by means of cultural and microscopic examination of samples from the respiratory tract and biologic fluids. However, these techniques yield positive results in only 50 % of cases. In the last two decades, approaches for the detecting of *H. capsulatum* in clinical samples, using different molecular targets, based on PCR assay have been developed. Their use can shorten the time span of analysis for diagnosis confirmation. Molecular methods have high specificity and sensitivity and reduce the risk of infection for the laboratory personnel. In this study we reviewed the recently published data on the use of main molecular methods for diagnosis of histoplasmosis.

**Key words:** histoplasmosis, *Histoplasma capsulatum*, molecular methods, PCR.

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

Corresponding author: Anatoly V. Lipnitsky, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Citation: Lipnitsky A.V., Markin A.M., Surkova R.S., Victorov D.V., Toporkov A.V. Molecular Diagnostics of Histoplasmosis. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsiy* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2019; 3:14–18. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-14-18

Received 08.04.19. Revised 19.06.19. Accepted 01.07.19.

**Цель** работы – оценка молекулярных методов диагностики гистоплазмоза на основе современных данных.

Инфицированность людей в мире эндемическими микозами (гистоплазмозом, кокцидиоидомикозом, бластомикозом, паракокцидиоидомикозом) постоянно возрастает. Возбудители этих микозов – первичные патогены и, в отличие от оппортунистических грибов, вызывают заболевания не только у иммунокомпromетированных, но и у иммунокомпетентных субъектов. Общим для всех возбудителей эндемических микозов является их диморфизм, т.е. существование во внешней среде в мицелиальной, а в организме инфицированных людей и животных – в дрожжевой (тканевой, паразитической) фазе.

Гистоплазмоз – самый распространенный из эндемических микозов. Ежегодно в мире регистрируют более 500 тыс. инфицированных гистоплазмозом людей [1]. Наибольший уровень заболеваемости регистрируют в США (долины рек Огайо и Миссисипи) и в Латинской Америке [2, 3]. Эндемичные регионы выявлены в странах Азии (Индия, КНР, Таиланд) [4–8]. Недавно описаны случаи индигенного гистоплазмоза в Южной Корее [9]. Заболевание выявлено в некоторых африканских странах, преимущественно у ВИЧ-инфицированных [10, 11]. Аутохтонные случаи гистоплазмоза в Европе редки, однако зафиксированы в Испании, Италии, Германии, Турции [12, 13]. Факторы, обуславливающие определенное географическое распределение гистоплазмоза в мире, слабо изучены, но они, как правило, связаны с умеренной температурой воздуха и наличием почв, содержащих гуано летучих мышей или экскременты птиц [1]. Гистоплазмоз встречается у различных видов млекопитающих [14]. Инфицирование происходит при ингаляции спор (микроконидий). Развитие диссеминированной формы чаще происходит у субъектов с иммуносупрессией [15, 16].

На основе фенотипической характеристики род *Histoplasma* разделен на три варианта одного вида: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, *H. capsulatum* var. *duboisii* и *H. capsulatum* var. *farcinosum*. Наиболее широко распространен вариант *capsulatum*. Вариант *duboisii* ограничен тропическими зонами в Африке, а вариант *farcinosum* встречается в Европе, Северной Африке, Индии и Юго-Восточной Азии, вызывая заболевание лошадей и мулов (эпизоотический лимфангоит), но не человека [17].

**Таксономия.** С помощью методов генотипирования, таких как RFLP (restriction fragment length polymorphism), ДНК-гибридизация, RAPD (random amplified polymorphic DNA) и секвенирования ITS-1-5, 8S-ITS2 (internal transcribed spacers) выявлено значительное генетическое разнообразие изолятов *H. capsulatum*, частично связанное с географическим распространением [18]. Установлено, что *H. capsulatum* s. l. является комплексом, состоящим, по меньшей мере, из восьми клад, определенных как Австралийская, Нидерландская, Евразийская,

Северо-Американская (классы 1 и 2 – NAm1, NAm2), Латино-Американская (группы А и В – LAmA, LAmB) и Африканская. За исключением Евразийской, эти клады представляют филогенетические виды. При исследовании популяционной структуры *H. capsulatum* с применением набора разнообразных методов обнаружены еще шесть дополнительных филогенетических видов внутри клад LAmA и LAmB (LAmA1, LAmA2, LAmB1, LAmB2, RJ и BAC-1) [17]. Криптический вид BAC-1 включает только изоляты от мигрирующих видов летучих мышей [19]. Кроме того, результаты молекулярного исследования изолятов, полученных от кошек, обитающих вне известных эндемических регионов гистоплазмоза, показали, что они наиболее близки к кладе NAm1, но представляют отдельный кластер [20].

**Традиционные методы диагностики.** Традиционная диагностика гистоплазмоза включает микроскопию дрожжевых клеток гриба размером 2–4 мкм для var. *capsulatum* и 6–12 мкм – для var. *duboisii* в тканях или биологических жидкостях. Чаще клетки располагаются внутри мононуклеарных фагоцитов (макрофаги, моноциты), но могут обнаруживаться и внеклеточно. Культивирование гриба лишь в 50 % дает положительные результаты, в основном при исследовании больных с диссеминированной или хронической легочной формами гистоплазмоза [22]. Для получения и идентификации изолятов требуются длительные сроки (до четырех недель). В целях ускоренной диагностики может быть использовано выявление в биологических жидкостях (сыворотка, моча) специфического антигена (галактоманна) *H. capsulatum*, но, как правило, его обнаруживают лишь при диссеминированном гистоплазмозе [23]. Возможны ложноположительные реакции у больных другими эндемическими микозами [24]. Серологические тесты для выявления антител к *H. capsulatum* также достаточно часто сопровождаются перекрестными реакциями с некоторыми грибами (*Blastomyces* spp., *Paracoccidioides* spp., *Coccidioides* spp.) и *Mycobacterium tuberculosis* [25]. Антитела регистрируют через 4–8 недель после острой инфекции, но они могут отсутствовать у больных с иммуносупрессией, особенно у реципиентов трансплантируемых органов [26].

**Применение молекулярных методов в диагностических и эпидемиологических исследованиях.** Применение молекулярных методов является альтернативой существующих способов диагностики гистоплазмоза. Попытки повышения чувствительности и специфичности диагностических приемов в значительной степени связаны с улучшением способов выделения нуклеиновых кислот гриба. В настоящее время молекулярные методы идентификации *H. capsulatum*, в основном варианты полимеразной цепной реакции (ПЦР), играют существенную роль в диагностике, хотя во многих случаях отсутствует надежная стандартизация метода. В публикациях не всегда приводятся данные о выборе объекта ис-

следования, метода экстракции нуклеиновых кислот, мишени для амплификации. Так, L. Samraio *et al.* [27] показали, что при оценке трех методов экстракции ДНК для постановки ПЦР наилучшим оказался способ на основе коммерческих силикоmemбран.

Для исследования в ПЦР клинического материала от больных гистоплазмозом предложено несколько молекулярных мишеней [28–30]. Чаще используется уникальный фрагмент гена, кодирующего белок в 110 кДа (Hcp100). Этот белок, по-видимому, включается в процессы регуляции, необходимые для адаптации и выживаемости гриба внутри клеток макрофагов [29]. При исследовании клинических образцов чувствительность метода составила 100 %, а специфичность – 95,2 % [31]. J. Hernandez *et al.* [32] исследовали с помощью гнездовой ПЦР с праймерами, комплементарными Hcp100, образец периферической крови иммунокомпетентного пациента с синдромом глазного гистоплазмоза (ОHS). Секвенс-анализ ПЦР-продукта показал идентичность в 97 % с референтной последовательностью гена, а лечение антимикотиками привело к улучшению зрения. Кроме того, ПЦР в режиме реального времени (РТ-ПЦР) на основе Hcp100-гена успешно использована для выявления *H. capsulatum* в фиксированных формалином парафинизированных тканях от больных гистоплазмозом [33].

С праймерами, сконструированными для амплификации локуса Hcp100, C. Shell *et al.* [34] оценили возможность использования для быстрой диагностики гистоплазмоза метода LAMP (loop-mediated isothermal amplification). Чувствительность метода оценивали на образцах ДНК, экстрагированных из 91 клинического изолята гриба, а специфичность – на ДНК 50 штаммов других видов грибов и *Mycobacterium tuberculosis*. При 100 % чувствительности и специфичности метод оказался полезным для выявления ДНК гриба в моче больных. Технологию быстрой и простой изотермальной ДНК-амплификации (RCA-rolling-circle amplification) *in vitro* с использованием зондов-замков (padlock) для идентификации *H. capsulatum* применили J. Furie *et al.* [35]. Новые диагностические маркеры гистоплазмоза предложены на основе panospray tandem масс-спектрометрии. При исследовании образцов мочи больных обнаружены 52 пептида белков *H. capsulatum*, отличающиеся от контрольных образцов [36].

Для идентификации *H. capsulatum* также используют фрагмент в 220 п.н. (1281-1283<sub>(220)</sub>). Его специфичность подтверждена Саузерн-блот гибридизацией. С мишенью 1281-1283<sub>(220)</sub> разработана ПЦР, апробированная на образцах из внешней среды и от больных [28]. M. Vuitrago *et al.* [37] разработали вариант количественной РТ-ПЦР (RT-qPCR) на основе ITS1-региона рДНК. По их данным, вариант qPCR превосходил гнездовую ПЦР с Hcp100 и классическую с 1281-1283<sub>(220)</sub>. Тем не менее авторы полагают, что для лабораторий с небольшими финансовыми ресурсами более рациональным явля-

ется применение гнездовой и классической ПЦР. M. Frias-de-Leon *et al.* [25] применили ПЦР на основе мишеней Hcp100 и 1281-1283<sub>(220)</sub> при вспышках гистоплазмоза. Семь клинических образцов исследованы также с помощью твердофазного иммуноферментного анализа – enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Антитела к *H. capsulatum* выявлены в ELISA во всех образцах и в шести из них амплифицированы целевые регионы Hcp100 и 1281-1283<sub>(220)</sub> *H. capsulatum*. Из 14 образцов проб почвы только в одном обнаружены генетические мишени (Hcp100 и 1281-1283<sub>(220)</sub>). Из этого же образца получена культура гриба. По результатам секвенирования ПЦР-продуктов определено сходство 95–98 и 98–100 % с референтными последовательностями GenBank для Hcp100 и 1281-1283<sub>(220)</sub> соответственно. Оба маркера оказались эффективными для изучения вспышек гистоплазмоза, поскольку идентифицировали патоген как в клинических, так и в природных образцах. При этом диагноз у подавляющего большинства пациентов установлен раньше, чем с помощью ELISA. Однако концентрация ДНК патогена в сыворотках больных даже с высоким титром антител была недостаточной для амплификации [27]. По данным N. Elias *et al.* [38], с помощью мультиплексной ПЦР удалось точно идентифицировать 51 штамм *H. capsulatum* var. *capsulatum*, выделенный из клинических образцов и почвы. Этот вариант ПЦР разработан с использованием комбинации двух пар праймеров, одна из которых была специфичной для *Histoplasma* (Hc1-Hc2), а другая – универсальной для большинства видов патогенных грибов (ITS1-ITS4). Успешная амплификация обоих регионов свидетельствовала о положительном результате, тогда как невозможность амплификации ДНК-мишени в ПЦР с праймерами Hc1-Hc2 при успешной амплификации региона ITS1-ITS4 даже с изолятами близкородственных грибов (в частности, возбудителем паракокцидиоидоза *Paracoccidioides brasiliensis*) указывает на высокую специфичность метода. Возможность использования ITS-региона в качестве специфичной для диагностики гистоплазмоза мишени показана S. Simon *et al.* [39] в РТ-ПЦР с зондом TaqMan. При исследовании 348 образцов от больных гистоплазмозом они определили клиническую чувствительность метода в 95,4 %, а специфичность – в 96 %.

Молекулярными маркерами, используемыми для идентификации *H. capsulatum*, являются также гены специфических М- и Н-антигенов [40]. H. Ohno *et al.* [41] использовали гнездовую ПЦР, основанную на амплификации фрагмента гена М-антигена, при обследовании семи пациентов с подозрением на гистоплазмоз, у пяти диагноз подтвердился.

Новые варианты ПЦР для диагностики гистоплазмоза основаны на выявлении гена, кодирующего N-acetylated- $\alpha$ -linked acidic dipeptidase (NAALAD-аза), присутствующую в сыворотках больных. Секвенирование гена NAALAD-азы выявило высокую степень его консервативности у различных

штаммов гриба (сходство 98,2–100 %) при низкой общности со штаммами генетически родственных грибов, в том числе *Blastomyces dermatitidis* (сходство 85,3 %). РТ-ПЦР со специфическими праймерами (HcN2F/HcN1R) была высокоспецифичной и обладала значительной чувствительностью (10 копий ДНК на реакцию). Для повышения клинической чувствительности разработана гнездовая РТ-ПЦР с дополнительной парой праймеров (HcN4F/HcN4R) [42].

Молекулярная диагностика гистоплазмоза является инструментом для установления границ эндемичных регионов и характеристики штаммов внутри них. Так, по данным М. Muniz *et al.* [43], изоляты *H. capsulatum* из штата Рио-де-Жанейро (Бразилия) группировались в три больших кластера, которые генетически отличались от штаммов из других штатов Бразилии, стран Латинской Америки, Африки и Азии. Исследование вспышки гистоплазмоза в Мексике, связанной с выемкой грунта, показало, что, по данным RAPD-ПЦР, штаммы имеют профиль, соответствующий высоковирулентному референтному штамму E-53, преобладающему в Мексике [44]. Генетический полиморфизм изолятов *H. capsulatum* от летучих мышей и людей помогает установить определенные эндемические регионы гистоплазмоза [45].

Таким образом, представленные материалы свидетельствуют о том, что схема лабораторной диагностики гистоплазмоза может значительно измениться при внедрении технологии молекулярной идентификации изолятов *H. capsulatum*. Стратегия сравнительного секвенирования является новым «золотым стандартом» идентификации возбудителей многих микозов [46]. Этот метод базируется на ПЦР-амплификации выбранного региона геномной ДНК с последующим секвенированием полученных ампликонов. Успех в использовании этой стратегии в значительной степени зависит от наличия надежных данных, представленных в базах данных нуклеотидных последовательностей, результатов секвенирования референтных и других изолятов исследуемого вида и близкородственных микромицетов.

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

### References / Список литературы

1. Wheat L.J., Azar M.M., Bahr N.C., Spec A., Relich R.F., Hage C. Histoplasmosis. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 2016; 30(1):207–27. DOI: 10.1016/j.idc.2015.10.009.
2. Negroni R. Histoplasmosis en América Latina. *Biomédica: revista del Instituto Nacional de Salud.* 2011; 31(3):301–4. DOI: 10.7705/biomedica.v31i3.597.
3. Colombo A.L., Tobón A., Restrepo A., Queiroz-Telles F., Nucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med. Mycol.* 2011; 49(8):785–98. DOI: 10.3109/13693786.2011.577821.
4. Gopalakrishnan R., Nambi P.S., Ramasubramanian V., Ghafur A., Parameswaran A. Histoplasmosis in India: truly uncommon or uncommonly recognized? *J. Assoc. Physicians India.* 2012; 60:25–8. PMID: 23777021.
5. Pan B., Chen M., Pan W., Liao W. Histoplasmosis: a new endemic fungal infection in China? Review and analysis of cases. *Mycoses.* 2013; 56(3):212–21. DOI: 10.1111/myc.12029.
6. Norkaew T., Ohno H., Sriburee P., Tanabe K., Tharavichitkul P., Takarn P., Puengchan T., Bumrungrisi S., Miyazaki Y. Detection of

environmental sources of *Histoplasma capsulatum* in Chiang Mai, Thailand, by nested PCR. *Mycopathologia.* 2013; 176(5–6):395–402. DOI: 10.1007/s11046-013-9701-9.

7. Wang Y., Pan B., Wu J., Bi X., Liao W., Pan W., Gu J. Detection and phylogenetic characterization of a case of *Histoplasma capsulatum* Infection in mainland China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2014; 90(6):1180–3. DOI: 10.4269/ajtmh.14-0048.

8. De D., Nath U.K. Disseminated histoplasmosis in immunocompetent individuals – not a so rare entity, in India. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2015; 7(1):e2015028. DOI: 10.4084/MJHID.2015.028.

9. Jung E.J., Park D.W., Choi J.W., Choi W.S. Chronic cavitary pulmonary histoplasmosis in a non-HIV and immunocompromised patient without overseas travel history. *Yonsei Med. J.* 2015; 56(3):871–4. DOI: 10.3349/ymj.2015.56.3.871.

10. Lofgren S.M., Kirsch E.J., Maro V.P., Morrissey A.B., Msuya L.J., Kinabo G.D., Saganda W., Diefenthal H.C., Ramadhani H.O., Wheat L.J., Crump J.A. Histoplasmosis among hospitalized febrile patients in northern Tanzania. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2012; 106(8):504–7. DOI: 10.1016/j.trstmh.2012.05.009.

11. Cottle L.E., Gkrania-Klotsas E., Williams H.J., Brindle H.E., Carmichael A.J., Fry G., Beeching N.J. A multinational outbreak of histoplasmosis following a biology field trip in the Ugandan rainforest. *J. Travel. Med.* 2013; 20(2):83–7. DOI: 10.1111/jtm.12012.

12. Ashbee H.R., Evans E.G., Viviani M.A., Dupont B., Chrystanthou E., Surmont I., Tomsikova A., Vachkov P., Enero B., Zala J., Tintelnot K., The ECMM Working Group on Histoplasmosis. Histoplasmosis in Europe: report on an epidemiological survey from the European Confederation of Medical Mycology Working Group. *Med. Mycol.* 2008; 46(1):57–65. DOI: 10.1080/13693780701591481.

13. Rodriguez-Tudela J.L., Alastruey-Izquierdo A., Gago S., Cuenca-Estrella M., León C., Miro J.M., Nuñez Boluda A., Ruiz Camps I., Sole A., Denning D.W., The University of Manchester in association with the LIFE program. Burden of serious fungal infection in Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* 2015; 21(2):183–9. DOI: 10.1016/j.cmi.2014.07.013.

14. Damasceno L.S., Leitão T.M., Taylor M.L., Muniz M.M., Zancopé-Oliveira R.M. The use of genetic markers in the molecular epidemiology of histoplasmosis: a systematic review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2016; 35(1):19–27. DOI: 10.1007/s10096-015-2508-5.

15. Knox K.S., Hage C.A. Histoplasmosis. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2010; 7(3):169–72. DOI: 10.1513/pats.200907-069AL.

16. Horwath M.C., Fecher R.A., Deepe G.S. Jr. *Histoplasma capsulatum*, lung infection and immunity. *Future Microbiol.* 2015; 10(6):967–75. DOI: 10.2217/fmb.15.25.

17. de M. Teixeira M., Patané J.S., Taylor M.L., Gómez B.L., Theodoro R.C., de Hoog S., Engelthaler D.M., Zancopé-Oliveira R.M., Felipe M.S., Barker B.M. Worldwide phylogenetic distributions and population dynamics of the genus *Histoplasma*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(6):e0004732. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004732.

18. Vite-Garin T., Estrada-Bárceñas D.A., Cifuentes J., Taylor M.L. The importance of molecular analysis for understanding the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum*: an overview. *Rev. Iberoam. Micol.* 2014; 31(1):11–5. DOI: 10.1016/j.riam.2013.09.013.

19. Taylor M.L., Hernández-García L., Estrada-Bárceñas D., Salas-Lizana R., Zancopé-Oliveira R.M., de la Cruz G.S., Galvão-Dias M.A., Curriel-Quesada E., Canteros C.E., Bojórquez-Torres G., Bogard-Fuentes C.A., Zamora-Tehozol E. Genetic diversity of *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats randomly captured in Mexico, Brazil and Argentina, using the polymorphism of (GA)<sub>n</sub> microsatellite and its flanking regions. *Fungal Biol.* 2012; 116(2):308–17. DOI: 10.1016/j.funbio.2011.12.004.

20. Arunmozhi Balajee S., Hurst S.F., Chang L.S., Miles M., Beeler E., Hale C., Kasuga T., Benedict K., Chiller T., Lindsley M.D. Multilocus sequence typing of *Histoplasma capsulatum* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from cats living in non-endemic regions reveals a new phylogenetic clade. *Med. Mycol.* 2013; 51(4):345–51. DOI: 10.3109/13693786.2012.733430.

21. Eisenberg T., Seeger H., Kasuga T., Eskens U., Sauerwald C., Kaim U. Detection and characterization of *Histoplasma capsulatum* in a German badger (*Meles meles*) by ITS-sequencing and multilocus sequencing analysis. *Med. Mycol.* 2013; 51(4):337–44. DOI: 10.3109/13693786.2012.723831.

22. Hage C.A., Ribes J.A., Wengenack N.L., Baddour L.M., Assi M., McKinsey D.S., Hammoud K., Alapat D., Babady N.E., Parker M., Fuller D., Noor A., Davis T.E., Rodgers M., Connolly P.A., El Haddad B., Wheat L.J. A multicenter evaluation of tests for diagnosis of histoplasmosis. *Clin. Infect. Dis.* 2011; 53(5):448–54. DOI: 10.1093/cid/cir435.

23. Hage C.A., Davis T.E., Fuller D., Egan L., Witt J.R. 3rd, Wheat L.J., Knox K.S. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection in BAL fluid. *Chest.* 2010; 137(3):623–8. DOI: 10.1378/chest.09-1702.

24. Durkin M., Connolly P., Kuberski T., Myers R., Kuback B.M., Bruckner D., Pegues D., Wheat L.J. Diagnosis of coccid-

- oidomycosis with use of the Coccidioides antigen enzyme immunoassay. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 47(8):e69–73. DOI: 10.1086/592073.
25. Frías-De-León M.G., Ramírez-Bárceñas J.A., Rodríguez-Arellanes G., Velasco-Castrejón O., Taylor M.L., Reyes-Montes M.D.R. Usefulness of molecular markers in the diagnosis of occupational and recreational histoplasmosis outbreaks. *Folia Microbiol. (Praha)*. 2017; 62(2):111–6. DOI: 10.1007/s12223-016-0477-4.
26. Assi M., Martin S., Wheat L.J., Hage C., Freifeld A., Avery R., Baddley J.W., Vergidis P., Miller R., Andes D., Young J.A., Hammoud K., Huprikar S., McKinsey D., Myint T., Garcia-Diaz J., Esguerra E., Kwak E.J., Morris M., Mullane K.M., Prakash V., Burdette S.D., Sandid M., Dickter J., Ostrander D., Antoun S.A., Kaul D.R. Histoplasmosis after solid organ transplant. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 57(11):1542–9. DOI: 10.1093/cid/cit593.
27. Sampaio Ide L., Freire A.K., Ogusko M.M., Salem J.I., De Souza J.V. Selection and optimization of PCR-based methods for the detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. *Rev. Iberoam. Micol.* 2012; 29(1):34–9. DOI: 10.1016/j.riam.2011.03.008.
28. Frías De León M.G., Arenas López G., Taylor M.L., Acosta Altamirano G., Reyes-Montes Mdel R. Development of specific sequence-characterized amplified region markers for detecting *Histoplasma capsulatum* in clinical and environmental samples. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(3):673–9. DOI: 10.1128/JCM.05271-11.
29. Dantas K.C., Freitas R.S., Moreira A.P., Silva M.V., Benard G., Vasconcelos C., Criado P.R. The use of nested Polymerase Chain Reaction (nested PCR) for the early diagnosis of *Histoplasma capsulatum* infection in serum and whole blood of HIV-positive patients. *An. Bras. Dermatol.* 2013; 88(1):141–3. DOI: 10.1590/s0365-05962013000100025.
30. Gago S., Esteban C., Valero C., Zaragoza Ó., Puig de la Bellacasa J., Buitrago M.J. A multiplex real-time PCR for identification of *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* in samples from AIDS patients with opportunistic pneumonia. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(4):1168–76. DOI: 10.1128/JCM.02895-13.
31. Muñoz C., Gómez B.L., Tobón A., Arango K., Restrepo A., Correa M.M., Muskus C., Cano L.E., González A. Validation and clinical application of a molecular method for identification of *Histoplasma capsulatum* in human specimens in Colombia, South America. *Clin. Vaccine. Immunol.* 2010; 17(1):62–7. DOI: 10.1128/CVI.00332-09.
32. Hernández J.M., Muñoz-Cadavid C.O., Hernández D.L., Montoya C., González A. Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in peripheral blood from a patient with ocular histoplasmosis syndrome. *Med. Mycol.* 2012; 50(2):202–6. DOI: 10.3109/13693786.2011.593050.
33. Koepsell S.A., Hinrichs S.H., Iwen P.C. Applying a real-time PCR assay for *Histoplasma capsulatum* to clinically relevant formalin-fixed paraffin-embedded human tissue. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(10):3395–7. DOI: 10.1128/JCM.01705-12.
34. Scheel C.M., Zhou Y., Theodoro R.C., Abrams B., Balajee S.A., Litvintseva A.P. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(2):483–8. DOI: 10.1128/JCM.02739-13.
35. Furuie J.L., Sun J., do Nascimento M.M., Gomes R.R., Waculicz-Andrade C.E., Sessegolo G.C., Rodrigues A.M., Galvão-Dias M.A., de Camargo Z.P., Queiroz-Telles F., Najafzadeh M.J., de Hoog S.G., Vicente V.A. Molecular identification of *Histoplasma capsulatum* using rolling circle amplification. *Mycoses.* 2016; 59(1):12–9. DOI: 10.1111/myc.12426.
36. Crockett D.K., Kushnir M.M., Cloud J.L., Ashwood E.R., Rockwood A.L. Identification of histoplasma-specific peptides in human urine. *Int. J. Pept.* 2012; 2012:621329. DOI: 10.1155/2012/621329.
37. Buitrago M.J., Canteros C.E., Frías De León G., González A., Marques-Evangelista De Oliveira M., Muñoz C.O., Ramirez J.A., Toranzo A.L., Zancope-Oliveira R., Cuenca-Estrella M. Comparison of PCR protocols for detecting *Histoplasma capsulatum* DNA through a multicenter study. *Rev. Iberoam. Micol.* 2013; 30(4):256–60. DOI: 10.1016/j.riam.2013.03.004.
38. Elias N.A., Cuestas M.L., Sandoval M., Poblete G., Lopez-Daneri G., Jewtuchowicz V., Iovannitti C., Mujica M.T. Rapid identification of *Histoplasma capsulatum* directly from cultures by multiplex PCR. *Mycopathologia.* 2012; 174(5–6):451–56. DOI: 10.1007/s11046-012-9567-2.
39. Simon S., Veron V., Boukhari R., Blanchet D., Aznar C. Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human samples by real-time polymerase chain reaction. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2010; 66(3): 268–73. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2009.10.010.
40. Holbrook E.D., Edwards J.A., Youseff B.H., Rappleye C.A. Definition of the extracellular proteome of pathogenic-phase *Histoplasma capsulatum*. *J. Proteome Res.* 2011; 10(4):1929–43. DOI: 10.1021/pr1011697.
41. Ohno H., Tanabe K., Umeyama T., Kaneko Y., Yamagoe S., Miyazaki Y. Application of nested PCR for diagnosis of histoplasmosis. *J. Infect. Chemother.* 2013; 19(5):999–1003. DOI: 10.1007/s10156-013-0548-2.
42. Muraosa Y., Toyotome T., Yahiro M., Watanabe A., Shikanai-Yasuda M.A., Kamei K. Detection of *Histoplasma capsulatum* from clinical specimens by cycling probe-based real-time PCR and nested real-time PCR. *Med. Mycol.* 2016; 54(4):433–8. DOI: 10.1093/mmy/myv106.
43. Muniz Mde M., Morais E., Silva Tavares P., Meyer W., Nosanchuk J.D., Zancope-Oliveira R.M. Comparison of different DNA-based methods for molecular typing of *Histoplasma capsulatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010; 76(13):4438–47. DOI: 10.1128/AEM.02004-09.
44. Muñoz B., Martínez M.A., Palma G., Ramírez A., Frías M.G., Reyes M.R., Taylor M.L., Higuera A.L., Corcho A., Manjarrez M.E. Molecular characterization of *Histoplasma capsulatum* isolated from an outbreak in treasure hunters. *BMC Infect. Dis.* 2010; 10:264. DOI: 10.1186/1471-2334-10-264.
45. Reyes-Montes M.R., Rodríguez-Arellanes G., Pérez-Torres A., Rosas-Rosas A.G., Parás-García A., Juan-Sallés C., Taylor M.L. Identification of the source of histoplasmosis infection in two captive maras (*Dolichotis patagonum*) from the same colony by using molecular and immunologic assays. *Rev. Argent. Microbiol.* 2009; 41(2):102–4. PMID: 19623900.
46. Balajee S.A., Borman A.M., Brandt M.E., Cano J., Cuenca-Estrella M., Dannaoui E., Guarro J., Haase G., Kibbler C.C., Meyer W., O'Donnell K., Petti C.A., Rodriguez-Tudela J.L., Sutton D., Velegraiki A., Wickes B.L. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Mucorales* species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(4):877–84. DOI: 10.1128/JCM.01685-08.

**Authors:**

Lipnitsky A.V., Markin A.M., Surkova R.S., Victorov D.V., Toporkov A.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

**Об авторах:**

Липницкий А.В., Маркин А.М., Суркова Р.С., Викторов Д.В., Топорков А.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Поступила 08.04.19.

Отправлена на доработку 19.06.19.

Принята к публ. 01.07.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-19-25

УДК 616.932:579.61

Н.А. Плеханов, С.П. Заднова, А.А. Крицкий

**БИОПЛЕНКА *VIBRIO CHOLERAE*: МЕХАНИЗМЫ, РЕГУЛИРУЮЩИЕ ОБРАЗОВАНИЕ, И СИГНАЛЫ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ, СПОСОБСТВУЮЩИЕ ЕЕ ФОРМИРОВАНИЮ**

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

В настоящее время общепризнанным является факт, что способность возбудителя холеры формировать биопленку повышает его выживаемость и сохранение как во внешней среде, так и в макроорганизме. В ассоциированном состоянии клетки *V. cholerae* лучше защищены от действия целого ряда стрессовых факторов, более эффективно потребляют питательные вещества и обмениваются генетической информацией. Процесс образования биопленки холерным вибрионом изучен достаточно детально. Однако, учитывая важную роль данной структуры в жизненном цикле *V. cholerae*, исследователи, используя современные методы анализа, получают новые данные или уточняют ранее полученные сведения о лежащих в основе этого процесса молекулярных механизмах. При этом особое внимание уделяется изучению регуляторных механизмов образования биопленки штаммами *V. cholerae*, а также сигналам внешней среды, являющимся триггером при ее формировании. В данном обзоре приведены ранее полученные сведения, а также новые данные о регуляторной сети *V. cholerae*, контролирующей процесс образования биопленки, включающей транскрипционные активаторы, репрессоры, альтернативные сигма-факторы, регуляторные РНК и ряд сигнальных молекул. Отмечено также участие регуляторных механизмов при формировании биопленки в макроорганизме. Представлены данные о сигналах внешней среды (наличие питательных веществ (углеводов), желчи, неорганических веществ, изменение осмолярности среды), стимулирующих/подавляющих ее формирование. Учитывая решающую роль экзополисахарида в процессе образования зрелой биопленки, а также важную роль сигнальных молекул системы Quorum Sensing и 3'-5'-циклического дигуанилатмонофосфата в данном процессе, особое внимание уделено рассмотрению механизмов биосинтеза экзополисахарида и действию указанных сигнальных молекул.

**Ключевые слова:** *Vibrio cholerae*, биопленка, 3'-5'-циклический дигуанилатмонофосфат, Quorum-Sensing.

Корреспондирующий автор: Плеханов Никита Александрович, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Плеханов Н.А., Заднова С.П., Крицкий А.А. Биопленка *Vibrio cholerae*: механизмы, регулирующие образование, и сигналы внешней среды, способствующие ее формированию. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 3:19–25. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-19-25

N.A. Plekhanov, S.P. Zadnova, A.A. Kritsky

***Vibrio cholerae* Biofilm: Mechanisms, Regulating Formation and Signals of External Environment, Factoring Its Production**

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

**Abstract.** Currently it is a common knowledge that the ability of cholera agent to form biofilm increases the survival rate and persistence both in external environment and macroorganism. *V. cholerae* cells in associated state are better protected from the effect of a range of factors, more effectively consume nutrient substances and exchange genetic information. The process of biofilm formation by cholera vibrio is investigated in sufficient detail. However, taking into consideration the significant role of this structure in the life cycle of *V. cholerae*, researchers obtain new data and clarify earlier gathered information on the molecular mechanisms that lie at the bottom of this process, using advanced analytical methods. Herewith, close attention is paid to studies of regulatory mechanisms of biofilm formation, as well as external environment signals that trigger it. This review presents previously obtained data and new information on *V. cholerae* regulatory network, controlling the process of biofilm formation, including transcriptional activators, repressors, alternative sigma-factors, regulatory RNA, and a range of signal molecules. The role of regulatory mechanisms in biofilm formation inside a macroorganism is also considered in the paper. Given are the data on external environment signals (availability of nutrient substances (carbohydrates), bile, non-organic substances; change in osmolarity of the media), stimulating/suppressing its formation. Taking into account the critical role of exopolysaccharide in mature biofilm formation, as well as significant role of signal molecules of Quorum Sensing system and 3'-5'-cyclic diguanylate monophosphate in the process, a particular attention is drawn to mechanisms of exopolysaccharide biosynthesis and effect of the mentioned molecules.

**Key words:** *Vibrio cholerae*, biofilm, 3'-5'-cyclic diguanylate monophosphate, Quorum-Sensing.

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

Corresponding author: Nikita A. Plekhanov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Plekhanov N.A., Zadnova S.P., Kritsky A.A. *Vibrio cholerae* Biofilm: Mechanisms, Regulating Formation and Signals of External Environment, Factoring Its Production. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 3:19–25. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-19-25

Received 15.01.19. Revised 30.01.19. Accepted 31.01.19.

В конце XIX в. Роберт Кох, Луи Пастер и другие ученые положили начало работе с чистыми культу-

рами микроорганизмов. После этого исследователи описывали свойства различных бактерий, находя-

щихся в планктонной, свободноплавающей форме. Однако в настоящее время доказано, что в естественных условиях подавляющее большинство микроорганизмов существует не в виде свободноживущих клеток, а в составе различных ассоциаций, в том числе биопленок – сложных, высокоорганизованных структур, состоящих из микробных клеток, прикрепленных к поверхности, погруженных в общий полимерный матрикс и отличающихся по экспрессии специфических генов [1]. Не является исключением и *Vibrio cholerae*, образующая биопленку при нахождении как в открытых водоемах, так и в кишечнике человека. Доказано, что агрегированными в составе биопленки холерные вибрионы выходят из макроорганизма во внешнюю среду (стул больных содержит не планктонные, а биопленочные формы) [2]. Попадая в открытые водоемы, штаммы *V. cholerae* также образуют биопленку. Показано, что на эндемичной территории токсигенные штаммы холерных вибрионов могут обнаруживаться в свободноплавающей форме во время эпидемий. Однако в межэпидемический период сохраняются и выделяются только в составе биопленок [3]. Несмотря на то, что роль биопленок в инфекционном процессе до сих пор изучается, установлено, что инфекционность биопленочных форм холерного вибриона, содержащих большое количество бактерий, намного выше, чем планктонных клеток [4].

Биопленка выполняет защитную роль, предохраняя клетки холерного вибриона от действия различных стрессовых факторов (высокая концентрация ионов Na<sup>+</sup>, влияние антибиотиков и дезинфицирующих средств), а также уничтожения простейшими [5, 6]. Кроме того, в составе биопленки у клеток *V. cholerae* более эффективно происходит потребление питательных веществ, а в образованных на хитиновых поверхностях биопленках активируются процессы горизонтального переноса генов [7, 8].

Биопленка холерного вибриона изучена достаточно детально. Описаны этапы ее образования, структура отдельных компонентов, пространственная организация, исследуются сигналы внешней среды, являющиеся триггером для прикрепления бактерий к поверхности и формирования монослоя, а также определены структурные и регуляторные гены, необходимые для развития зрелой трехмерной формы [9–11]. Однако интерес к изучению биопленок *V. cholerae* не ослабевает. Исследователи, используя современные методы анализа, получают новые данные или уточняют ранее полученные сведения о молекулярных механизмах образования биопленки. Активно развивается направление по поиску веществ, способных ингибировать ее формирование, что способно предотвратить широкое распространение возбудителя [12, 13]. В одном обзоре невозможно представить все имеющиеся данные, касающиеся образования биопленки возбудителем холеры, мы акцентировали внимание на регуляторных механизмах, контролирующих ее формирование, и сигналах внешней среды, индуцирующих этот процесс.

**Механизмы, регулирующие формирование биопленки.** Регуляторная сеть, контролирующая формирование биопленки, включает ряд транскрипционных активаторов (VpsR, VpsT, AphA), репрессоры HapR и H-NS, альтернативные сигма-факторы (RpoN, RpoS, RpoE), небольшие регуляторные РНК, а также сигнальные молекулы (рис. 1) [14]. Предполагается, что ключевая роль в регуляции процесса образования биопленки штаммами *V. cholerae* принадлежит сигнальным молекулам системы Quorum Sensing (QS), а также 3'-5'-циклическому дигуанилатмонофосфату (с-di-GMP). QS-система и с-di-GMP контролируют транскрипцию генов, необходимых для биосинтеза экзополисахарида – основного компонента матрикса биопленки.

Циклический di-GMP является одной из важных сигнальных молекул, контролирующей переход не только холерного вибриона, но и других видов бактерий от свободноплавающего состояния к образованию биопленки; с-di-GMP синтезируется в клетках из двух молекул гуанозинтрифосфата при участии фермента дигуанилатциклазы, а расщепляется под действием фосфодиэстеразы. В геноме *V. cholerae* обнаружено 62 гена, кодирующих белки, обладающие дигуанилатциклазной или фосфодиэстеразной активностью, что свидетельствует о разнообразной роли с-di-GMP как вторичного мессенджера [15, 16]. Он необходим практически для каждого этапа образования биопленки – влияет на подвижность вибрионов, адгезию к субстрату, секрецию защитного экзополисахаридного матрикса.

Экспериментально доказано, что высокие внутриклеточные концентрации с-di-GMP ингибируют продукцию и сборку жгутика холерного вибриона, а также снижают подвижность бактерий [15].

Как известно, прикрепление *V. cholerae* к субстрату при образовании биопленки происходит при участии маннозочувствительных гемагглютиниру-

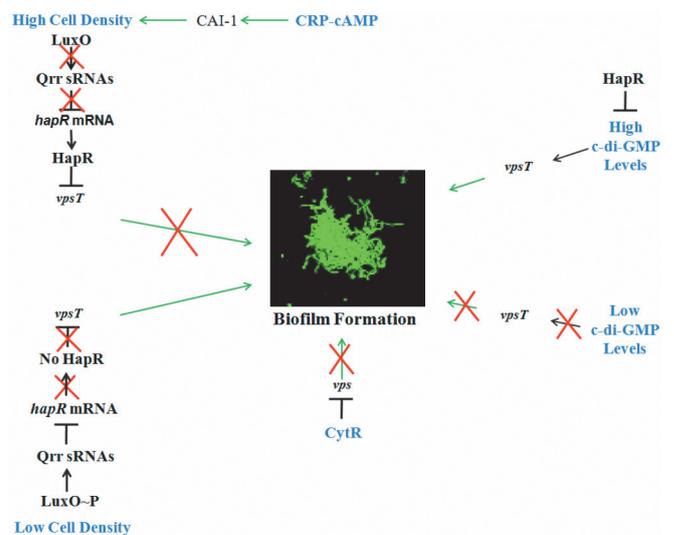


Рис. 1. Регуляция формирования биопленки у холерного вибриона [14]

Fig. 1. Regulation of biofilm formation in cholera vibrio [14]

ющих пилей адгезии (MSHA). MSHA пили имеют субъединичное строение и состоят из белка MshA, кодируемого геном *mshA* [17]. В процессе их полимеризации и сборки участвует белок MshE, обладающий АТФ-азной активностью. В исследованиях K.G. Roelofs *et al.* показано, что c-di-GMP связывается с белком MshE и активирует его экспрессию. Штаммы *V. cholerae* O1 серогруппы, утратившие *mshE*, теряют способность к адгезии и образованию биопленки [18]. Таким образом, c-di-GMP-опосредованный синтез MSHA пилей является одним из ключевых этапов формирования биопленки, интенсивность протекания которого зависит от концентрации данного вторичного мессенджера.

Производство основного компонента биопленки – экзополисахарида, содержание которого может составлять 85 % от всего объема биопленки, обеспечивается работой генов *vps* (30,7 т.п.н.) (от англ. *Vibrio polysaccharide synthesis*), которые расположены на большой хромосоме в двух кластерах – *vpsI* (*vpsA-K*) и *vpsII* (*vpsL-Q*) (рис. 2). По выполняемым функциям данные гены разделены на шесть классов. Первый класс генов (*vpsA* и *vpsB*) отвечает за биосинтез структурных молекул-предшественников, необходимых для продукции полисахаридов; второй (*vpsD*, *vpsI*, *vpsK* и *vpsL*) – кодирует ферменты, относящиеся к гликозилтрансферазам, которые катализируют перенос остатков сахаров к акцепторным молекулам, образуя гликозидные связи; гены третьего класса (*vpsE*, *vpsH*, *vpsN*, *vpsO*) обеспечивают полимеризацию и экспорт экзополисахарида; четвертого (*vpsC* и *vpsG*) – кодируют ацетилтрансферазу, переносящую ацетильные группы к молекулам полисахарида; пятого (*vpsU*) – фосфотирозин протеинфосфатазу, элиминирующую фосфатную группу у тирозин-фосфорилированных белков. В шестой класс объединены гены (*vpsF*, *vpsJ*, *vpsM*, *vpsP*, *vpsQ*), функциональная роль которых пока не выяснена, но известно, что мутации в *vpsF*, *vpsJ*, *vpsM* приводят к утрате продукции штаммом *V. cholerae* экзополисахарида [19]. Необходимо отметить, что мутации в любом гене *vps* кластера снижают способность вибрионов формировать биопленку [10, 20, 21].

Между кластерами *vpsI* и *vpsII* находятся пять *rbmA-F* генов (от англ. *rugosity and biofilm structure modulators*), необходимых для формирования и поддержания сложной архитектуры биопленки (рис. 2). Секретируемый белок RbmA, кодируемый первым геном, выполняет одновременно структурную и регуляторную функции, участвует в стабилизации

структуры биопленки, а также контролирует содержание в клетке c-di-GMP. Потеря RbmA приводит к тому, что биопленка становится хрупкой и легко растворяется при обработке детергентами [22].

Экспрессию генов *vps* контролируют два регуляторных белка – VpsR и VpsT (от англ. *Vibrio polysaccharide*), которые гомологичны белкам двухкомпонентных регуляторных систем [20, 23]. При этом VpsR непосредственно активирует экспрессию генов биосинтеза экзополисахарида, а также генов, кодирующих белки матрикса биопленки. Кроме того, данный белок контролирует продукцию белка AphA, который является важным регулятором биосинтеза факторов вирулентности (холерного токсина и токсин-корегулируемых пилей адгезии), а также активирует экспрессию VpsT [24].

Экспериментально доказано, что c-di-GMP способен образовывать комплекс с белком VpsR (константа связывания = 1,6 μM) [25]. Возможно, связывание с c-di-GMP облегчает взаимодействие VpsR с РНК-полимеразой или индуцирует конформационные изменения, способствующие активации транскрипции [26]. Таким образом, c-di-GMP регулирует продукцию экзополисахаридного матрикса, влияя на транскрипцию регуляторных генов *vpsR* и *vpsT*.

Не менее важную роль в регуляции формирования биопленки играет система QS, работа которой зависит от продукции, секреции и детекции определенных сигнальных молекул – аутоиндукторов (AI), позволяющих синхронизировать поведение клеток в популяции [27]. Как правило, бактерии синтезируют сразу несколько видов AI. Часть из них используется для межвидовой коммуникации, остальные – для регуляции внутри популяции [28]. У штаммов *V. cholerae* хорошо изучены два вида аутоиндукторов: CAI-1 – (S)-3-гидрокситридекан-4-он) и AI-2 – (2S,4S)-2-метил-2,3,3,4-тетрагидрокситетрагидрофуран-борат [29, 30]. Однако некоторые исследователи предполагают существование дополнительных систем [29, 31].

При низкой плотности микробной популяции (т.е. при низкой концентрации секретируемых AI) периплазматические рецепторы к AI CqsS и LuxP/Q работают как киназы, фосфорилируя белок LuxU, который затем передает фосфатную группу белку LuxO, активируя его. Фосфорилированный LuxO~P совместно с сигма-фактором σ<sup>54</sup> (продуктом регуляторного гена *rpoN*) активируют экспрессию четырех некодирующих РНК или QrrsRNAs (от англ. Quorum Regulatory small RNA), имеющих сложную струк-

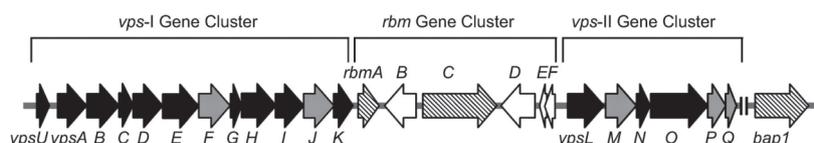


Рис. 2. Организация кластеров генов, участвующих в биосинтезе экзополисахарида *V. cholerae*, и белков матрикса биопленки [19]

Fig. 2. Structural arrangement of gene clusters participating in biosynthesis of *V. cholerae* exopolysaccharide and matrix proteins of biofilm [19]

туру и специфичных для рода *Vibrio*. QrrsRNAs, образуя комплекс с белком-шапероном Hfq, дестабилизируют матричную РНК, кодирующую основной QS-регулятор – белок HarR [32]. В результате HarR не синтезируется, в то же время продуцируются факторы вирулентности (холерный токсин и токсин-корректируемые пили адгезии), а также повышается биосинтез экзополисахарида, необходимого для формирования зрелой биопленки (рис. 1).

При увеличении популяции холерного вибриона происходит накопление CAI-1, LuxO не фосфорилируется и не активирует транскрипцию QrrsRNAs. Продукция факторов патогенности прекращается. Синтезируемый белок HarR подавляет продукцию экзополисахарида, но в то же время происходит активация глобального стрессового регулятора *proS*. Клетки в составе зрелой биопленки переходят в стационарное состояние и характеризуются высоким уровнем экспрессии генов факторов адаптации. В кишечнике человека биосинтез HarR стимулирует продукцию растворимой гемагглютинин/протеазы (HAR), которая способствует откреплению холерного вибриона от эпителиоцитов кишечника и выходу во внешнюю среду.

Несмотря на то, что все известные на сегодняшний день гены-мишени, регулируемые системой QS, связаны с HarR, некоторые вирулентные штаммы (референс-штамм *V. cholerae* N16961 биовара Эль Тор, *V. cholerae* O395 классического биовара), имея мутацию в гене *hapR*, способны формировать биопленку [33]. Вероятно, существуют альтернативные механизмы регуляции вирулентности и формирования биопленки в зависимости от плотности клеточной популяции даже при отсутствии регулятора HarR. Необходимо отметить, что кроме HarR существует и другой негативный регулятор формирования биопленки, а также генов вирулентности – нуклеотид-ассоциированный белок H-NS (от англ. Histone-like nucleoid structuring protein). Показано, что данный белок подавляет экспрессию генов *vpsL*, *vpsA* и *vpsT* как *in vitro*, так и *in vivo*, однако его участие в регуляции других необходимых для формирования биопленки генов пока не установлено [24, 34].

Следует отметить, что компоненты системы QS и вторичный мессенджер c-di-GMP являются мишенями для низкомолекулярных веществ, выступающих в роли ингибиторов образования биопленки [12].

**Сигналы внешней среды, индуцирующие образование биопленки штаммами *V. cholerae*.** Переход бактерий от планктонной стадии к формированию биопленки в первую очередь стимулируется наличием субстрата для прикрепления. Биопленка может образовываться на поверхности зоопланктона, насекомых, ракообразных, основным компонентом экзоскелета которых является хитин; минеральных частиц, включающих отрицательно заряженные ионы кремния; технологического оборудования; продуктов питания; тканей растений и животных и т.д. [7, 35–38].

К сигналам внешней среды, индуцирующим образование биопленки, относятся изменение осмоларности и pH среды, концентрации ионов металлов (кальция, железа), фосфатов, содержание кислорода, желчи, питательных веществ [1, 39–44]. При этом снижение в среде доступных для клетки питательных веществ, в том числе углеводов, является одним из основных сигналов, стимулирующих образование биопленки холерным вибрионом. Высоко консервативной системой, контролирующей поступление углеводов в клетки различных микроорганизмов, в том числе и холерного вибриона, является фосфонолпируват фосфотрансферазная система (ФТС) [45]. Она включает в себя два связывающих цитоплазматических белка (EnzymeI и HPr), а также ряд ферментов, обеспечивающих транспорт и фосфорилирование поступающих внутрь клетки сахаров [46]. Например, глюкоза модифицируется до глюкозомонофосфата. В данной форме глюкоза не может пройти через клеточную мембрану и накапливается внутри клеток. В результате фосфорилирования концентрация свободной глюкозы в клетках резко снижается, и данный углевод начинает поступать из среды путем пассивного транспорта. При отсутствии в среде транспортируемых сахаров ферменты системы находятся в фосфорилированном состоянии, в то время как при активном переносе углеводов они быстро дефосфорилируются. Эксперименты L. Houot *et al.* [45] и P. Ymele-Leki *et al.* [47] наглядно показывают связь между активностью компонентов ФТС и формированием биопленки у штаммов *V. cholerae*. Например, морские водоросли наряду с другими запасными полисахаридами в значительном количестве синтезируют маннит. В составе ФТС холерного вибриона имеется фермент EIP<sup>Mt</sup>, благодаря которому бактерии могут реагировать на присутствие маннита в среде и утилизировать его. Показано, что даже в незначительной (400 мкМ) концентрации маннит активирует транскрипцию генов *vps*-оперона. Однако на поверхности фитопланктона концентрация маннита может достигать 700 мкМ и выше. Представленные данные еще раз доказывают важную роль фитопланктона в качестве субстрата при формировании биопленки.

Активно исследуются механизмы влияния желчи на процесс формирования биопленки штаммами *V. cholerae* в кишечнике человека. Как известно, желчь повреждает клеточную мембрану холерного вибриона, индуцирует оксидативный стресс, а также приводит к конформационным изменениям белков и нарушает содержание ионов Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> и Ca<sup>2+</sup> [48]. Среди компонентов желчи наиболее активно воздействуют на сигнальные системы *V. cholerae* желчные кислоты, в ответ на действие которых повышается внутриклеточная концентрация c-di-GMP (в 3–10 раз), активируется транскрипция регуляторного гена *vpsT* и стимулируется процесс формирования биопленки. Данный процесс прерывается после проникновения возбудителя холеры через защитный слизистый слой

к эпителиоцитам кишечника. Значительная концентрация карбонатов слизистого слоя и высокие значения pH нивелируют влияние желчных кислот на внутриклеточную концентрацию c-di-GMP, в результате чего содержание c-di-GMP в клетках снижается, экспрессия генов *vps* подавляется, но активируется продукция холерного токсина [49].

Увеличение продукции экзополисахарида и формирование биопленки в ответ на действие желчных кислот является одним из механизмов адаптации холерного вибриона не только к действию желчи, но и к низким значениям pH, антимикробным пептидам, а также иммуноглобулину класса А, препятствующему адгезии патогенных микроорганизмов к энтероцитам [39, 50].

В роли сигнальной молекулы, которая продуцируется нормальной микрофлорой кишечника человека, также выступает индол, положительно контролирующей продукцию регуляторного белка DksA, который, активируя работу генов *vps*-оперона, стимулирует биосинтез экзополисахарида и формирование биопленки [51]. Кроме того, индол увеличивает экспрессию генов, позитивно регулирующих подвижность, отвечающих за транспорт ионов и утилизацию железа, а также способствующих устойчивости холерного вибриона к уничтожению простейшими.

Важная роль в процессе формирования биопленки штаммами *V. cholerae* принадлежит неорганическим веществам. В пресных водоемах и эстуариях клетки холерного вибриона находятся в условиях дефицита фосфатов, что является серьезным фактором, подавляющим процесс биопленкообразования [52]. В качестве особого механизма, чувствительного к концентрации неорганического фосфора, а также необходимого для выживания холерного вибриона в открытых водоемах, выступает двухкомпонентная регуляторная система PhoBR. На поздней стадии инфекции данная система репрессирует экспрессию генов вирулентности, но индуцирует биосинтез факторов адаптации, в том числе увеличивает экспрессию гена *rpoS*, а также подвижность клеток и способность к формированию биопленки. У штаммов с дефектными генами *phoB/phoR* наблюдается как выраженное снижение скорости роста на средах с недостаточным содержанием фосфора и повышение чувствительности к низким значениям pH среды, так и увеличение устойчивости к осмотическому и температурному стрессам. Протеомный анализ данных штаммов выявил сниженную экспрессию генов, участвующих в энергетических процессах, а также в транспорте и метаболизме аминокислот. Система PhoB/PhoR регулирует формирование биопленки и ее деградацию независимо от работы гена *hapR* [41, 53].

На формирование биопленки также может оказывать влияние сильно варьирующаяся в водных экосистемах концентрация ионов кальция. Показано, что высокие концентрации  $Ca^{2+}$  в среде подавляют

экспрессию генов, необходимых для формирования биопленки. В первую очередь снижается транскрипция регуляторных генов *vpsR* и *vpsT*, которые позитивно регулируют транскрипцию структурных генов *vps*-оперона, ответственных за биосинтез и продукцию экзополисахарида [54]. Кроме того, уменьшается экспрессия белков RbmA, RbmC, RbmF, Var1, которые играют важную роль в поддержании и стабилизации сложной трехмерной структуры биопленки. Добавление  $Ca^{2+}$  в среду выращивания приводит к уменьшению толщины биопленки, плотности покрытия клетками субстрата, а также подавляет формирование микроколоний и, в конечном счете, может индуцировать распад биопленки.

Значительное влияние на экспрессию генов *vps*-оперона оказывает изменение осмолярности среды. Несмотря на важную роль осмопротекторов в выживании *V. cholerae*, механизмы их продукции в ответ на повышение осмолярности до конца не изучены. Показана важная роль транскрипционного регулятора CosR (от англ. Compatible solute regulator), который является негативным регулятором биосинтеза осмопротектора эктоина. В условиях повышенной концентрации соли (эстуарии, мелкие пересыхающие водоемы) CosR активирует процесс формирования биопленки, но подавляет экспрессию генов, ответственных за подвижность, независимо от его функции в качестве регулятора эктоина. В условиях низкого содержания NaCl (например, в речной воде) повышается активность другого регулятора – OscR (от англ. Osmolarity controlled regulator), относящегося к семейству IclR (Isocitratelase) транскрипционных регуляторов, присутствующих у различных грамотрицательных и грамположительных бактерий. Белок OscR увеличивает подвижность, но подавляет формирование биопленки, снижая транскрипцию генов *vps* [43, 55].

Показано, что в водной среде холерный вибрион, находясь в составе биопленки, способен утилизировать гемоглобин морских беспозвоночных [56], что подтверждает необходимость присутствия ионов железа для успешного протекания процессов ее образования. Исследование S. Craig, посвященное работе системы утилизации и транспорта железа у *V. cholerae*, наглядно показывает важность ионов  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  для биопленкообразования [14]. Так, у штамма *V. cholerae* N16961, культивируемого в условиях дефицита железа, значительно снижалась способность образовывать биопленку. Однако экспериментально полученные штаммы, имеющие единичные мутации в генах *irgA* и *vctA* (синтез и продукция энтеробактина), *vibB* и *viuA* (синтез и транспорт вибриобактина), *hutR*, *hasR*, *hutA* (транспорт гема) и *fbp* (транспорт ионов железа), образовывали биопленку. В то же время у штаммов с дефектной структурой *ryh*-регулона, в состав которого входят гены, кодирующие железосодержащие белки, участвующие в цикле трикарбоновых кислот, а также белки, связанные с подвижностью и хемотаксисом, по сравнению с

исходным штаммом, способность образовывать биопленку снижалась более чем в пять раз. Необходимо отметить, что кроме ионов железа ряд других ионов двухвалентных металлов также оказывают влияние на возможность *V. cholerae* формировать биопленку. Так, например, *ruh*-дефектные штаммы восстанавливали способность образовывать биопленку при добавлении в среду культивирования ионов  $Mn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  и  $Co^{2+}/Co^{3+}$ . Предположительно, эти соединения являются кофакторами ферментов, работающих на разных этапах формирования биопленки [56].

В 2004 г. F.H. Yildiz *et al.* [57] высказали предположение, что регуляторная система, обеспечивающая синтез экзополисахарида и формирование биопленки, функционирует не только при нахождении холерного вибриона во внешней среде, но и в организме человека и связана с системой, контролирующей продукцию факторов патогенности. В.В. Lim *et al.* [58], а впоследствии и другие исследователи, экспериментально подтвердили данное предположение, установив, что *c-di-GMP*, являющийся положительным регулятором транскрипции генов *vps* и увеличивающий синтез экзополисахарида и формирование биопленки, контролирует также продукцию факторов вирулентности у *V. cholerae*. Непосредственное участие в развитии инфекционного процесса принимает и QS-система – при низкой плотности клеточной популяции наблюдается продукция холерного токсина и токсин-корректируемых пилей адгезии. Дальнейший рост микробной популяции приводит к увеличению концентрации AI и к подавлению биосинтеза факторов патогенности. Кроме того, высокое содержание AI стимулирует продукцию растворимой гемагглютинин/протеазы, которая способствует отделению клеток холерного вибриона от рецепторов эпителиоцитов кишечника и выходу их во внешнюю среду.

Таким образом, в последние годы сделаны большие успехи в изучении молекулярных механизмов образования биопленки возбудителем холеры и ее роли в сохранении патогена в окружающей среде и развитии инфекционного процесса. Однако многие вопросы остаются открытыми. В том числе не до конца изучены сигналы внешней среды и макроорганизма, индуцирующие ее образование. Неполными являются данные о формировании биопленки *in vivo* и ее участие в развитии инфекционного процесса. Актуальным также является поиск соединений, влияющих на работу регуляторных систем и подавляющих образование биопленки, что может привести к развитию нового направления в лечении и профилактике холеры.

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

#### References / Список литературы

1. Lasa I. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *Int. Microbiol.* 2006; 9(1):21–8. PMID: 16636986.

2. Faruque S.M., Biswas K., Udden S.M., Ahmad Q.S., Sack D.A., Nair G.B., Mekalanos J.J. Transmissibility of cholera: *in vivo*-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103(16):6350–5. DOI: 10.1073/pnas.0601277103.

3. Faruque S.M., Nair G.B. *Vibrio cholerae*: Genomics and molecular biology. Caister Academic Press, Norfolk, UK: Horizon Scientific Press; 2008. 218 p.

4. Alam A., Larocque R.C., Harris J.B., Vanderspurc C., Ryan E.T., Qadri F., Calderwood S.B. Hyperinfectivity of human-passaged *Vibrio cholerae* can be modeled by growth in the infant mouse. *Infect. Immun.* 2005; 73(10):6674–9. DOI: 10.1128/IAI.73.10.6674-6679.2005.

5. Augustin M., Ali-Vehmas T., Atroshi F. Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 2004; 7(1):55–64.

6. Chavez-Dozal A., Gorman C., Erken M., Steinberg P.D., McDougald D., Nishiguchi M.K. Predation response of *Vibrio fischeri* biofilms to bacterivorous protists. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(2):553–8. DOI: 10.1128/AEM.02710-12.

7. Watnick P.J., Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol. Microbiol.* 1999; 34(3):586–95. PMID: 10564499. PMCID: PMC2860543.

8. Meibom K.L., Blokesch M., Dolganov N.A., Wu C.Y., Schoolnik G.K. Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science.* 2005; 310(5755):1824–7. DOI: 10.1126/science.1120096.

9. Wong G.C. Three-dimensional architecture of *Vibrio cholerae* biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016; 113(14):3711–3. DOI: 10.1073/pnas.1603016113.

10. Yildiz F.H., Schoolnik G.K. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96(7):4028–33. DOI: 10.1073/pnas.96.7.4028.

11. Kim T.J., Jude B.A., Taylor R.K. A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection. *Nature.* 2005; 438(7069):863–6. DOI: 10.1038/nature04249.

12. Van Dellen K.L., Watnick P.I. The *Vibrio cholerae* biofilm: a target for novel therapies to prevent and treat cholera. *Drug Discovery Today Dis. Mech.* 2006; 3(2):261–6. DOI: 10.1016/j.ddmec.2006.06.013.

13. Hung D.T., Shakhnovich E.A., Pierson E., Mekalanos J.J. Small-molecule inhibitor of *Vibrio cholerae* virulence and intestinal colonization. *Science.* 2005; 310(5748):670–4. DOI: 10.1126/science.1116739.

14. Craig S.A. Regulation of biofilm formation and outer membrane protein expression in *Vibrio cholerae* by iron [dissertation]. Austin: The University of Texas; 2008. (Cited 18 Jan 2019). Available from: <https://repositories.lib.utexas.edu/handle/2152/17845>.

15. Srivastava D., Hsieh M.L., Khataokar A., Neiditch M.B., Waters C.M. Cyclic di-GMP inhibits *Vibrio cholerae* motility by repressing induction of transcription and inducing extracellular polysaccharide production. *Mol. Microbiol.* 2013; 90(6):1262–76. DOI: 10.1111/mmi.12432.

16. Beyhan S., Tischler A.D., Camilli A., Yildiz F.H. Transcriptome and phenotypic responses of *Vibrio cholerae* to increased cyclic di-GMP level. *J. Bacteriol.* 2006; 188(10):3600–13. DOI: 10.1128/JB.188.10.3600-3613.2006.

17. Jonson G., Lebens M., Holmgren J. Cloning and sequencing of *Vibrio cholerae* mannose-sensitive haemagglutinin pilin gene: localization of *mshA* within a cluster of type 4 pilin genes. *Mol. Microbiol.* 1994; 13(1):109–18. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00406.x.

18. Roelofs K.G., Jones C.J., Helman S.R., Shang X., Orr M.W., Goodson J.R., Galperin M.Y., Yildiz F.H., Lee V.T. Systematic identification of cyclic-di-GMP binding proteins in *Vibrio cholerae* reveals a novel class of cyclic-di-GMP-binding ATPases associated with Type II secretion systems. *PLoS Pathog.* 2015; 11(10):e1005232. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005232.

19. Fong J.C., Syed K.A., Klose K.E., Yildiz F.H. Role of *Vibrio* polysaccharide (*vps*) genes in VPS production, biofilm formation and *Vibrio cholerae* pathogenesis. *Microbiology.* 2010; 156(Pt 9):2757–69. DOI: 10.1099/mic.0.040196-0.

20. Yildiz F.H., Dolganov N.A., Schoolnik G.K. VpsR, a member of the response regulators of the two-component regulatory systems, is required for expression of *vps* biosynthesis genes and EPS(ETr)-associated phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *J. Bacteriol.* 2001; 183(5):1716–26. DOI: 10.1128/JB.183.5.1716-1726.2001.

21. Yildiz F.H., Visick K.L. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends Microbiol.* 2009; 17(3):109–18. DOI: 10.1016/j.tim.2008.12.004.

22. Fong J.C., Karplus K., Schoolnik G.K., Yildiz F.H. Identification and characterization of RbmA, a novel protein required for the development of rugose colony morphology and biofilm structure in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2006; 188(3):1049–59. DOI: 10.1128/JB.188.3.1049-1059.2006.

23. Casper-Lindley C., Yildiz F.H. VpsT is a transcriptional

- regulator required for expression of vps biosynthesis genes and the development of rugose colonial morphology in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *J. Bacteriol.* 2004; 186(5):1574–8. DOI: 10.1128/JB.186.5.1574-1578.2004.
24. Conner J.G., Teschler J.K., Jones C.J., Yildiz F.H. Staying alive: *Vibrio cholerae*'s cycle of environmental survival, transmission, and dissemination. *Microbiol. Spectr.* 2016; 4(2):593–633. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0015-2015.
25. Srivastava D., Harris R.C., Waters C.M. Integration of cyclic di-GMP and quorum sensing in the control of *vpsT* and *aphA* in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2011; 193(22):6331–41. DOI: 10.1128/JB.05167-11.
26. Conner J.G., Zamorano-Sánchez D., Park J.H., Sondermann H., Yildiz F.H. The ins and outs of cyclic di-GMP signaling in *Vibrio cholerae*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2017; 36:20–9. DOI: 10.1016/j.mib.2017.01.002.
27. Waters C.M., Bassler B.L. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2005; 21:319–46. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001
28. Federle M.J., Bassler B.L. Interspecies communication in bacteria. *J. Clin. Invest.* 2003; 112(9):1291–9. DOI: 10.1172/JCI20195.
29. Miller M.B., Skorupski K., Lenz D.H., Taylor R.K., Bassler B.L. Parallel quorum sensing systems converge to regulate virulence in *Vibrio cholerae*. *Cell.* 2002; 110(3):303–14. PMID: 12176318.
30. Higgins D.A., Pomianek M.E., Kraml C.M., Taylor R.K., Semmelhack M.F., Bassler B.L. The major *Vibrio cholerae* auto-inducer and its role in virulence factor production. *Nature.* 2007; 450(7171):883–6. DOI: 10.1038/nature06284.
31. Jung S.A., Chapman C.A., Ng W.L. Quadruple quorum-sensing inputs control *Vibrio cholerae* virulence and maintain system robustness. *PLoS Pathog.* 2015; 11(4):e1004837. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004837.
32. Lenz D.H., Mok K.C., Lilley B.N., Kulkarni R.V., Wingreen N.S., Bassler B.L. The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell.* 2004; 118(1):69–82. DOI: 10.1016/j.cell.2004.06.009.
33. Hammer B.K., Bassler B.L. Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 2003; 50(1):101–4. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03688.x.
34. Teschler J., Zamorano-Sanchez D., Utada A.S., Warner C.J.A., Wong G.C.L., Lenington R.G., Yildiz F.H. Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13:255–68. DOI: 10.1038/nrmicro3433.
35. Colwell R.R., Spira W.M. The ecology of *Vibrio cholerae*. In: Barua D., Greenough W.B., editors. *Cholera. Current Topics in Infectious Disease.* Springer, Boston, MA; 1992. P. 107–27.
36. Zegans M.E., Becker H.I., Budzik J., O'Toole G. The role of bacterial biofilms in ocular infections. *DNA Cell Biol.* 2002; 21(5–6):415–20. DOI: 10.1089/10445490260099700.
37. Haugo A.J., Watnick P.I. *Vibrio cholerae* CytR is a repressor of biofilm development. *Mol. Microbiol.* 2002; 45(2):471–83. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.03023.x.
38. Pruzzo C., Tarsi R., Lleó M.M., Signoretto C., Zampini M., Pane L., Colwell R.R., Canepari P. Persistence of adhesive properties in *Vibrio cholerae* after long-term exposure to sea water. *Environ. Microbiol.* 2003; 5(10):850–8. DOI: 10.1046/j.1462-2920.2003.00498.x.
39. Hung D.T., Zhu J., Sturtevant D., Mekalanos J.J. Bile acids stimulate biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 2006; 59(1):193–201. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04846.x.
40. Bilecen K., Yildiz F.H. Identification of a calcium-controlled negative regulatory system affecting *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Environ. Microbiol.* 2009; 11(8):2015–29. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.01923.x.
41. Pratt J.T., McDonough E., Camilli A. PhoB regulates motility, biofilms, and cyclic di-GMP in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2009; 191(21):6632–42. DOI: 10.1128/JB.00708-09.
42. Hall-Stoodley L., Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol.* 2009; 11(7):1034–43. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x.
43. Shikuma N.J., Yildiz F.H. Identification and characterization of OsrR, a transcriptional regulator involved in osmolarity adaptation in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2009; 191(13):4082–96. DOI: 10.1128/JB.01540-08.
44. Landini P., Antoniani D., Burgess J.G., Nijland R. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010; 86(3):813–23. DOI: 10.1007/s00253-010-2468-8.
45. Houot L., Chang S., Pickering B.S., Absalon C., Watnick P.I. The phosphoenolpyruvate phosphotransferase system regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation through multiple independent pathways. *J. Bacteriol.* 2010; 192(12):3055–67. DOI: 10.1128/JB.00213-10.
46. Kotrba P., Inui M., Yukawa H.J. Bacterial phosphotransferase system (PTS) in carbohydrate uptake and control of carbon metabolism. *J. Biosci. Bioeng.* 2001; 92(6):502–17. DOI: 10.1016/S1389-1723(01)80308-X.
47. Ymele-Leki P., Houot L., Watnick P.I. Mannitol and the mannitol-specific enzyme IIB subunit activate *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(15):4675–83. DOI: 10.1128/AEM.01184-13.
48. Begley M., Gahan C.G., Hill C. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiol. Rev.* 2005; 29(4):625–51. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.09.003.
49. Koestler B.J., Waters C.M. Intestinal GPS: bile and bicarbonate control cyclic di-GMP to provide *Vibrio cholerae* spatial cues within the small intestine. *Gut. Microbes.* 2014; 5(6):775–80. DOI: 10.4161/19490976.2014.985989.
50. Koestler B.J., Waters C.M. Bile acids and bicarbonate inversely regulate intracellular cyclic di-GMP in *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2014; 82(7):3002–14. DOI: 10.1128/IAI.01664-14.
51. Mueller R.S., Beyhan S., Saini S.G., Yildiz F.H., Bartlett D.H. Indole acts as an extracellular cue regulating gene expression in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2009; 191(11):3504–16. DOI: 10.1128/JB.01240-08.
52. Correll D.L. Phosphorus: a rate limiting nutrient in surface waters. *Poult. Sci.* 1999; 78(5):674–82. DOI: 10.1093/ps/78.5.674.
53. Lery L.M., Goulart C.L., Figueiredo F.R., Verdoorn K.S., Einicker-Lamas M., Gomes F.M., Machado E.A., Bisch P.M., von Kruger W.M. A comparative proteomic analysis of *Vibrio cholerae* O1 wild-type cells versus a *phoB* mutant showed that the PhoB/PhoR system is required for full growth and *rpoS* expression under inorganic phosphate abundance. *J. Proteomics.* 2013; 86:1–15. DOI: 10.1016/j.jprot.2013.04.038.
54. Bilecen K., Yildiz F.H. Identification of a calcium-controlled negative regulatory system affecting *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Environ. Microbiol.* 2009; 11(8):2015–29. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.01923.x.
55. Shikuma N.J., Davis K.R., Fong J.N., Yildiz F.H. The transcriptional regulator, CosR, controls compatible solute biosynthesis and transport, motility and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Environ. Microbiol.* 2013; 15(5):1387–99. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2012.02805.x.
56. Mey A.R., Payne S.M. Haem utilization in *Vibrio cholerae* involves multiple TonB-dependent haem receptors. *Mol. Microbiol.* 2001; 42(3):835–49. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02683.x.
57. Yildiz F.H., Liu X.S., Heydorn A., Schoolnik G.K. Molecular analysis of rugosity in a *Vibrio cholerae* O1 El Tor phase variant. *Mol. Microbiol.* 2004; 53(2):497–515. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04154.x.
58. Lim B., Beyhan S., Meir J., Yildiz F.H. Cyclic-diGMP signal transduction systems in *Vibrio cholerae*: modulation of rugosity and biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 2006; 60(2):331–48. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05106.x.

#### Authors:

Plekhanov N.A., Zadnova S.P., Kritsky A.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

#### Об авторах:

Плекханов Н.А., Заднова С.П., Критский А.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Поступила 15.01.19.

Отправлена на доработку 30.01.19.

Принята к публ. 31.01.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-26-33

УДК 616.98:578.824.11

Т.Е. Сизикова, Р.В. Сахаров, М.Н. Писцов, Ю.И. Пашченко, В.Н. Лебедев, С.В. Борисевич

## ВИРУС ЧИКУНГУНЯ КАК ВОЗБУДИТЕЛЬ ЭМЕРДЖЕНТНОГО ВИРУСНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад,  
Российская Федерация

Вирус Чикунгуня является представителем рода *Alphavirus* семейства *Togaviridae*. Он является членом антигенного комплекса вируса леса Семлики, который включает в себя антигеннородственные вирусы леса Семлики, Чикунгуня, О' Ньонг-Ньонг, Росс-Ривер. Вирус Чикунгуня вызывает у людей острое лихорадочное заболевание, сопровождающееся миалгией и артралгией. С момента открытия возбудителя в 1952 г. описаны отдельные вспышки заболевания. С 2004 г. вспышки заболевания, вызванного вирусом Чикунгуня, приобретают глобальный характер. В настоящее время заболевание, вызванное вирусом Чикунгуня, рассматривается как угроза для здравоохранения во всех странах, в которых распространены комары рода *Aedes*. В настоящее время выделяют четыре генотипа вируса Чикунгуня: Западно-Африканский, Южно-Африканский, Азиатский и генотип Индийского океана. Появление различных генотипов связано с появлением адаптивных мутаций в пепломерах гликопротеинов E1 и E2. Показано, что единственная мутация в гликопротеине E1 (замена аланина в позиции 226 на валин) в 50–100 раз повышает вирулентность возбудителя. Эта мутация является определяющей для повышения эпидемического потенциала возбудителя. У вариантов вируса, в которых содержится данная замена, описаны и вторичные замены, повышающие вирулентность. Комары *A. aegypti* являются общим вектором для всех генотипов вируса Чикунгуня, комары *A. albopictus* – это вектор, главным образом, для Южно-Африканского и Азиатского генотипа, играющий основную роль в повышении эпидемического потенциала вируса за последнее десятилетие. Эффективность трансмиссии вируса Чикунгуня комарами *A. aegypti* составляет 83,3 %, а *A. albopictus* – 96,7 %. Комары *A. albopictus* имеют более широкий ареал распространения (около 40 % всей территории суши), чем *A. aegypti*. Показана возможность трансматериковой передачи комаров *A. albopictus* в ходе авиационных или морских перевозок. В обзоре рассмотрены полученные в последнее время данные об экологии, эпидемиологии и молекулярной биологии вируса Чикунгуня. Эта информация может играть важную роль в разработке стратегии создания средств профилактики и лечения.

**Ключевые слова:** вирус Чикунгуня, альфавирус, организация генома, векторы, репликация, клеточный тропизм, клинические проявления.

Корреспондирующий автор: Борисевич Сергей Владимирович, e-mail: 48cnii@mail.ru.

Для цитирования: Сизикова Т.Е., Сахаров Р.В., Писцов М.Н., Пашченко Ю.И., Лебедев В.Н., Борисевич С.В. Вирус чикунгуня как возбудитель эмерджентного вирусного заболевания. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 3:26–33. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-26-33

## T.E. Sizikova, R.V. Sakharov, M.N. Pistsov, Yu.I. Pashchenko, V.N. Lebedev, S.V. Borisevich Chikungunya Virus as the Agent of Emergent Viral Disease

«48th Central Research Institute» of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Possad, Russian Federation

**Abstract.** Chikungunya virus belongs to *Alphavirus* genus of the *Togaviridae* family. It is a member of Semliki Forest virus antigenic complex that includes antigenic related Semliki Forest, Chikungunya, O' Nyong-nyong, Ross River viruses. Chikungunya virus is the causative agent of acute febrile illness with myalgia and arthralgia in humans. Since its discovery in 1952, Chikungunya virus caused sporadic and infrequent outbreaks. Since 2004, global Chikungunya outbreaks have occurred. Now Chikungunya is viewed as a global public health issue in many countries, where *Aedes* mosquito vectors are widespread. Currently, four genotypes of Chikungunya virus (West African, South African, Asian and Indian Ocean) are distinguished. Appearance of different genotypes is associated with adaptive mutations in pеплоmers of E1 and E2 glycoproteins. It is shown, that a single mutation in E1 glycoprotein (alanin for valin substitution in 226 position) leads to increasing virus virulence (50–100 times). This mutation is instrumental for epidemic potential increase. For virus variants with this mutation, secondary substitutions enhancing viral virulence are described too. *Aedes aegypti* mosquitoes are common vector for all genotypes of Chikungunya virus, *Aedes albopictus* mosquitoes are vector, mainly, for South African and Asian genotypes. They play the leading role in epidemic potential increase over the last decade. The effectiveness of Chikungunya virus transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes is 83.3 %, by *Aedes albopictus* mosquitoes – 96.7 %. The *Aedes albopictus* are more widely disseminated than *Aedes aegypti* (about 40 percent of all land territory). Demonstrated is the possibility of transcontinental spread of *Aedes albopictus* mosquitoes by aviation and naval transport. This review highlights the most recent advances in our knowledge of the ecology, epidemiology and molecular biology of Chikungunya virus. These data play an important role in the development of preventive, treatment and vaccination strategies of Chikungunya fever.

**Key words:** Chikungunya virus, alphavirus, genome structure, vectors, replication, cell tropism, clinical manifestation.

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

Corresponding author: Sergey V. Borisevich, e-mail: 48cnii@mail.ru.

Citation: Sizikova T.E., Sakharov R.V., Pistsov M.N., Pashchenko Yu.I., Lebedev V.N., Borisevich S.V. Chikungunya Virus as the Agent of Emergent Viral Disease. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 3:26–33. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-26-33  
Received 02.11.18. Revised 11.01.19. Accepted 08.08.19.

Sizikova T.E., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1817-0126>  
Sakharov R.V., ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6155-1365>  
Pistsov M.N., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-1046-0188>  
Pashchenko Yu.I., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4094-3885>  
Lebedev V.N., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-6552-4599>  
Borisevich S.V., ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5742-3919>

Вирус Чикунгунья является возбудителем арбовирусной инфекции, передающейся комарами рода *Aedes* [1]. При заражении у 75–95 % инфицированных людей развивается лихорадка Чикунгунья, характеризующаяся лихорадкой, миалгией, артралгией, сыпью, гипертонией и интенсивной астенией [2]. У 12–49 % больных возникают тяжелые осложнения, которые могут сохраняться от нескольких месяцев до нескольких лет после острой фазы заболевания [3]. Кроме того, в отдельных случаях у переболевших отмечают энцефалопатию, постстрематозный артрит, энцефалит, миокардит и гепатит [4].

Вирус Чикунгунья принадлежит к роду *Alphavirus* семейства *Togaviridae*. Он является членом антигенного комплекса вируса леса Семлики, который включает в себя близкие по антигенному составу вирусы леса Семлики, Чикунгунья, О' Ньонг-Ньонг, Росс-Ривер. Прототипным представителем комплекса является вирус леса Семлики, с которым выполнена значительная часть исследования представителей рода *Alphavirus* [5].

Вирионы альфавирусов представляют собой сферические частицы с диаметром 65–70 нм. Геном альфавирусов представлен одноцепочечной «плюс» РНК размером приблизительно 11,8 тыс. нуклеотидов. Геномная РНК имеет такую же структуру, как и у других представителей рода *Alphavirus*: «кэпированный» 5'-конец, нетранслируемая последовательность, гены неструктурных белков Nsp1, Nsp2, Nsp3, Nsp4, 26S РНК, кодирующая гены белка нуклеокапсида (С), гликопротеинов E1, E2 и E3, нетранслируемая последовательность, поли А, 3'-конец [6].

Нуклеокапсид с диаметром 20–30 нм состоит из молекулы РНК, защищенной от воздействия повреждающих факторов внешней среды белком С. Нуклеокапсид окружен двухслойной липидной мембраной, содержащей вставки трансмембранных гликопротеинов E1 и E2 [5, 6]. Состав липидной мембраны зависит от состава плазматической мембраны инфицированной клетки-хозяина, при культивировании в клетках млекопитающих мембрана состоит из холестерина и фосфолипидов в соотношении приблизительно 1:1 [6].

Белок E1 состоит из 439 аминокислотных остатков (а.о.) и содержит один консервативный сайт гликозилирования в позиции 141 [7]. Белок E1 прикреплен к липидной двухслойной мембране с помощью трансмембранной спирали размером 30 а.о., расположенной в С-концевой части белка E1. Оставшийся участок С-концевой части белка содержит только 5 а.о., не связанных с нуклеокапсидом. N-концевой эктодомен белка E1 состоит из 404 а.о. и структурно

разделен на три β-стволовых домена, (DI, DII и DIII), расположенных в порядке удаления от N-конца [5, 7].

Белок E2 состоит из 423 а.о. и содержит два сайта гликозилирования в положениях 263 и 345 [7]. Белок E2 прикреплен к липидной двухслойной мембране с помощью трансмембранной спирали размером 26 а.о. Оставшийся участок С-концевой части белка содержит 33 а.о. Эктодомен белка E2 имеет размер 364 а.о. и состоит из трех доменов А, В и С. В зрелом вирионе 240 копий белков E1 и E2 расположены в 80 тримерных шипиках (пепломерах), один пепломер состоит из трех E2/E1 гетеродимеров [5].

В настоящее время выделяют четыре генотипа вируса Чикунгунья: Западно-Африканский, Южно-Африканский, Азиатский и генотип Индийского океана. Появление различных генотипов связано с появлением адаптивных мутаций в пепломерах гликопротеинов E1 и E2 [8]. Установлено, что единственная мутация в гликопротеине E1 (замена аланина в позиции 226 на валин) в 50–100 раз повышает вирулентность возбудителя [5]. Эта мутация является определяющей для повышения эпидемического потенциала возбудителя [9]. У вариантов, в которых содержится данная замена, описаны и вторичные замены, повышающие вирулентность вируса [1, 10]. Выявленные аминокислотные замены, обеспечивающие процесс адаптации возбудителя лихорадки Чикунгунья в комарах *A. albopictus*, представлены в таблице.

Альфавирусы обычно внедряются в чувствительные клетки с помощью клатрин-эндоцитоза, хотя для вируса Синдбис описано и прямое слияние с плазматической мембраной [11].

Клатрин-эндоцитоз является конститутивным процессом в клетках млекопитающих, происходящим через сложное взаимодействие нескольких белков, включая адаптерный белок-2, динамин, клатрин, эпсин [12]. После этого клатриновые везикулы транспортируются внутрь клетки, а вирус доставляется в эндосомы.

Триггерные конформационные участки в пределах гликопротеинов E1/E2 опосредуют слияние вирусной оболочки с эндосомной мембраной. Основным белком, определяющим проникновение вируса Чикунгунья в чувствительные клетки, является динамин [13], который служит важным посредником клатрин-эндоцитоза и кавеоларного эндоцитоза, а также фагоцитоза. Кроме динамина, важную роль играет также эпсин 15 [5].

Специфические ингибиторы, такие как малые интерферирующие РНК (siРНК) против тяжелой цепи клатрина, не ингибируют репродукцию вируса Чикунгунья в клетках НЕК239Т, но показано вызванное

Аминокислотные замены, обеспечивающие адаптацию вируса Чикунгунья в комарах рода *Aedes*  
 Amino acid substitutions responsible for Chikungunya virus adaptation in mosquitoes of the genus *Aedes*

Белок Protein	Замена аминокислот в позиции Amino acid substitution in the position	Эффект от замены Effect of the substitution	Предполагаемый механизм Alleged mechanism	Источник Source
E1	226, аланин/валин 226, alanine/valine	Повышение инфекционности, уровней диссеминации и трансмиссии вируса Чикунгунья у комаров <i>A. albopictus</i> . Отсутствие эффекта у комаров <i>A. aegypti</i> Increase in infectivity, dissemination and transmission rate of Chikungunya virus in <i>A. albopictus</i> mosquitoes. Absence of the effect in <i>A. aegypti</i>	Повышение способности проникновения вируса в клетку через эндосомы вследствие конформационных изменений гетеродимеров E1-E2 Enhanced ability to penetrate a cell through endosomes due to conformation alterations of heterodimers E1-E2	14
E1	98, треонин/аланин 98, threonine/alanine	Отсутствие эффекта у вируса дикого типа. Повышение инфекционности, уровней диссеминации и трансмиссии вируса Чикунгунья с заменой E1226, аланин/валин у комаров <i>A. albopictus</i> Absence of the effect in wild-type virus. Increase in infectivity, dissemination and transmission rate of Chikungunya virus with E1226 substitution, alanine/valine in <i>A. albopictus</i> mosquitoes	Эпистатическое взаимодействие Epistatic interaction	15
E1	80, аланин/изолейцин 129, аланин/валин 80, alanine/isoleucine 129, alanine/valine	Повышение инфекционности, уровней диссеминации и трансмиссии у комаров <i>A. albopictus</i> Increase in infectivity, dissemination and transmission rate in <i>A. albopictus</i> mosquitoes	Повышение стабильности, конформационные изменения, благоприятствующие процессу сращения вирионов с клеточной мембраной Enhanced stability, conformation changes, conducive to the process of fusing of the virions and cell membrane	16
E2	60, глицин/аспарагиновая кислота 60, glycine/asparaginic acid	Повышение инфекционности, уровней диссеминации и трансмиссии у комаров <i>A. albopictus</i> и вируса Чикунгунья с заменой E1226, аланин/валин у комаров <i>A. aegypti</i> Increase in infectivity, dissemination and transmission rate in <i>A. albopictus</i> mosquitoes and Chikungunya virus with E1226 substitution, alanine/valine in <i>A. aegypti</i> mosquitoes	Нет данных No data	17
E2	198, аргинин/глутамин 198, arginine/glutamine	Повышение инфекционности и уровня диссеминации вируса Чикунгунья с мутацией в гликопротеине E3 18, серин/фенилаланин у комаров <i>A. albopictus</i> Increase in infectivity and dissemination rate of Chikungunya virus with a mutation in glycoprotein E3 18, serine/phenylalanine in <i>A. albopictus</i> mosquitoes	Стабилизация гликопротеина E2 в процессе сборки вируса Stabilization of glycoprotein E2 in the process of virus assembly	
E2	210, лейцин/глутамин 210, leucine/ glutamine	Повышение инфекционности и уровня диссеминации у комаров <i>A. albopictus</i> . Повышение эффекта от мутации в гликопротеине E1, 226, аланин/валин Increase in infectivity and dissemination rate in <i>A. albopictus</i> mosquitoes. Enhanced impact of mutation in glycoprotein E1, 226, alanine/valine	Эффект от взаимодействия с эпителиальным рецептором комара Effect of interaction with epithelial receptor of mosquito	
E2	233, лизин/глутаминовая кислота; лизин/глутамин 233, lysine/glutamine acid; lysine/glutamine	Повышение инфекционности и уровня диссеминации вируса Чикунгунья у комаров <i>A. albopictus</i> . Повышение эффекта при мутации в гликопротеине E1, 226, аланин/валин Increase in infectivity and dissemination rate of Chikungunya virus in <i>A. albopictus</i> mosquitoes. Enhanced impact of mutation in glycoprotein E1, 226, alanine/valine	Эффект от взаимодействия с эпителиальным рецептором комара Effect of interaction with epithelial receptor of mosquito	
E2	234, лизин/глутаминовая кислота 234, lysine/ glutamine acid	Повышение инфекционности и уровня диссеминации вируса Чикунгунья у комаров <i>A. albopictus</i> . Повышение эффекта при мутации в гликопротеине E1, 226, аланин/валин Increase in infectivity and dissemination rate of Chikungunya virus in <i>A. albopictus</i> mosquitoes. Enhanced impact of mutation in glycoprotein E1, 226, alanine/valine	Эффект от взаимодействия с эпителиальным рецептором комара Effect of interaction with epithelial receptor of mosquito	18
E2	248, лейцин/глутамин 248, leucine/ glutamine	Повышение инфекционности и уровня диссеминации вируса Чикунгунья у комаров <i>A. albopictus</i> . Повышение эффекта при мутации в гликопротеине E1, 226, аланин/валин Increase in infectivity and dissemination rate of Chikungunya virus in <i>A. Albopictus</i> mosquitoes. Enhanced impact of mutation in glycoprotein E1, 226, alanine/valine	Эффект от взаимодействия с эпителиальным рецептором комара Effect of interaction with epithelial receptor of mosquito	
E2	252, лизин/глутамин 252, lysine/glutamine	Повышение инфекционности и уровня диссеминации вируса Чикунгунья у комаров <i>A. albopictus</i> . Повышение эффекта при мутации в гликопротеине E1, 226, аланин/валин Increase in infectivity and dissemination rate of Chikungunya virus in <i>A. albopictus</i> mosquitoes. Enhanced impact of mutation in glycoprotein E1, 226, alanine/valine	Эффект от взаимодействия с эпителиальным рецептором комара Effect of interaction with epithelial receptor of mosquito	
E3	18, серин/фенилаланин 18, serine/ phenylalanine	Повышение инфекционности и уровня диссеминации вируса Чикунгунья у комаров <i>A. albopictus</i> Increase in infectivity and dissemination rate of Chikungunya virus in <i>A. albopictus</i> mosquitoes.	Стабилизация гликопротеина E2 в процессе сборки Stabilization of glycoprotein E2 in the process of assembly	

siРНК снижение инфекционности в эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVeC), клеточной линии U-2 OS и первичных эндотелиальных клетках пупочной вены человека [5].

Вероятно, что возбудитель лихорадки Чикунгунья обладает способностью инфицировать клетки несколькими способами. Это косвенно подтверждается тем фактом, что ни один из использованных механизмов ингибирования полностью не блокирует инфицирование клеток [11]. Можно предположить, что основным механизмом проникновения вируса Чикунгунья в чувствительные клетки является клатрин-эндоцитоз. Оптимальное значение величины рН для слияния вируса Чикунгунья с клетками, в зависимости от штамма вируса, находится в интервале между 5,9 и 6,2 [5].

Аминокислотный остаток, важный для определения оптимальной величины рН, для вируса Чикунгунья (как и для вирусов Синдбис и леса Семлики) расположен на гликопротеине Е1 в положении 226 [14]. Этот остаток лежит в пределах центральной области ДП. Штаммы возбудителя лихорадки Чикунгунья, содержащие валин вместо аланина, в положении 226 требуют более низкого рН для инфицирования клетки [14]. Эти штаммы характеризуются повышенной вирулентностью.

Высококонсервативный остаток гистидина на гликопротеине Е1 в положении 3 имеет важное значение в регулировании индуцированной кислым рН среды тримеризации [19].

Молекулярные механизмы, участвующие в процессе слияния мембран, для альфавирусов изучены в основном при исследованиях, выполненных с вирусами Синдбис и леса Семлики. Исследования, выполненные с вирусом Чикунгунья, позволяют предположить, что данные молекулярные механизмы высоко консервативны для альфавирусов [11]. Как и вирусы Синдбис и леса Семлики, возбудитель лихорадки Чикунгунья может сливаться с рецепторами липосом [20].

Заражение человека возникает в результате укуса инфицированного комара – *A. aegypti* или *A. albopictus* [3]. Эти виды комаров участвуют в циклах передачи вируса в городских и сельских районах.

Комары *A. aegypti* являются общим вектором для всех генотипов вируса Чикунгунья, а *A. albopictus* – это вектор, главным образом, для Южно-Африканского и Азиатского генотипа, играющий основную роль в повышении эпидемического потенциала возбудителя за последнее десятилетие [1, 21–23].

Эффективность трансмиссии патогена комарами *A. aegypti* составляет 83,3 %, а *A. albopictus* – 96,7 % [23, 24]. Вероятно, это связано с наличием у *A. aegypti* иммунных механизмов, ограничивающих репродукцию в них вируса [25]. Вследствие этого репродукция вируса Чикунгунья в клетках комаров проходит с более низкой скоростью, чем в клетках млекопитающих [10].

Комары *A. albopictus* имеют более широкий ареал распространения (около 40 % всей территории суши), чем *A. aegypti*. Доказана возможность трансматериковой передачи *A. albopictus* в ходе авиационных или морских перевозок [9, 22].

Важно отметить, что у *A. aegypti* показано наличие вертикальной трансмиссии, это указывает на то, что комары данного вида являются не только вектором передачи, но и резервуаром вируса в природе [26].

В результате укуса инфицированного комара вирионы возбудителя лихорадки Чикунгунья проникают в капилляры кожи и через кровь в региональный лимфоузел. После репродукции вирус проникает в органы-мишени – суставы, мышцы, кожу, реже печень, почки, глаза и центральную нервную систему (ЦНС). Поражение этих органов часто связано с заметной инфильтрацией мононуклеарных клеток, таких как моноциты и макрофаги. Исследования, выполненные с представителями различных генотипов вируса Чикунгунья, выявили отсутствие значимых различий тропизма для всех четырех генотипов.

Продолжительность вирусемии составляет 7–12 сут, высота вирусемии может достигать  $10^9$ – $10^{12}$  вирусных частиц в 1 мл [27]. В отличие от других альфавирусов (вирусы леса Семлики, Росс-Ривер, венесуэльского энцефаломиелита лошадей) возбудитель лихорадки Чикунгунья не реплицируется в одноклеточных клетках периферической крови: лимфоцитах, дендритных клетках, Т-киллерах. Ключевыми клетками для репродукции вируса являются дермальные фибробласты, мигрирующие моноциты, макрофаги и эндотелиальные клетки. Исследования *in vitro* установили, что эти клетки являются более чувствительными к инфицированию возбудителем лихорадки Чикунгунья [11].

Мононуклеарная инфильтрация клеток и вирусная репликация в мышечных клетках (особенно клеток скелетных мышц) и фибробластах капсулы суставов приводят к изнурительной артралгии, миалгии, а в некоторых случаях и артриту [28]. В то время как острые симптомы обычно проходят в течение двух недель, артралгия и миалгия может продолжаться от нескольких недель до нескольких месяцев или даже лет [4]. Хроническое заболевание связано с продолжающейся репликацией вируса в клетках-мишенях или формированием самоподдерживающегося воспалительного механизма, который приводит к повреждению тканей организма человека [29].

Вирус Чикунгунья классифицируют как артриогенный (но не нейротропный или энцефалитогенный) альфавирус Старого Света [27].

Тем не менее есть сообщения о случаях энцефалита и синдрома Гийена-Барре после перенесенной инфекции [3, 30]. Вирус Чикунгунья обнаружили в крови и спинномозговой жидкости новорожденных и взрослых пациентов с энцефалопатией [31]. Исследования на белых мышах, инфицированных возбудителем лихорадки Чикунгунья, позволяют предположить, что вирусные частицы могут войти в

ЦНС через пространства Вирхова-Робена [3]. После этого происходит репродукция вируса в сосудистом сплетении эпителиальных клеток, мягкой и паутинной оболочках мозга [3]. Полученные данные позволяют разъяснить механизм, приводящий к инфицированию вирусом Чикунгунья ЦНС человека.

Вирус Чикунгунья впервые выделен в Танзании в 1952 г. из сыворотки крови больного мужчины. В дальнейшем описаны небольшие эпидемические вспышки в отдельных районах Африки и Азии. Эта ситуация коренным образом изменилась к концу 2004 г., когда началась первая крупная вспышка заболевания, вызванного вирусом Чикунгунья [22]. С тех пор количество людей, инфицированных этим возбудителем, исчисляется миллионами. На сегодняшний день масштабные эпидемии заболевания, вызванного возбудителем лихорадки Чикунгунья, отмечены в некоторых регионах Африки, Азии, а также в тропических районах Северной, Центральной и Южной Америки [22].

Большинство вспышек лихорадки Чикунгунья в 2004–2012 гг. вызвано Азиатским генотипом вируса. В Таиланде в 1958 г. впервые выявлены, а в 1976–1995 гг. повторно зарегистрированы спорадические вспышки заболевания, вызванные вирусом Азиатского генотипа. Новая крупномасштабная вспышка в Таиланде в 2008–2009 гг., в ходе которой выявлено свыше 50 тыс. случаев заболевания, связана с распространением не Азиатского, а Южно-Африканского генотипа вируса Чикунгунья. Основным вектором передачи инфекции в ходе данной вспышки были комары *A. albopictus*. Штаммы возбудителя, выделенные от заболевших, характеризовались наличием вышеупомянутой мутации белка E1 (замена аланина в позиции 226 на валин) [32].

Азиатский генотип быстро распространился в Северной и Южной Америке после его выявления на острове Сен-Мартен (Карибское море) в октябре 2013 г. Это была первая вспышка заболевания вирусом Чикунгунья в Новом Свете. До этого все зарегистрированные случаи заболевания имели завозной характер и не сопровождалась возникновением эпидемических вспышек, несмотря на наличие потенциального вектора передачи, комаров *A. albopictus* [23]. Месяц спустя возбудитель уже распространился на другие острова бассейна Карибского моря [33].

Все зарегистрированные в последующие годы вспышки заболевания в Северной и Центральной Америке вызваны Азиатским генотипом [34]. Южно-Африканский генотип проник в Южную Америку из Анголы в мае 2014 г. в Фейра-ди-Сантана (штат Байо, Бразилия). Кроме того, в Бразилии (на севере страны) распространился также Азиатский генотип возбудителя лихорадки Чикунгунья [35]. Проведенный эпидемиологический анализ показал, что в результате появления двух генотипов возбудителя в Бразилии 94 % населения страны находятся в группе риска по заболеванию. В 2015 г. Министерство здравоохранения Бразилии сообщило в общей сложности о 20661

случае лихорадки Чикунгунья. Диагностика инфекции осложнена тем, что по клинической картине заболевания лихорадка Чикунгунья весьма схожа с лихорадками денге и Зика [35]. Более того, сезонные эпидемические циклы этих инфекций также практически совпадают, так что возможна одновременная циркуляция всех трех указанных патогенов. Скорость распространения инфекции заметно снижается при температуре ниже 20 и полностью прекращается при температуре 15 °С.

К концу декабря 2015 г. общее число заболевших в Северной, Центральной и Южной Америке превысило 1 млн человек, 73 случая заболевания завершились летальным исходом [4, 23, 34].

Х.Н. Yao *et al.* [33] сообщили о случаях заболевания, вызванного вирусом Чикунгунья, во Франции. Заболели двое детей (девочка 8 лет и мальчик 10 лет) спустя два дня после возвращения во Францию с о. Мартиника. У детей выявлена макропапулезная сыпь и петехии на руках и ногах. Осмотр показал наличие множественных укусов комаров. Вирус Чикунгунья от заболевших выделен специалистами Тулузского университета.

В результате проведенного секвенирования фрагмента гликопротеина E1 возбудителя размером 205 нуклеотидов установлено, что выделенный штамм относится к Азиатскому генотипу. Секвенирование выявило отсутствие замены в позиции 226 (аланина на валин), которая необходима для адаптации патогена в комарах *A. albopictus*. Штаммы вируса, выделенные во время двух вспышек лихорадки Чикунгунья, в ходе которых вектором передачи служили комары *A. albopictus*, содержали указанную замену аминокислоты в позиции 226 гликопротеина E1. Последнее обстоятельство имеет весьма существенное значение, поскольку именно комары *A. albopictus* представляют основную опасность как вектор распространения заболевания, вызываемого вирусом Чикунгунья в Европе, так как площадь ареала распространения комаров данного вида в южной Франции составляет 91150 км<sup>2</sup>. Численность населения этого региона около 13 млн человек [33].

A. Requena-Méndez *et al.* [36] описали 10 случаев заболевания, вызванного возбудителем лихорадки Чикунгунья, в Испании. Заболели туристы, вернувшиеся из Гаити (2 человека) и Доминиканской Республики (7). Еще один из заболевших посетил обе эти страны. Заболевания во всех случаях начались в пятидневном интервале после возвращения в Испанию. Симптомы заболевания включали лихорадку, артралгию и артриты. Выделенный штамм относится к Азиатскому генотипу.

Описанные случаи указывают на возможность возникновения вспышки заболевания, вызванного вирусом Чикунгунья, в южно-европейских странах.

С момента повторного появления лихорадки Чикунгунья в 2004 г. значительно вырос уровень знания биологии вируса. Однако требуются дальнейшие исследования, чтобы полностью прояснить

механизмы возникновения заболевания. Важное значение будет иметь идентификация клеток, в которых происходит репродукция вируса во время периода виремии. Это не только повысит понимание патогенеза заболевания, вызванного вирусом Чикунгунья, но и определит направления противовирусной терапии. Другим важным направлением станет определение специфических вирусных рецепторов.

Лабораторная диагностика основана на выявлении в клиническом материале РНК вируса с помощью ОТ-ПЦР и/или выявления специфических антител в сыворотках крови реконвалесцентов с помощью ИФА [37].

Средства специфической профилактики и лечения лихорадки Чикунгунья в настоящее время отсутствуют [27, 38].

Проводится доклиническое изучение следующих кандидатов в вакцины: формолинизированной вакцина, вирусоподобные частицы, химерные альфавирусы, ДНК-вакцина, аттенуированный с помощью методов обратной генетики штамм вируса Чикунгунья [38].

В качестве лабораторных животных на первых этапах доклинических испытаний вакцин используют белых мышей различных линий.

Разработке вакцины против лихорадки Чикунгунья до недавнего времени препятствовало отсутствие лабораторной модели, позволяющей изучить особенности хронической инфекции, вызванной вирусом Чикунгунья. R.L. Seymour *et al.* [2] предложили использовать для данной цели белых мышей линий RAG1<sup>-/-</sup> и C57BL/6 8–10-недельного возраста. Эти мыши являются иммунодефицитными по образованию Т- и В-лимфоцитов. Данные лабораторные животные были использованы при проведении доклинических испытаний генно-инженерной вакцины (клон 181), по результатам которых сделано заключение о безопасности кандидата в вакцины.

Основной лабораторной моделью для экспериментального изучения заболевания, вызываемого вирусом Чикунгунья, являются низшие приматы. Их основное преимущество перед другими лабораторными животными состоит в том, что они являются естественными хозяевами вируса в природе. Патогенез заболевания у низших приматов имеет в общих чертах такую же клиническую картину, как патогенез заболевания у человека (лихорадка, сыпь, вирусемия, продукция интерферона типа 1). У инфицированных вирусом Чикунгунья низших приматов формируются специфические Т- и В-лимфоциты, продуцирующие ВНА и специфические CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клетки. Инфицирование вирусом Чикунгунья приводит к развитию персистентной инфекции у различных видов низших приматов, в особенности у макаков циномоглусов, вследствие того, что инфекционный вирус присутствует в селезенке, печени и мышечной ткани животных спустя 44 дня после инфицирования [39]. Вследствие этого низшие приматы рассматриваются в качестве основной модели при проведении

испытаний средств защиты в отношении лихорадки Чикунгунья.

Среди разрабатываемых препаратов для экстренной профилактики и лечения заболевания необходимо упомянуть антителосодержащие препараты, интерферон, химиопрепараты (рибавирин, хлороквин, арбидол, ингибиторы фурина, ингибиторы репродукции вируса), антисмысловые олигонуклеотиды и siРНК [38].

Единственный дошедший до стадии клинических испытаний препарат – хлороквин – не показал обнадеживающих результатов [40]. Учитывая высокую потенциальную опасность, вызываемую вирусом Чикунгунья для здравоохранения, поиск новых противовирусных препаратов имеет первостепенное значение.

Данные испытаний на лабораторных животных указывают на перспективы использования для лечения заболевания антителосодержащих препаратов [41]. Комплексы вирус-антитело распознаются Fc-рецепторами иммунных клеток, таких как макрофаги [42]. Наиболее перспективным является использование антител к оболочечным гликопротеинам вируса. Следует отметить, что для эффективной терапии необходим набор антител, поскольку вирус Чикунгунья содержит множественные рецептор-связывающие домены. Дальнейшие исследования должны направляться на поиск МКАт, препятствующих слиянию мембран вируса и чувствительной клетки. Следовательно, основное внимание должно уделяться дальнейшей идентификации нейтрализующих антител, которые мешают слиянию вируса с чувствительными клетками [43].

Получены данные о том, что антителотерапия с использованием МКАт может предотвратить хроническую инфекцию у мышей. Проверка эффективности антителотерапии в организме человека, как ожидается, будет выполнена в ближайшее время в ходе клинического исследования, в котором будет проведена оценка влияния антител к вирусу Чикунгунья для профилактики заболевания у новорожденных [43]. Эта группа пациентов представляет особый интерес, так как новорожденные более склонны к развитию тяжелого заболевания, и болезнь можно лечить на ранних стадиях [38].

Переоценка опасности вируса Чикунгунья для здравоохранения в последние годы является наглядным примером действенности эволюционных факторов филогенеза возбудителя. Одной единственной аминокислотной замены в гликопротеине E1 (аланина в позиции 226 на валин) оказалось достаточно для многократного повышения вирулентности возбудителя [5]. Как следствие, пересмотр роли вируса Чикунгунья от возбудителя, вызывающего локальные вспышки в ограниченных регионах, до этиологического агента заболевания, представляющего угрозу для здравоохранения многих стран мира, обуславливающую необходимость разработки современных средств диагностики, профилактики и лечения.

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

### References / Список литературы

- Zouache K., Failloux A. Insect-pathogen interactions: contribution of viral adaptation to the emergence of vector-borne diseases, the example of Chikungunya. *Curr. Opin. Insect Sci.* 2015; 10:14–21. DOI: 10.1016/j.cois.2015.04.010.
- Seymour R.L., Adams A.P., Leal G., Alcorn M.D., Weaver S.C. A rodent model of Chikungunya virus infection in RAG1<sup>-</sup> mice, with features of persistence, for vaccine safety evaluation. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(6):e000380. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003800.
- Couderc T., Lecuit M. Chikungunya virus pathogenesis: From bedside to bench. *Antiviral Res.* 2015; 121:120–31. DOI: 10.4269/ajtmh.2011.10.0725.
- Foissac M., Javelle E., Ray S., Guérin B., Simon F. Post-Chikungunya rheumatoid arthritis, Saint Martin. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(3):530–2. DOI: 10.3201/eid2103.141397.
- Van Duijl-Richter M.K., Hoornweg T.E., Rodenhuis-Zybert I.A., Smit J.M. Early Events in Chikungunya Virus Infection-From Virus Cell Binding to Membrane Fusion. *Viruses.* 2015; 7(7):3647–74. DOI: 10.3390/v7072792.
- The Togaviridae and Flaviviridae. N.Y.: Plenum Press; 1986. P. 265–72.
- Sun S., Xiang Y., Akahata W., Holdaway H., Pal P., Zhang X., Diamond M.S., Nabel G.J., Rossman M.G. Structural analyses at pseudo atomic resolution of Chikungunya virus and antibodies show mechanisms of neutralization. *eLife.* 2013; 2:e00435. DOI: 10.7554/eLife.00435.
- Weaver S.C., Forrester N.L. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral Res.* 2015; 120:32–9. DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.04.016.
- Miller M.J., Loaiza J.R. Geographic expansion of the invasive mosquito *Aedes albopictus* across Panama – implications for control of dengue and Chikungunya viruses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(1):e000338. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003383.
- Acharya D., Paul A.M., Anderson J.F., Huang F., Bai F. Loss of glycosaminoglycan receptor binding after mosquito cell passage reduces Chikungunya virus infectivity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(10):e0004139. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004139.
- Bordi L., Caglioti C., Lalle E., Castilletti C., Capobianchi M.R. Chikungunya and Its Interaction With the Host Cell. *Cur. Trop. Med. Rep.* 2015; 2(1):22–9. DOI: 10.1007/s40475-015-0038-y.
- Kirschhausen T., Owen D., Harrison S.C. Molecular structure, function and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2014; 6:122–5. DOI: 10.1101/cshperspect.a016725.
- Sourisseau M., Shilite G., Casartelli N., Troillet C., Guivel-Benhassine F., Rudnicka D., Sol-Foulon N., Le Roux K., Prevost M.C., Fsihi H., Frenkel M.P., Blanchet F., Afonso P.V., Ceccaldi P.E., Ozden S., Gessain A., Schuffenecker I., Verhasselt B., Zamborlini A., Saïb A., Rey F.A., Arenzana-Seisdedos F., Desprès P., Michault A., Albert M.L., Schwartz O. Characterization of reemerging Chikungunya virus. *PLoS Pathog.* 2007; 3(6):e89. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030089.
- Tsetsarkin K.A., Vanlandingham D.L., McGee C.E., Higgs S. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* 2007; 3(12):1895–906. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030201.
- Tsetsarkin K.A., Chen R., Leal G., Forrester N., Higgs S., Huang J., Weaver S.C. Chikungunya virus emergence is constrained in Asia by lineage-specific adaptive landscapes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011; 108:7872–7. DOI: 10.1073/pnas.1018344108.
- Stapleford K.A., Coffey L.L., Lay S., Borderia A.V., Duong V., Isakov O., Rozen-Gagnon K., Arias-Goeta C., Blanc H., Beaucourt S., Haliloğlu T., Schmitt C., Bonne I., Ben-Tal N., Shomron N., Failloux A.B., Buchy P., Vignuzzi M. Emergence and transmission of arboviral evolutionary intermediates with epidemic potential. *Cell Host Microbe.* 2014; 15:706–16. DOI: 10.1016/j.chom.2014.05.008.
- Tsetsarkin K.A., McGee C.E., Volk S.M., Vanlandingham D.L., Weaver S.C., Higgs S. Epistatic roles of E2 glycoprotein mutations in adaptation of Chikungunya virus to *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* mosquitoes. *PLoS One.* 2009; 4(8):e683. DOI: 10.1371/journal.pone.0006835.
- Tsetsarkin K.A., Chen R., Yun R., Rossi S.L., Plante K.S., Guerbois M., Forrester N., Perng G.C., Sreekumar E., Leal G., Huang J., Mukhopadhyay S., Weaver S.C. Multi-peaked adaptive landscape for Chikungunya virus evolution predicts continued fitness optimization in *Aedes albopictus* mosquitoes. *Nat. Commun.* 2014; 5:4084–7. DOI: 10.1038/ncomms5084.
- Zeng X., Mukhopadhyay S., Brooks C.L. Residue – level resolution of alphavirus envelope protein interactions in pH-dependent fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015; 112:2034–9. DOI: 10.1073/pnas.1414190112.
- Van Duijl-Richter M.K., Blijleven J., van Oijen A., Smit J.M. Chikungunya virus fusion properties elucidated by single-particle and bulk approaches. *J. Gen. Virol.* 2015; 96(8):2122–32. DOI: 10.1099/vir.0.000144.
- Huang Y.J., Higgs S., Horne K.M., Vanlandingham D.L. Flavivirus-mosquito interactions. *Viruses.* 2014; 6(11):4703–30. DOI: 10.3390/v6114703.
- Rougeron V., Sam I.C., Caron M., Nkoghe D., Leroy E., Roques P. Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. *J. Clin. Virol.* 2015; 64:144–52. DOI: 10.1016/j.jcv.2014.08.032.
- Vega-Rúa A., Lourenço-de-Oliveira R., Mousson L., Vazeille M., Fuchs S., Yébakima A., Gustave J., Girod R., Dusfour I., Leparc-Goffart I., Vanlandingham D.L., Huang Y.J., Lounibos L.P., Mohamed Ali S., Nougaière A., de Lamballerie X., Failloux A.B. Chikungunya virus transmission potential by local *Aedes* mosquitoes in the Americas and Europe. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(5):e0003780. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003780.
- Vega-Rúa A., Zouache K., Girod R., Failloux A.B., Lourenço-de-Oliveira R. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *A. albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. *J. Virol.* 2014; 88(11):6294–306. DOI: 10.1128/jvi.00370-14.
- McFarlane M., Arias-Goeta C., Martin E., O'Hara Z., Lulla A., Mousson L., Rainey S.M., Misbah S., Schnettler E., Donald C.L., Merits A., Kohl A., Failloux A.B. Characterization of *Aedes aegypti* innate-immune pathways that limit Chikungunya virus replication. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(7):e2994. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002994.
- Agarwal A., Dash P.K., Singh A.K., Sharma S., Gopalan N., Rao P.V., Parida M.M., Reiter P. Evidence of experimental vertical transmission of emerging novel ECSA genotype of Chikungunya virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(7):e2990. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002990.
- Petitdemange C., Wauquier N., Vieillard V. Control of immunopathology during Chikungunya virus infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015; 135(4):846–55. DOI: 10.1016/j.jaci.2015.01.039.
- Issac T.H., Tan E.L., Chu J.J. Proteomic profiling of Chikungunya virus-infected human muscle cells: reveal the role of cytoskeleton network in Chikungunya virus replication. *J. Proteomics.* 2014; 108:445–64. DOI: 10.1016/j.jprot.2014.06.003.
- Chen W., Foo S.S., Sims N.A., Herrero L.J., Walsh N.C., Mahalingam S. Arthritogenic alphaviruses: new insights into arthritis and bone pathology. *Trends Microbiol.* 2015; 23:35–43. DOI: 10.1016/j.tim.2014.09.005.
- Chusri S., Siripaitoon P., Hirunprat S., Silpapojakul K. Case report of neuro-Chikungunya in Southern Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2011; 85:386–9. DOI: 10.4269/ajtmh.2011.10-0725.
- Grivard P., Le Roux K., Laurent P., Fianu A., Perrau J. Molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection. *Pathol. Biol.* 2007; 55:490–4. DOI: 10.1016/j.patbio.2007.07.002.
- Wanlapakorn N., Thongmee T., Linsuwanon P., Chattakul P., Vongpunswad S., Payungporn S., Poovorawan Y. Chikungunya outbreak in Bueng Kan Province, Thailand, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(8):1404–6. DOI: 10.3201/eid2008.140481.
- Yao X.H., Zhang H.L., Wang P.Y., Mansuy J.M., Grouteau E., Mengelle C., Claudet I., Izopet J. Chikungunya in the Caribbean as threat to Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20:1423–5. DOI: 10.3201/eid2008.140650.
- Faraji A., Egizi A., Fonseca D.M., Unlu I., Crepeau T., Healy S.P., Gaugler R. Comparative host feeding patterns of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*, in urban and suburban Northeastern USA and implications for disease transmission. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(8):e3037. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003037.
- Faria N.R., Lourenço J., de Cerqueira E.M., de Lima M.M., Pybus O., Alcántara L.C.J. Epidemiology of Chikungunya virus in Bahia, Brazil, 2014–2015. *PLoS Curr.* 2016; 8. pii: ecurrents.outbreaks.c97507e3e48efb946401755d468c28b2. DOI: 10.1371/currents.outbreaks.c97507e3e48efb946401755d468c28b2.
- Requena-Méndez A., García C., Aldasoro E., Vicente J.A., Martínez M.J., Pérez-Molina J.A., Calvo-Cano A., Franco L., Parrón I., Molina A., Ruiz M., Álvarez J., Sánchez-Seco M.P., Gascón J. Cases of Chikungunya virus infection in travellers returning to Spain from Haiti or Dominican Republic, April–June 2014. *Euro Surveill.* 2014; 19(28):20853. DOI: 10.2807/1560-7917.es2014.19.28.20853.
- Kam Y.W., Pok K.Y., Eng K.E., Tan L.K., Kaur S., Lee W.W., Leo Y.S., Ng L.C., Ng L.F. Sero-prevalence and cross-reactivity of Chikungunya virus specific anti-E2EP3 antibodies in arbovirus-infected patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(1):e3445. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003445.
- Thiberville S.D., Moyen N., Dupuis-Maguiraga L., Nougaière A., Gould E.A., Roques P., de Lamballerie X. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral Res.* 2013; 99(3):345–70. DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.06.009.
- Broeckel R., Haese N., Messaoudi I., Streblow D.N. Nonhuman primate models of Chikungunya virus infection and dis-

ease (CHIKV NHP Model). *Pathogens*. 2015; 4(3):662–81. DOI: 10.3390/pathogens4030662.

40. De Lamballerie X., Boisson V., Reyner J.C., Enault S., Charrel R.N. On Chikungunya acute infection and chloroquine treatment. *Vector. Borne. Zoonotic. Dis.* 2008; 8:837–9. DOI: 10.1089/vbz.2008.0049.

41. Hawman D.W., Stoemer K.A., Montgomery S.A., Pal P., Oko L., Diamond M.S., Morrison T.E. Chronic Joint Disease caused by persistent Chikungunya virus infection is controlled by the adaptive immune response. *J. Virol.* 2013; 87:13878–88. DOI: 10.1128/JVI.02666-13.

42. Solignat M., Cay B., Higgs S., Briant L., Devaux C. Replication cycle of Chikungunya: a re-emerging arbovirus. *Virology*. 2009; 393:183–97. DOI: 10.1016/j.virol.2009.07.024.

43. Pal P., Fox J.M., Hawman D.W., Huang Y.J., Messaoudi I., Kreklywich C., Denton M., Legasse A.W., Smith P.P., Johnson S., Axthelm M.K., Vanlandingham D.L., Streblow D.N., Higgs S., Morrison T.E., Diamond M.S. Chikungunya viruses that escape monoclonal antibody therapy are clinically attenuated, stable, and not purified in mosquitoes. *J. Virol.* 2014; 88(15):8213–26. DOI: 10.1128/jvi.01032-14.

**Authors:**

*Sizikova T.E., Sakharov R.V., Pistsov M.N., Pashchenko Yu.I., Lebedev V.N., Borisevich S.V.* 48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Sergiev Possad, 141306, Russian Federation. E-mail: 48cnii@mil.ru.

**Об авторах:**

*Сизикова Т.Е., Сахаров Р.В., Писцов М.Н., Пащенко Ю.И., Лебедев В.Н., Борисевич С.В.* 48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации. Российская Федерация, 141306, Сергиев Посад. E-mail: 48cnii@mil.ru.

Поступила 02.11.18.

Отправлена на доработку 18.01.19.

Принята к публ. 08.08.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-34-42

УДК 616.98:579.842.23(517.3)

С.В. Балахонов<sup>1</sup>, М.Б. Ярыгина<sup>1</sup>, А.С. Гладких<sup>1</sup>, Л.В. Миронова<sup>1</sup>, С.И. Феранчук<sup>1</sup>, Н.О. Бочалгин<sup>1</sup>,  
Е.Н. Рождественский<sup>2</sup>, С.А. Витязева<sup>1</sup>, Б. Нацагдорж<sup>3</sup>, Д. Цэрэнноров<sup>3</sup>, Н. Цогбадрах<sup>3</sup>, С.А. Косилко<sup>1</sup>,  
В.М. Корзун<sup>1</sup>

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS*, ВЫДЕЛЕННЫХ НА МОНГОЛЬСКОЙ ТЕРРИТОРИИ ТРАНСГРАНИЧНОГО САЙЛЮГЕМСКОГО ПРИРОДНОГО ОЧАГА ЧУМЫ

<sup>1</sup> ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт», Иркутск, Российская Федерация;

<sup>2</sup> ФКУЗ «Алтайская противочумная станция», Горно-Алтайск, Российская Федерация;

<sup>3</sup> Национальный центр по изучению зоонозных инфекций, Улаанбаатар, Монголия

**Цель** – изучение филогенетической принадлежности и родственных связей штаммов чумного микроба, изолированных из полевого материала в ходе эпизоотологического обследования монгольской части трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы. **Материалы и методы.** MLVA25-типирование проведено на 81 штамме чумного микроба, 55 из которых изолированы в 2017–2018 гг. на территории монгольской части трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы. В качестве группы сравнения использованы штаммы возбудителя чумы, выделенные в природных очагах Северо-Западной Монголии и Южной Сибири в разные годы. Проведено полногеномное секвенирование 21 штамма чумного микроба основного подвида, выделенных в Монголии в 2018 и 1988–1990 гг. и в Российской Федерации (Горный Алтай) в 2012–2016 гг. SNP-типирование выполнялось на основании анализа полных геномов штаммов *Yersinia pestis*, определенных в настоящем исследовании, а также геномов, размещенных в международной базе данных GenBank. Поиск однонуклеотидных полиморфизмов в геномах чумного микроба осуществлялся двумя способами: с помощью программы snippy v. 4.3.5 и с использованием пакета mummer v. 3.1 и ряда авторских скриптов. Филогенетическая реконструкция выполнялась с использованием метода RAxML. **Результаты и обсуждение.** По результатам MLVA25 *Y. pestis* subsp. *pestis* выявлено, что штаммы, изолированные в монгольской и российской частях Сайлюгемского и Хуух-Сэрх-Мунх-Хаирханского природных очагов, входят в один кластер. При SNP-типировании изученные изоляты с монгольской и российской территорий группируются с высоким уровнем достоверности в филогенетическую линию 4.ANT, что свидетельствует о генетическом сходстве указанных групп патогена. Данные MLVA- и SNP-типирования показывают незначительную вариабельность возбудителя чумы на территории монгольской части трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы. На основании проведенного исследования и результатов эпизоотологического мониторинга приграничных территорий России и Монголии можно сделать предположение о постепенном широком проникновении *Y. pestis* subsp. *pestis* в поселения, преимущественно, серого сурка в Юго-Восточном Алтае из Северо-Западной Монголии.

**Ключевые слова:** *Yersinia pestis*, MLVA25-типирование, SNP-типирование, трансграничный Сайлюгемский природный очаг чумы.

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

Для цитирования: Балахонов С.В., Ярыгина М.Б., Гладких А.С., Миронова Л.В., Феранчук С.И., Бочалгин Н.О., Рождественский Е.Н., Витязева С.А., Нацагдорж Б., Цэрэнноров Д., Цогбадрах Н., Косилко С.А., Корзун В.М. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Yersinia pestis*, выделенных на монгольской территории трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 3:34–42. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-34-42

S.V. Balakhonov<sup>1</sup>, M.B. Yarygina<sup>1</sup>, A.S. Gladkikh<sup>1</sup>, L.V. Mironova<sup>1</sup>, S.I. Feranchuk<sup>1</sup>, N.O. Bochalgin<sup>1</sup>,  
E.N. Rozhdestvensky<sup>2</sup>, S.A. Vityazeva<sup>1</sup>, B. Natsagdorzh<sup>3</sup>, D. Tserennorov<sup>3</sup>, N. Tsogbadrakh<sup>3</sup>,  
S.A. Kosilko<sup>1</sup>, V.M. Korzun<sup>1</sup>

## Molecular-Genetic Characteristics of *Yersinia pestis* Strains Isolated in the Mongolian Territory of Transboundary Sailyugem Natural Plague Focus

<sup>1</sup>Irkutsk Research Anti-Plague Institute, Irkutsk, Russian Federation;

<sup>2</sup>Altai Plague Control Station, Gorno-Altai, Russian Federation;

<sup>3</sup>National Centre for Zoonotic Infections, Ulaanbaator, Mongolia

**Abstract. Objective:** investigation of phylogenetic origin and affinity of *Yersinia pestis* strains isolated from field material collected during the epizootologic survey of the Mongolian part of trans-boundary Sailyugem natural plague focus. **Materials and methods:** MLVA25-typing of 81 *Y. pestis* strains, including 55 isolates from the Mongolian part of transboundary Sailyugem natural plague focus, collected in 2017–2018 was carried out. The plague agent strains isolated in different years in the natural foci of Northwest Mongolia and Southern Siberia were used as comparison group. Whole genome sequencing was performed for 21 *Y. pestis* strains subspecies *pestis* isolated in Mongolia in 2018 and 1988–1990 and in Gorny Altai of the Russian Federation in 2012–2016. SNP-typing was conducted on the basis of whole genomes

of *Y. pestis* strains identified in the current research and also genomes from GenBank international database. Search of single nucleotide polymorphisms in *Y. pestis* genomes was carried out in two ways: by means of snippy v. 4.3.5 software and using mummer v. 3.1 package and a set of the author’s scripts. Phylogenetic reconstruction was conducted with the help of RAxML method. **Results and discussion:** Results of MLVA25 typing of *Y. pestis* subsp. *pestis* demonstrated that the strains isolated in Mongolian and Russian parts of the Sailyugem and Khuukh-Serkh-Munkh-Khairkhan natural foci belong to one common cluster. SNP-typing placed the studied isolates from the Mongolian and Russian territories into 4.ANT phylogenetic line with high level of reliability which testifies to the genetic similarity of the specified pathogen groups. The data of MLVA- and SNP-typing showed insignificant variability of the plague agent in the territory of the Mongolian part of trans-boundary Sailyugem natural plague focus. On the basis of the conducted research and results of epizootiological monitoring of Russia and Mongolia border territories it is possible to draw a conclusion on gradual wide penetration of *Y. pestis* subsp. *pestis* mainly into grey marmot settlements in Southeast Altai from Northwest Mongolia.

**Key words:** *Yersinia pestis*, MLVA25-typing, SNP-typing, trans-boundary Sailyugem natural plague focus.

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

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

**Citation:** Balakhonov S.V., Yarygina M.B., Gladkikh A.S., Mironova L.V., Feranchuk S.I., Bochalgin N.O., Rozhdestvensky E.N., Vityazeva S.A., Natsagdorzh B., Tserenrorov D., Tsogbadrakh N., Kosilko S.A., Korzun V.M. Molecular-Genetic Characteristics of *Yersinia pestis* Strains Isolated in the Mongolian Territory of Transboundary Sailyugem Natural Plague Focus. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 3:34–42. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-34-42

Received 17.06.19. Revised 05.07.19. Accepted 12.08.19.

Трансграничный Сайлюгемский природный очаг чумы располагается по обе стороны государственной границы Российской Федерации (РФ) и Монголии на севере Центрально-Азиатской зоны природной очаговости чумы. Общая суммарная площадь очага составляет около 28600 км<sup>2</sup>, из которых примерно 17 тыс. км<sup>2</sup> приходится на территорию Монголии. Эпизоотическая активность по чуме в очаге впервые зарегистрирована в 1953 г. на монгольской части очага, позднее – в 1961 г. на территории РФ. Однако эпидпотенциал данного очага оценивался длительное время как невысокий, так как при микробиологическом мониторинге регистрировалось выделение штаммов чумного микроба только алтайского и в редких случаях улэгейского подвидов, обладающих избирательной вирулентностью и, соответственно, низкой эпидемиологической значимостью [1]. С 2012 г. на российской части Сайлюгемского очага обнаружены, преимущественно в популяциях серого сурка, эпизоотии чумы, вызванные *Yersinia pestis* основного подвида [2]. Дальнейшее распространение на очаговой территории данного высоковирулентного таксона возбудителя вызвало появление манифестных спорадических случаев чумы среди людей в Кош-Агачском районе Республики Алтай [3].

**Цель работы** – изучение филогенетической принадлежности и родственных связей штаммов чумного микроба, изолированных из полевого материала в ходе эпизоотологического обследования монгольской части трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы.

### Материалы и методы

MLVA25-типирование проведено на 81 штамме чумного микроба, 55 из которых изолированы в 2017–2018 гг. на территории монгольской части трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы (таблица). В качестве группы сравнения использованы штаммы возбудителя чумы, выделенные в при-

родных очагах чумы Северо-Западной Монголии и Южной Сибири в разные годы и хранящиеся в коллекции музея живых культур Иркутского научно-исследовательского противочумного института. Для контроля использовался штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ.

**MLVA25-типирование.** Для MLVA25-типирования (Multiple-Locus variable number tandem repeat analysis, мультилокусный анализ варибельного числа тандемных повторов по 25 варибельным локусам) экстракцию ДНК осуществляли с помощью набора реагентов «Рибо-преп» (Россия). Анализ проводили, как описано ранее [4–6]. На основании полученных данных методом попарного невзвешенного кластрирования с арифметическим усреднением (Unweighted pair-group method using arithmetic averages, UPGMA)

**Количество, происхождение и год выделения использованных в работе штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis***

**The number, origin, and the year of isolation of *Y. pestis* subsp. *pestis* strains utilized in the study**

Природный очаг чумы Natural plague focus	Год выделения Year of isolation	Кол-во штаммов Number of strains
Монгольская часть Сайлюгемского очага Mongolian part of the Sailyugem focus	2017	8
	2018	47
Российская часть Сайлюгемского очага (Горно-Алтайский высокогорный очаг) Russian part of the Sailyugem focus (Gorno-Altai high-mountain focus)	2012	1
	2014	2
	2015	2
	2016	3
	2017	5
	2018	3
Хуух-Сэрх-Мунх-Хаирханский очаг Khuukh-Serkh-Munkh-Khairkhan focus	1988	3
	1990	1
Тувинский горный очаг Tuva mountain focus	1967	1
	1994	1
	2015	1
	2016	3

с помощью компьютерной программы Bionumerics 7.6 построена дендрограмма, показывающая филогенетические связи штаммов возбудителя чумы.

**Полногеномное SNP-типирование.** Для проведения полногеномного секвенирования геномная ДНК 21 штамма *Y. pestis* выделена с помощью набора «Dneasy Blood & Tissue Kit» (Германия) согласно инструкции производителя. Геномные библиотеки созданы по протоколу для приготовления ДНК-библиотек с реагентами Nextera XT DNA Library preparation kit (США). Секвенирование произведено на приборе Illumina MiSeq™ system (США) с использованием набора V3, дающего прочтения 2x300 нуклеотидов.

Первичный процессинг исходных данных произведен программно-аппаратным комплексом Illumina MiSeq. Сборку контигов *de novo* осуществляли с помощью программы SPAdes 3.13.0 [7] с выставлением строгих параметров для максимальной корректности сборок.

Для проведения полногеномного SNP-типирования использовано два подхода. Первый включал в себя выравнивание прочтений на геном референсного штамма *Y. pestis* CO92 и поиск полиморфизмов с помощью программы snippy v. 4.3.5 [8], разработанной специально для поиска SNP в коровом геноме гаплоидных организмов. Второй подход заключался в картировании собранных *de novo* контигов на геном референсного штамма *Y. pestis* CO92 с помощью пакета mummer v. 3.1 [9] и ряда авторских скриптов, разработанных на bash, python и C++. Для реализации подхода сначала составляли промежуточные файлы со списками полиморфизмов для каждого штамма, которые далее преобразовывали в единое выравнивание. Из общего списка исключены 28 гомоплазийных полиморфизмов а также те, расстояние между которыми в геноме составляло менее 200 нуклеотидов. Таким образом, алгоритм позволил избежать включения в анализ как ошибок секвенирования, так и рекомбинантных событий, фильтруя близко расположенные друг к другу SNP. В анализ, помимо полученных в ходе данной работы геномов штаммов чумного микроба, включены 28 геномов *Y. pestis*, депонированных в GenBank [10]. Авторские скрипты депонированы в хранилище открытого доступа Zenodo (DOI: 10.5281/zenodo.3264013).

Филогенетическая реконструкция выполнялась с использованием метода RAxML в программе RAxML v. 8.2.4 [11] с использованием модели GTR с учетом гамма-распределения. Оценку достоверности узлов ветвления проводили путем запуска бутстреп-анализа с 1000х итераций. Визуализация проводилась в программе FigTree 1.4.2 [12], для укоренения дерева использовали штамм *Y. pestis* Pestoides F как максимально дистанцированный вариант в выборке.

## Результаты и обсуждение

MLVA25-типирование проведено на 81 изоляте чумного микроба, их филогенетическое

родство представлено на дендрограмме (рис. 1). Исследованные штаммы делятся на два кластера. Кластер А сформирован исключительно штаммами *Y. pestis* subsp. *pestis*, изолированными в Тувинском природном очаге России. Кластер В образован двумя ветвями. Первая из них – VI – представлена 10 штаммами чумного микроба основного, эпидемически значимого подвида, из которых 8 – выделены в монгольской части в 2017 г. и 2 – в 2014 г. в российской части Сайлюгемского природного очага. Вторая ветвь – VII – состоит из двух групп. В группу VII<sub>1</sub> входят три изолята *Y. pestis* subsp. *pestis*, выделенные в 1988 г. из природного очага чумы Хуух-Сэрх-Мунх-Хаирхан, расположенного в Северо-Западной Монголии в отрогах хребта Монгольского Алтая (Дэлуун-сомон, Баян-Улгийский аймак Монголии). Группа VII<sub>2</sub> включает 61 штамм *Y. pestis* subsp. *pestis*, изолированный в монгольской (2018 г.) и российской (2012, 2015–2018 гг.) частях Сайлюгемского природного очага чумы.

Кластер В представляет собой однородный комплекс MLVA25-генотипов штаммов чумного микроба, изолированных как на монгольской, так и на российской частях трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы в разные годы. Следует акцентировать внимание на том, что в него входят и штаммы, изолированные в 1988 г. в Хуух-Сэрх-Мунх-Хаирханском природном очаге, который расположен примерно в 200 км от энзоотической территории Сайлюгемского природного очага и относится к группе очагов Монгольского Алтая. Между штаммами, входящими в кластер В, проявляются минимальные различия по трем локусам: *yp2769ms06* (7 и 8 повторов), *yp1335ms46* (16–18) и *yp4280ms62* (7–17).

Между кластерами А и В выявлены различия по семи локусам: *yp2769ms06* (7 и 8 повторов), *yp3057ms09* (9 и 37), *yp0559ms15* (9 и 10), *yp1335ms46* (16–18), *yp3060ms56* (8 и 9), *yp4280ms62* (7–17) и *yp1580ms70* (6 и 7).

Таким образом, кластер А включает только штаммы чумного микроба из Тувинского, а кластер В – только из Сайлюгемского и Хуух-Сэрх-Мунх-Хаирханского природных очагов. Это свидетельствует о наличии определенных генетических различий между возбудителем чумы основного подвида, циркулирующим с одной стороны в Тувинском, а с другой – в Сайлюгемском и Хуух-Сэрх-Мунх-Хаирханском очагах.

При проведении SNP-типирования для установления филогенетического положения штаммов из Сайлюгемского природного очага чумы применен подход, описанный ранее [13]. Получена матрица полиморфизмов длиной 636 нуклеотидов. При этом не выявлено SNP, дифференцирующих штаммы чумного микроба основного подвида, выделенные в Монголии в 2018 г. и в Российской Федерации (Горный Алтай) в 2012–2016 гг., в том числе и изоляты, полученные в период эпидемических

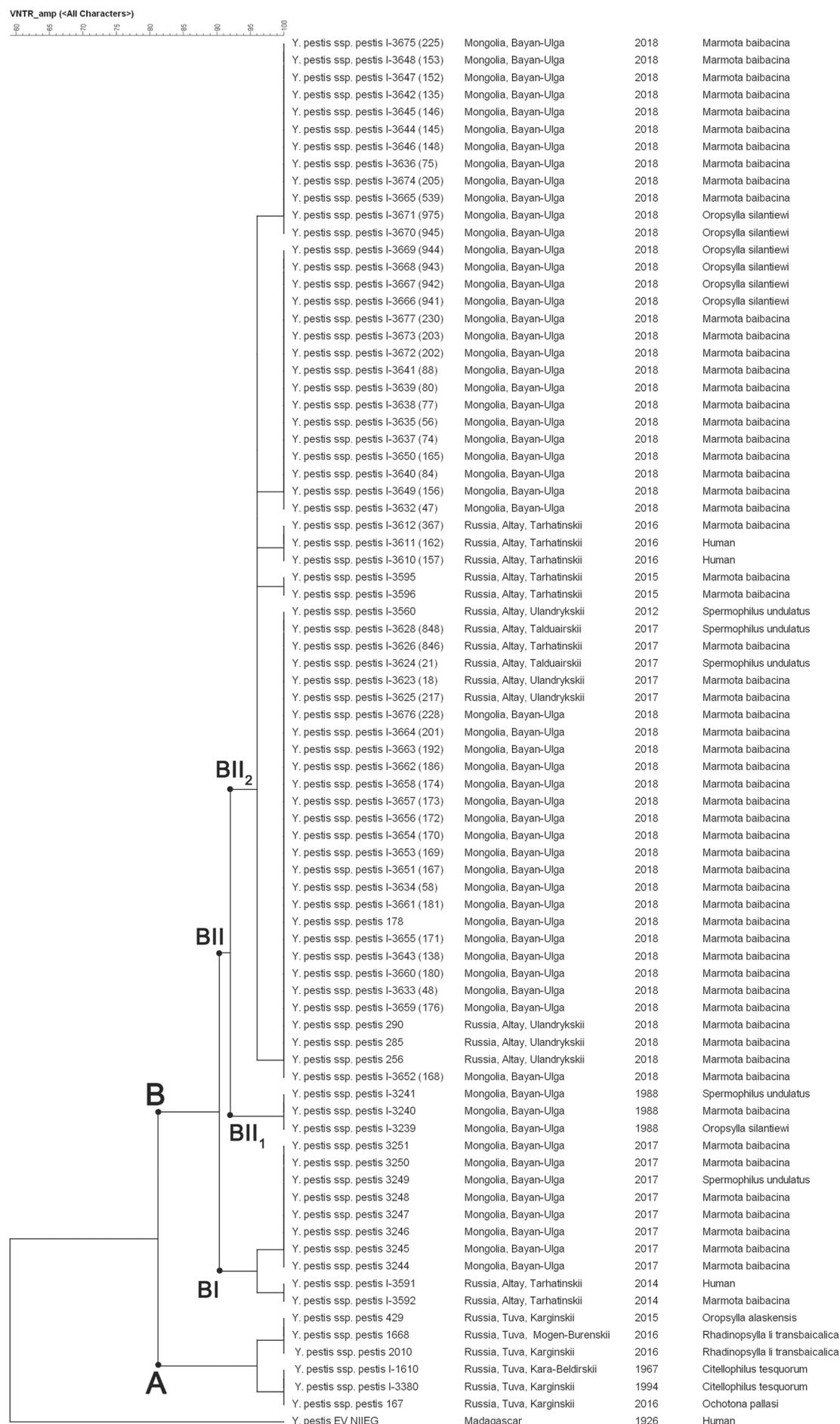


Рис. 1. Дендрограмма, иллюстрирующая степень родства исследованных штаммов *Y. pestis* subsp. *pestis*, изолированных в Тувинском (кластер А) и Сайлюгемском (кластер В) природных очагах чумы, построенная на основании MLVA25-типирования методом попарного невзвешенного кластрирования с арифметическим усреднением (UPGMA)

Fig. 1. Dendrogram demonstrating the degree of affinity between the investigated *Y. pestis* subsp. *pestis* strains isolated in Tuva (cluster A) and Sailyugem (cluster B) natural plague foci, constructed on the basis of MLVA25-typing using paired unweighted clustering with arithmetic mean (UPGMA)

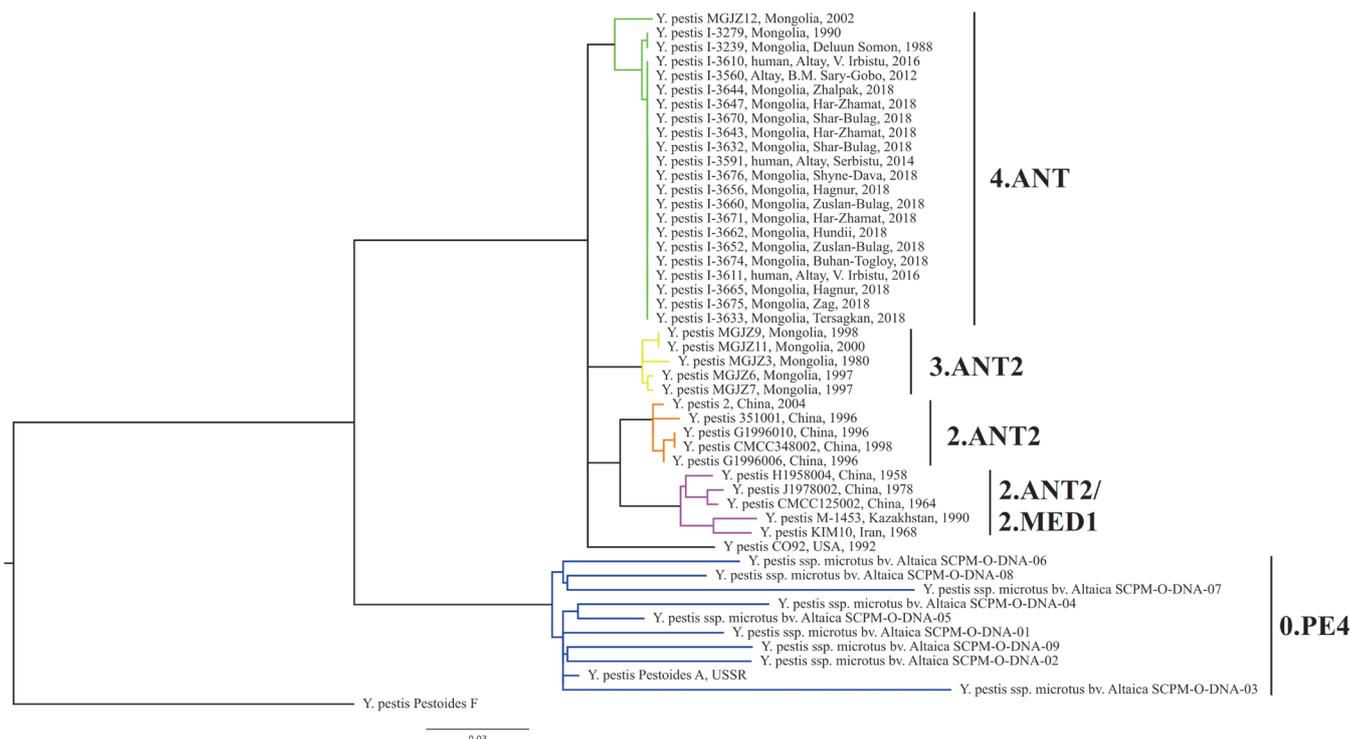


Рис. 2. Филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* на основании 636 коровых SNP с применением опубликованных ранее алгоритмов. Дендрограмма построена методом RaxML с использованием модели GTR с учетом гамма-распределения. Цветом выделены ветви, принадлежащие к разным филогенетическим линиям. В качестве базальной ветви выбран штамм *Y. pestis* Pestoides F

Fig. 2. The phylogenetic analysis of *Y. pestis* strains on the basis of 636 core SNPs with application of the algorithms published earlier. Dendrogram is constructed by RaxML method using GTR model, taking into account the  $\gamma$ -distribution. The branches belonging to different phylogenetic lines are colored. *Y. pestis* Pestoides F strain is selected as a basal branch

осложнений. При филогенетической реконструкции указанные штаммы группируются вместе с изолятами *Y. pestis* subsp. *pestis* I-3239 и *Y. pestis* subsp. *pestis* I-3279, формирующими на древе параллельный кластер с дистанцией в 2 SNP, а также с *Y. pestis* MGJZ12, выделенным в 2002 г. на территории Баян-Улгийского аймака (Монголия), образуя филогенетическую линию 4.ANT (рис. 2). Штаммы *Y. pestis* subsp. *pestis* I-3239 и *Y. pestis* subsp. *pestis* I-3279 изолированы специалистами Иркутского НИПЧИ и Алтайской ПЧС на фоне разлитой эпизоотии чумы в 1988 и 1990 гг. соответственно. Изолят 1988 г. (*Y. pestis* subsp. *pestis* I-3239) выделен в Хуух-Сэрх-Мунх-Хаирханском природном очаге, примерно в 200 км от энзоотичной территории трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы. Штамм *Y. pestis* subsp. *pestis* I-3279 изолирован в 1990 г. примерно в 150 км от озера Толбо-Нуур. В эти же годы в данной местности отмечались эпидемические осложнения по чуме среди населения Баян-Улгийского аймака, в том числе с летальным исходом. Выделенные ранее на территории Средней Азии, Монголии и Китая штаммы основного подвида *Y. pestis* формируют на древе филогенетические линии 3.ANT, 2.ANT, 2.MED, что согласуется с полученными ранее данными инфравидовой дифференциации возбудителя чумы [10, 14]. Штаммы неосновных подвидов образуют удаленный кластер с высокой вариабельностью вну-

три него (рис. 2). Все кластеры имеют высокую достоверность в ключевых узлах бифуркации.

Для уточнения клональной идентичности исследуемых штаммов *Y. pestis* и подтверждения филогенетических взаимосвязей применен авторский подход для выявления SNP. Сформированная матрица полиморфизмов составила 1363 нуклеотида. На дендрограмме, построенной с использованием данного подхода, прослеживаются те же закономерности топологии – все штаммы выборки дифференцируются на филогенетические линии 0.PE, 2.MED, 2.ANT, 3.ANT и 4.ANT. При этом распределение на генотипы выделенных ранее на территории Средней Азии, Монголии и Китая штаммов *Y. pestis* основного подвида согласуется с данными *Y. Cui et al.* [10].

Штаммы с монгольской территории трансграничного Сайлюгемского природного очага чумы, выделенные в 2018 г. из Горно-Алтайского высокогорного природного очага чумы РФ (2012, 2014, 2016 гг.), а также *Y. pestis*, изолированные на территории Монголии ранее (*Y. pestis* MGJZ12, 2002; *Y. pestis* I-3239 и I-3279, 1988 и 1990 гг.), группируются с высоким уровнем достоверности в филогенетическую линию 4.ANT. Однако, в отличие от предыдущего подхода к типированию, при данном варианте анализа изоляты 2018 г. с территории Монголии и России, отнесенные к группе I (рис. 3), демонстрируют внутригрупповую вариабельность с

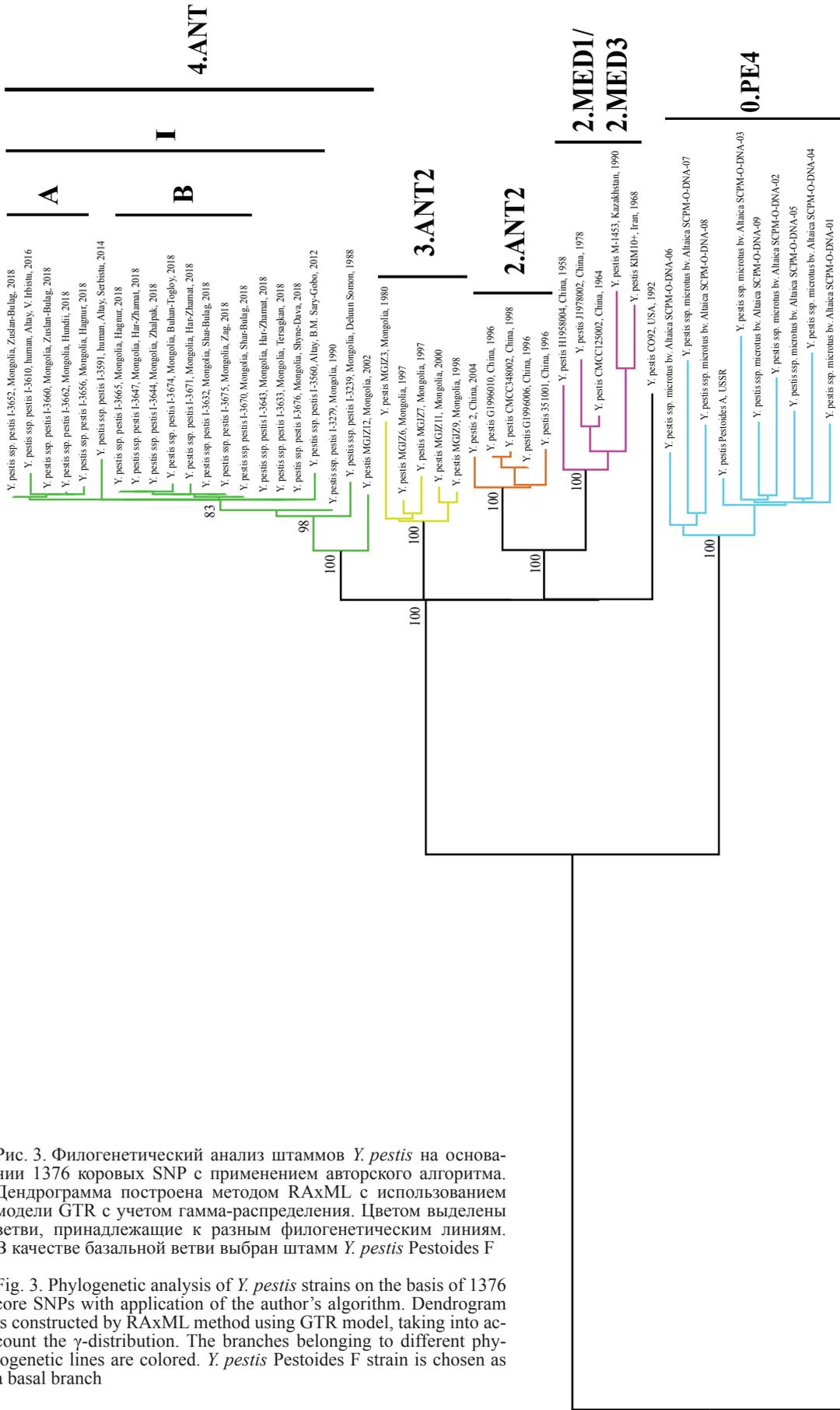


Рис. 3. Филогенетический анализ штаммов *Y. pestis* на основании 1376 коровых SNP с применением авторского алгоритма. Дендрограмма построена методом RAxML с использованием модели GTR с учетом гамма-распределения. Цветом выделены ветви, принадлежащие к разным филогенетическим линиям. В качестве базальной ветви выбран штамм *Y. pestis* Pestoides F

Fig. 3. Phylogenetic analysis of *Y. pestis* strains on the basis of 1376 core SNPs with application of the author's algorithm. Dendrogram is constructed by RAxML method using GTR model, taking into account the  $\gamma$ -distribution. The branches belonging to different phylogenetic lines are colored. *Y. pestis* Pestoides F strain is chosen as a basal branch

межштаммовыми различиями, составляющими от 0 до 20 SNP. Одна из сформированных подгрупп образована тремя штаммами *Y. pestis* с идентичными SNP-профилями (I-3633, I-3643, I-3676), лежащими в основании группы I. Далее прослеживается ветвление дендрограммы с формированием двух подгрупп IA и IB и ряда уникальных генотипов в виде отдельных ветвей. Базальная ветвь линии 4.ANT представлена *Y. pestis* MGJZ12.

Анализ географической приуроченности показал, что штаммы, лежащие в основании группы I, равномерно распределены на обследованной приграничной территории монгольской части Сайлюгемского природного очага и обнаруживаются на восточном (Шине-Дава), центральном (Терсагкан) и западном (Хар-Жамат) участках (рис. 4). Отдельные ветви, отходящие от основания группы, формируют два штамма *Y. pestis* subsp. *pestis*: I-3560 – впервые выделенный в Горно-Алтайском высокогорном природном очаге чумы в 2012 г. от трупа длиннохвостого суслика, и I-3591 – от больного человека в том же очаге в 2014 г. Различия их с *Y. pestis* из основания группы составляют 10–15 SNP. Что касается идентифицированных подгрупп (IA и IB), то выявлены некоторые особенности географического распределения их на территории монгольской части очага. Так, в западных секторах доминируют штаммы, отнесенные к подгруппе IA, тогда как в центральном и восточном участках обнаруживаются *Y. pestis* subsp. *pestis*, отнесенные к обеим подгруппам.

Таким образом, объединение в линию 4.ANT античного биовара исследованных штаммов чумного микроба *Y. pestis* subsp. *pestis*, выделенных на при-

граничной с Россией территории монгольской части Сайлюгемского природного очага и на фоне обострения эпидемиологической ситуации на российской территории, дает основание сделать заключение о генетическом сходстве указанных вариантов патогена. Выявленная незначительная вариабельность геномов штаммов чумного микроба на территории Сайлюгемского природного очага, по данным MLVA- и SNP-типирования, свидетельствует в пользу определенной гетерогенности возбудителя. Известно, что чумной микроб относится к группе генетически мноморфных патогенов с невысокой скоростью накопления мутаций в популяциях [15]. Увеличение числа генетических событий, как правило, происходит во время эпидемических осложнений при интенсивном пассаже возбудителя через восприимчивый организм [10] или в период активных разлитых эпизоотий с вовлечением различных видов переносчиков и носителей инфекции. Изменения отдельных элементов паразитарной системы очага, происходящие в современный период под действием климатических факторов, может способствовать повышению гетерогенности популяции чумного микроба.

На основании данного исследования и результатов эпизоотологического мониторинга приграничных территорий России и Монголии, полученных в последние годы, можно сделать обоснованное предположение, что спорадические случаи заболеваний людей чумой в Кош-Агачском районе Республики Алтай и обнаружение разлитых эпизоотий, вызванных возбудителем чумы основного подвида, преимущественно в поселениях серого сурка на разных участках трансграничного Сайлюгемского природ-

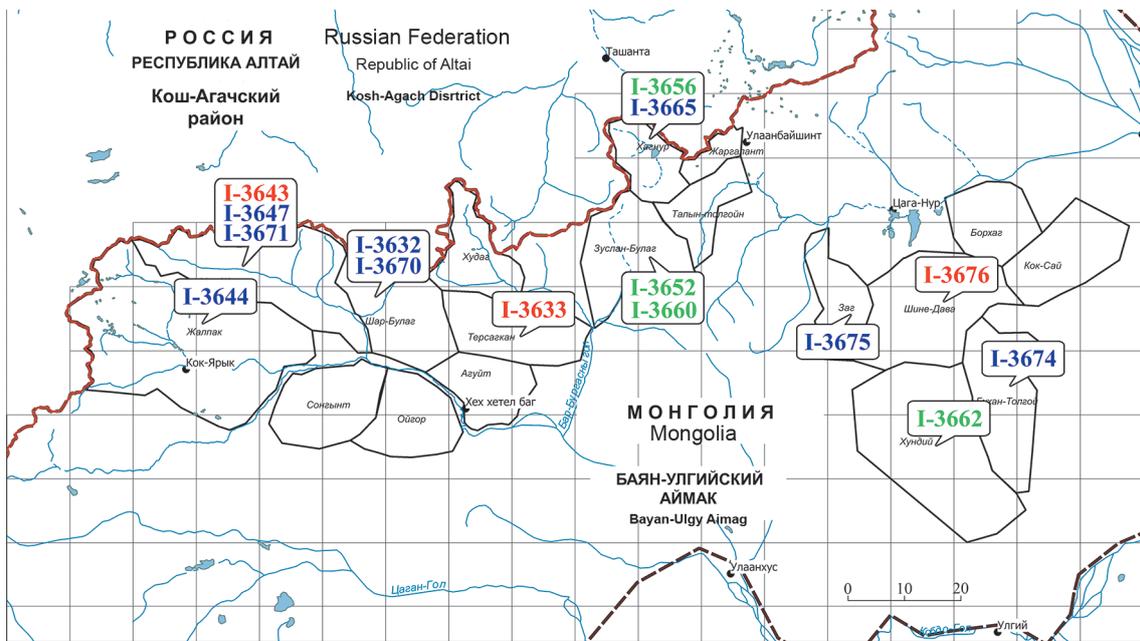


Рис. 4. Географическая приуроченность генотипов штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT, выделенных в 2018 г. на монгольской территории Сайлюгемского природного очага чумы (зеленым цветом обозначены штаммы из подгруппы IA, синим – из подгруппы IB, красным – из основания группы I)

Fig. 4. Geographical confinement of the genotypes of *Y. pestis* line 4.ANT strains isolated in 2018 in the Mongolian territory of the Sailuigem natural plague focus (green color – the strains of IA subgroup, dark blue – IB subgroup, red – from the basis of I group)

ного очага чумы, представляют собой следствие единого процесса. Последний заключается в постепенном (в конце XX – начале XXI вв.) широком проникновении высоковирулентного эпидемически значимого возбудителя *Y. pestis* subsp. *pestis* в поселения носителей чумы в Юго-Восточном Алтае из Северо-Западной Монголии. Это событие произошло на фоне действия комплекса биотических и абиотических факторов, вызвавших значительную трансформацию в экологической системе Сайлюгемского трансграничного природного очага чумы, однако связанные с этими изменениями закономерности требуют, безусловно, дальнейшего более углубленного изучения.

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

### Список литературы

1. Балахонов С.В., Корзун В.М., редакторы. Горно-Алтайский природный очаг чумы: ретроспективный анализ, эпизоотологический мониторинг, современное состояние. Новосибирск: Наука-Центр; 2014. 272 с.
2. Балахонов С.В., Афанасьев М.В., Шестопалов М.Ю., Остяк А.С., Витязева С.А., Корзун В.М., Вержуцкий Д.Б., Михайлов Е.П., Мищенко А.И., Денисов А.В., Ивженко Н.И., Рождественский Е.Н., Висков Е.Н., Фомина Л.А. Первый случай выделения *Yersinia pestis* subsp. *pestis* в Алтайском горном природном очаге чумы. Сообщение 1. Микробиологическая характеристика, молекулярно-генетическая и масс-спектрометрическая идентификация изолята. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 1:60–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-60-65.
3. Балахонов С.В., Попова А.Ю., Мищенко А.И., Михайлов Е.П., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Денисов А.В., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Щуцников Л.В., Зарубин И.В., Семёнова Ж.Е., Маденова Н.М., Дюсенбаев Д.К., Ярыгина М.Б., Чипанин Е.В., Косилко С.А., Носков А.К., Корзун В.М. Случай заболевания человека чумой в Кощ-Агачском районе Республики Алтай в 2015 г. Сообщение 1. Клинико-эпидемиологические и эпизоотологические аспекты. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 1:55–60. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-55-60.
4. Klevytska A.M., Price L.B., Schupp J.M., Worsham P.L., Wong J., Keim P. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39:3179–85. DOI: 10.1128/jcm.39.9.3179-3185.2001
5. Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoed F., Ramiise V., Sylvestre P., Benson G., Ramiise F., Vergnaud G. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol.* 2001; 1:2. DOI: 10.1186/1471-2180-1-2.
6. Pourcel C., André-Mazeaud F., Neubauer H., Ramiise F., Vergnaud G. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol.* 2004; 4:22. DOI: 10.1186/1471-2180-4-22.
7. Nurk S., Bankevich A., Antipov D., Gurevich A.A., Korobeynikov A., Lapidus A., Prjibelski A.D., Pyshkin A., Sirotkin A., Sirotkin Y., Stepanauskas R., Clingenpeel S.R., Woyke T., McLean J.S., Lasken R., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. Assembling Genomes and Mini-metagenomes from Highly Chimeric Reads. *J. Comput Biol.* 2013; 20(10):714–37. DOI: 10.1089/cmb.2013.0084.
8. Seemann T. Snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads. 2015. [Электронный ресурс]. URL: <https://github.com/tseemann/snippy> (дата обращения 21.05.2019).
9. Kurtz S., Phillippy A., Delcher A.L., Smoot M., Shumway M., Antonescu C., Salzberg S.L. Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol.* 2004; 5(2):R12. DOI: 10.1186/gb-2004-5-2-r12.
10. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.
11. Stamatakis A. RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics.* 2014; 1; 30(9):1312–13. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu033.
12. Rambaut A. FigTree v1.4.2. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Computer program distributed by the author. 2010 (cited 21.05.2019). [Internet]. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
13. Eroshenko G.A., Popov N.V., Krasnov Ya.M., Nikiforov K.A., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Kuttyrev V.V. [Natural
12. Rambaut A. FigTree v1.4.2. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Computer program distributed by the author. 2010. [Электронный ресурс]. URL: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (дата обращения 21.05.2019).
13. Eroshenko G.A., Popov N.V., Krasnov Ya.M., Nikiforov K.A., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Kuttyrev V.V. Природный мегаочаг основного подвида *Yersinia pestis* античного биовара филогенетической ветви 4.ANT в Горном Алтае. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 2:49–56. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-2-49-56.
14. Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Носов Н.Ю., Куклева Л.М., Никифоров К.А., Оглодин Е.Г., Куттырев В.В. Совершенствование подвидовой классификации *Yersinia pestis* на основе данных полногеномного секвенирования штаммов из России и сопредельных государств. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 4:58–64. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-58-64.
15. Achtman M. Insights from genomic comparisons of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.* 2012; 367(1590):860–7. DOI: 10.1098/rstb.2011.0303.

### References

1. Balakhonov S.V., Korzun V.M., editors. [Gorno-Altai Natural Plague Focus: Retrospective Analysis, Epizootiological Monitoring, Current State]. Novosibirsk: "Nauka-Tsentr"; 2014. 272 p.
2. Balakhonov S.V., Afanas'ev M.V., Shestopalov M.Yu., Ostyak A.S., Vityazeva S.A., Korzun V.M., Verzhutsky D.B., Mikhailov E.P., Mishchenko A.I., Denisov A.V., Ivzhenko N.I., Rozhdestvensky E.N., Viskov E.N., Fomina L.A. [The First Case of *Yersinia Pestis* Subsp. *Pestis* Isolation in the Territory of Altai Mountain Natural Plague Focus. Communication 1. Microbiological Characteristics, Molecular-Genetic and Mass-Spectrometric Identification of the Isolate]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2013; 1:60–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-1-60-65.
3. Balakhonov S.V., Popova A.Yu., Mishchenko A.I., Mikhailov E.P., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Denisov A.V., Rozhdestvensky E.N., Bazarova G.Kh., Shchuchinov L.V., Zarubin I.V., Semenova Zh.E., Madenova N.M., Dyusenbaev D.K., Yarygina M.B., Chipanin E.V., Kosilko S.A., Noskov A.K., Korzun V.M. [A Case of Human Infection with Plague in the Kosh-Agach Region of the Republic of Altai in 2015. Communication 1. Clinical-Epidemiological and Epizootiological Aspects]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 1:55–60. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-55-60.
4. Klevytska A.M., Price L.B., Schupp J.M., Worsham P.L., Wong J., Keim P. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39:3179–85. DOI: 10.1128/jcm.39.9.3179-3185.2001
5. Le Flèche P., Hauck Y., Onteniente L., Prieur A., Denoed F., Ramiise V., Sylvestre P., Benson G., Ramiise F., Vergnaud G. A tandem repeats database for bacterial genomes: application to the genotyping of *Yersinia pestis* and *Bacillus anthracis*. *BMC Microbiol.* 2001; 1:2. DOI: 10.1186/1471-2180-1-2.
6. Pourcel C., André-Mazeaud F., Neubauer H., Ramiise F., Vergnaud G. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis*. *BMC Microbiol.* 2004; 4:22. DOI: 10.1186/1471-2180-4-22.
7. Nurk S., Bankevich A., Antipov D., Gurevich A.A., Korobeynikov A., Lapidus A., Prjibelski A.D., Pyshkin A., Sirotkin A., Sirotkin Y., Stepanauskas R., Clingenpeel S.R., Woyke T., McLean J.S., Lasken R., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. Assembling Genomes and Mini-metagenomes from Highly Chimeric Reads. *J. Comput Biol.* 2013; 20(10):714–37. DOI: 10.1089/cmb.2013.0084.
8. Seemann T. Snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads. 2015 (cited 20.05.2019). [Internet]. Available from: <https://github.com/tseemann/snippy>.
9. Kurtz S., Phillippy A., Delcher A.L., Smoot M., Shumway M., Antonescu C., Salzberg S.L. Versatile and open software for comparing large genomes. *Genome Biol.* 2004; 5(2):R12. DOI: 10.1186/gb-2004-5-2-r12.
10. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.
11. Stamatakis A. RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics.* 2014; 1; 30(9):1312–13. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu033.
12. Rambaut A. FigTree v1.4.2. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Computer program distributed by the author. 2010 (cited 21.05.2019). [Internet]. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
13. Eroshenko G.A., Popov N.V., Krasnov Ya.M., Nikiforov K.A., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Kuttyrev V.V. [Natural

Mega-Focus of *Yersinia pestis* Main Subspecies, Antique Biovar, Phylogenetic Line 4.ANT in Gorny Altai]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2018; 2: 49–56. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-2-49-56.

14. Eroshenko G.A., Krasnov Ya.M., Nosov N.Yu., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Oglodin E.G., Kutyrev V.V. [Updating of Intra-Specific *Yersinia pestis* Classification, Based on the Results of Whole-Genome Sequencing of the Strains from the Russian Federation and the Neighboring States]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2015; 4: 58–64. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-58-64.

15. Achtman M. Insights from genomic comparisons of genetically monomorphic bacterial pathogens. *Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.* 2012; 367(1590):860–7. DOI: 10.1098/rstb.2011.0303.

**Authors:**

*Balakhonov S.V., Yarygina M.B., Gladkikh A.S., Mironova L.V., Feranchuk S.I., Bochalgin N.O., Vityazeva S.A., Kosilko S.A., Korzun V.M.* Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.  
*Rozhdestvensky E.N.* Altai Plague Control Station. 2, Zavodskaya St.,

Gorno-Altaysk, 649002, Russian Federation. E-mail: chuma@mail.gorny.ru.  
*Natsagdorzh B., Tserennorov D., Tsogbadrakh N.* National Centre for Studies of Zoonotic Infections. 20 horo, Songinohajrhan mikrorajon, Ulaanbaatar, 18131, Mongolia. E-mail: tsogoo\_0210@yahoo.com.

**Об авторах:**

*Балахонов С.В., Ярыгина М.Б., Гладких А.С., Миронова Л.В., Феранчук С.И., Бочалгин Н.О., Витязева С.А., Косилко С.А., Корзун В.М.* Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилисера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

*Рождественский Е.Н.* Алтайская противочумная станция. Российская Федерация, 649002, Горно-Алтайск, ул. Заводская, 2. E-mail: chuma@mail.gorny.ru.

*Нацагдорж Б., Цэрэнноров Д., Цогбадрах Н.* Национальный центр по изучению зоонозных инфекций. Монголия, 18131, Улаанбаатар, Сонгинохайрхан микрорайон, 20 хоро. E-mail: tsogoo\_0210@yahoo.com.

Поступила 17.06.19.

Отправлена на доработку 05.07.19.

Принята к публ. 12.08.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-43-50

УДК 616.98:579.852.11

Е.И. Еременко, А.Г. Рязанова, С.В. Писаренко, Н.П. Буравцева, Г.А. Печковский, Л.Ю. Аксенова, О.В. Семенова, Н.Г. Варфоломеева, Т.М. Головинская, Д.К. Чмеренко, Д.А. Ковалев, А.М. Жиров, Н.А. Шапаков, А.Н. Куличенко

## НОВЫЕ ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО ТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ *BACILLUS ANTHRACIS*

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

**Цель** – выявление новых генетических маркеров для использования в молекулярном типировании *Bacillus anthracis*. **Материалы и методы.** Исследовали геномы 16 штаммов *B. anthracis* из коллекции ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт», 11 штаммов *B. anthracis* и 5 штаммов *Bacillus cereus* из GenBank. Использовали методы анализа *in vitro* и *in silico* канонических и полногеномных единичных нуклеотидных полиморфизмов (SNP), областей генома с варибельным числом tandemных повторов (VNTR). **Результаты и обсуждение.** У ряда штаммов *B. anthracis* главной генетической линии В в пределах гомологичных генов трицистронного оперона *gerH*, кодирующего белки, связанные прорастанием спор, имеются делеции и (или) замены единичных нуклеотидов. Гены *gerA* оперона содержат VNTR-локус *Bams34*, размеры генов у разных штаммов варьируют из-за разного числа tandemных повторов и наличия инделов, что предполагает варибельность белков GerA прорастания спор. В области обратного праймера у части из них имеются SNP или делеция, что делает невозможной ПЦР-амплификацию локуса *Bams34*. Идентифицированы не описанные VNTR-локус, SNP и индел в последовательностях плазмид *pXO1* и *pXO2*, а также SNP в хромосомном гене транспортера глицерол-3-фосфата. Сконструированы две пары ПЦР-праймеров к плазмидным областям, содержащим инделы. VNTR-локус, SNP и инделы в последовательностях плазмид *pXO1* и *pXO2* пригодны в качестве генетических маркеров для дифференциации типичных вирулентных диплазмидных штаммов по принадлежности к основным генетическим линиям *B. anthracis* А, В и С. Аллель Т SNP в пределах хромосомного гена *glpT* является специфичной для одного из двух штаммов, выделенных в ходе одной вспышки сибирской язвы, и отличает его от всех других штаммов *B. anthracis*.

**Ключевые слова:** *Bacillus anthracis*, молекулярное типирование, SNP, VNTR, инделы, главные генетические линии.

Корреспондирующий автор: Еременко Евгений Иванович, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Для цитирования: Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Писаренко С.В., Буравцева Н.П., Печковский Г.А., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Варфоломеева Н.Г., Головинская Т.М., Чмеренко Д.К., Ковалев Д.А., Жиров А.М., Шапаков Н.А., Куличенко А.Н. Новые генетические маркеры для молекулярного типирования штаммов *Bacillus anthracis*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 3:43–50. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-43-50

E.I. Eremenko, A.G. Ryazanova, S.V. Pisarenko, N.P. Buravtseva, G.A. Pechkovsky, L.Yu. Aksenova, O.V. Semenova, N.G. Varfolomeeva, T.M. Golovinskaya, D.K. Chmerenko, D.A. Kovalev, A.M. Zhiron, N.A. Shapakov, A.N. Kulichenko

## New Genetic Markers for Molecular Typing of *Bacillus anthracis* Strains

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

**Abstract. Objective:** Identification of new markers for the molecular typing of *Bacillus anthracis*. **Materials and methods.** The genomes of 16 *B. anthracis* strains from the collection of the Stavropol Research Anti-Plague Institute, 11 *B. anthracis* strains and 5 strains of *Bacillus cereus* from GenBank were investigated. The methods of *in vitro* and *in silico* analysis of canonical and whole-genome single nucleotide polymorphisms (SNP), genome regions with variable number of tandem repeats (VNTR) were used for the analysis. **Results and discussion.** It has been established that there are deletions and (or) SNPs in some of *B. anthracis* strains of the main genetic lineage B, within the homologous genes of the tri-cistronic operon *gerH*, which encodes spore germination proteins. *gerA* genes contain the *Bams34* VNTR locus, the sizes of genes in different strains vary due to the different number of tandem repeats and the presence of indels, which suggests the variability of GerA spore germination proteins. In the area of reverse primer annealing, some of them have several SNPs or deletions, which makes impossible PCR amplification of the *Bams34* locus. Previously not described VNTR locus, SNPs and indels in sequences of plasmids *pXO1* and *pXO2*, as well as SNP in chromosomal gene of glycerol-3-phosphate transporter were identified. Two pairs of PCR primers for the variable regions of the plasmids were designed. VNTR-locus, SNP and indels in sequences of plasmids *pXO1* and *pXO2* are suitable genetic markers for the differentiation of typical virulent diploid strains belonging to the main genetic lineages of *B. anthracis* A, B and C. The allele T of SNP within chromosomal *glpT* gene is specific for one of two strains isolated during the outbreak of anthrax and distinguishes it from all other strains of *B. anthracis*.

**Key words:** *Bacillus anthracis*, molecular typing, SNP, VNTR, indels, main genetic lineages.

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

Corresponding author: Eugeny I. Eremenko, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Citation: Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Pisarenko S.V., Buravtseva N.P., Pechkovsky G.A., Aksenova L.Yu., Semenova O.V., Varfolomeeva N.G., Golovinskaya T.M., Chmerenko D.K., Kovalev D.A., Zhiron A.M., Shapakov N.A., Kulichenko A.N. New Genetic Markers for Molecular Typing of *Bacillus anthracis* Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 3:43–50. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-43-50

Received 21.06.19. Revised 19.08.19. Accepted 22.08.19.

*Bacillus anthracis* – возбудитель особо опасной зоонозной инфекции с мировым распространением. Наиболее общее представление о филогенетической структуре глобальной популяции *B. anthracis* основано на клональном характере распространения возбудителя и данных многочисленных исследований с использованием MLVA-анализа нескольких VNTR-локусов и анализа SNP [1–13]. Ее определяют три основные генетические линии (клады) – А, В, С, и 12 «канонических» SNP-групп. Молекулярное типирование 16 штаммов *B. anthracis* из коллекции Ставропольского научно-исследовательского противочумного института, выделенных на территории России и республик Советского Союза, выявило их принадлежность к пяти canSNP-группам основной генетической линии А и к одной группе основной линии В [14]. Большинство исследованных штаммов из коллекции СтавНИПЧИ принадлежали к canSNP-подгруппе А.Br.008 и входили в субкладу Tsiankovskii группы ТЕА.

MLVA 31 VNTR-локуса выявил отсутствие амплификации ДНК с праймерами к локусу Vams34 у изолятов штамма, вызвавшего вспышку сибирской язвы на Ямале в 2016 г., а также у штаммов 14/41, 1284, 140П и 1051/35, выделенных в разных регионах Российской Федерации. По данным canSNP-типирования, все эти штаммы принадлежали к канонической группе В.Br.003, а результаты филогенетического анализа, по данным WGS-SNP, показали, что изоляты 1339/24, 1342/12, штамм 14/41 и корейский штамм HYU01 относятся к одному кластеру. Анализ генов факторов патогенности выявил отличия в генах *lef*, *суа*, *асрА*, *сарА*, *асрВ* и *атхА* в виде единичных нуклеотидных замен, а также инсерций/делеций (инделов) [15].

Существование однотипных отличий в геномах определенных штаммов *B. anthracis* требовало объяснения их характера и могло предполагать возможность их использования в генотипировании.

Более тонкая филогенетическая структура установлена при анализе полногеномных (WG-SNP) 193 штаммов и включает 34 «канонические» SNP-группы. Широко распространенная линия А содержит 30 из них, линия В разделяется на три «канонические» группы – В.Br.002, В.Br.003 и В.Br.004, линия С (С.Br.001) представлена всего четырьмя штаммами. На основе WGS-SNP-типирования линия А подразделяется на 12 субклад и включает главную политомию, называемую транс-Евразийской (ТЕА) группой [16, 17].

Анализ WG-SNP сделал возможным идентификацию штамм-специфичных SNP-маркеров, которые в значительной степени помогают в расследовании вспышек сибирской язвы природного происхождения и вызванных преднамеренным использованием возбудителя сибирской язвы как агента биотерроризма [17, 18].

Ранее нами предложен алгоритм генотипирования штаммов *B. anthracis* при эпидемиологическом

расследовании вспышки сибирской язвы. Он предполагал последовательное выполнение canSNP13-анализа, MLVA, полногеномного секвенирования (WGS) и анализа SNP, SNR и генов факторов патогенности на основе данных WGS [15]. Теперь с учетом современных возможностей молекулярного анализа, изменившихся представлений о тонкой филогенетической структуре глобальной популяции *B. anthracis* и наличия необходимых баз данных генотипов и геномов анализ 13 «канонических» SNP в качестве первого этапа исследования становится не актуальным, решающее значение для заключения о родстве штаммов имеет анализ SNP на основании данных WGS, тем более что методы полногеномного секвенирования становятся все более доступными и быстрыми. В связи с этим целесообразным для выполнения оперативного анализа было бы использование методов генетического типирования с новыми молекулярными маркерами, проведение которых не занимает много времени.

Таким образом, поиск новых молекулярных маркеров для типирования штаммов *B. anthracis*, является актуальным.

**Цель** – выявление новых генетических маркеров для использования в молекулярном типировании *Bacillus anthracis*.

**Задачи:**

- анализ генома на наличие инделов и единичных нуклеотидных замен;
- выявление областей с вариабельным числом tandemных повторов в геноме;
- определение природы нарушения амплификации VNTR-локуса Vams34 и оценка распространенности этой особенности среди штаммов *B. anthracis*;
- оценка возможности использования вновь идентифицированных маркеров при генотипировании.

## Материалы и методы

**Штаммы микроорганизмов.** Исследовали полногеномные последовательности штаммов *B. anthracis* 14-41, 1284, 140П, 1051-35, 1339-24, 1342-12, 140Pcap-wm, 81-1, 1266, 1CO, I-35, 1284, 1307, I-35, I-29, I-373 из коллекции ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» и штаммов *B. anthracis* из GenBank Ames Ancestor (референс-штамм, адреса доступа в GenBank NC\_007530.2, NC\_007322.2, NC\_007323.3), Pollino (GenBank NZ\_CP010813.1, NZ\_CP010814.1, NZ\_CP010815.1), CNĒVA 9066 (WGS link AAEN01), SVĀ11 (GenBank NZ\_CP006742.1, NZ\_CP006743.1, NZ\_CP006744.1), Zimbabwe 89 (WGS link JMPU01), Kruger B (WGS link AAEQ01), HYU01 (GenBank NZ\_CP008846.1, NZ\_CP008847.1, NZ\_CP008848.1), 2002013094 (NZ\_CP009902.1, NZ\_CP009901.1, NZ\_CP009900.1), 2000031021 (NZ\_CP007618.1, NZ\_CP007617.1), 2000031052 (WGS link JSZS01), A1055 (WGS link AAEO01), штаммов *Bacillus cereus* BC-AK (NZ\_CP020937.1, NZ\_CP020938.1, NZ\_CP020939.1, NZ\_CP020940.1, NZ\_CP020941.1), G9241 (NZ\_

CP009590.1, NZ\_CP009591.1, NZ\_CP009592.1, NZ\_CP009589.1), 03BB87 (NZ\_CP009941.1, NZ\_CP009939.1, NZ\_CP009940.1), 03BB102 (NZ\_CP009318.1, NZ\_CP009317.1) и *Bacillus cereus bio-var anthracis* str C1 (NC\_014335.1, NC\_014333.1, NC\_014331.1, NC\_014332.1).

**MLVA.** MLVA-31 штаммов *B. anthracis* из нашей коллекции проводили методом фрагментного анализа ампликонов, полученных в ПЦР, с определением размеров электрофорезом в геле агарозы либо с флуоресцентно-мечеными праймерами капиллярным электрофорезом в ДНК-анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems, USA) по схеме [19]. Размеры ампликонов в парах оснований переводили в число повторов в соответствии с конвенцией, предложенной S. Thierry *et al.* [20].

Анализ геномов штаммов *B. anthracis*, депонированных в GenBank, а также некоторых штаммов из коллекции нашего института, для которых имелись полногеномные последовательности, осуществляли *in silico*, пользуясь online ресурсом MLVABank [<http://mlva.u-psud.fr/mlvav4/genotyping/insilico.php>], для получения сравнимых результатов число повторов корректировали для локусов *vrnA*, *vrnB1*, *vrnB2* и *pXO2at* в соответствии с S. Thierry *et al.* [20].

Анализировали также MLVA-31 генотипы штаммов из базы данных MLVABank for microbes genotyping [<http://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/databases/view/881>].

Множественное выравнивание геномов секвенированных штаммов *B. anthracis* и поиск SNP в коровом геноме проводили с помощью программы REALPHY 1.10. Выравнивание последовательностей генов проводили в программе CLC Sequence Viewer version 7.7.1. Сравнение последовательностей генов разных штаммов осуществляли в ресурсе BLASTn. Поиск генов разных штаммов проводили в базе данных GenBank.

## Результаты и обсуждение

**Особенности VNTR-локуса Vams34 и оперона *gerH*.** Анализ *in silico* геномов штаммов *B. anthracis* из базы данных GenBank и штаммов из коллекции Ставропольского противочумного института показал, что у ряда штаммов *B. anthracis* главной генетической линии В в пределах гомологичных генов трицистронного оперона *gerH*, кодирующего белки, связанные с прорастанием спор, имеются делеции и (или) замены единичных нуклеотидов.

Гены *gerA* оперона содержат VNTR-локус Vams34. 10 штаммов из группы В.Br.004 основной генетической линии В и все штаммы основных линий А и С в ПЦР с праймерами к локусу Vams34 генерировали ампликоны, имеющие 4, 7, 9, 11 и 13 тандемных повторов с размером единицы повтора 39 п.н.

Локализация праймеров показала, что в геноме штамма *B. anthracis* Ames Ancestor весь ампликон хромосомного локуса Vams 34 размером 503 п.н.

в положении 4522317–4522819 приходился на ген *gerHA* размером 2244 п.н., кодирующий белок прорастания спор GerHA (WP\_000638056.1, 747 а.о.).

Сайт для прямого праймера Vams34 занимал положение 4522317–4522338 в геноме штамма Ames Ancestor и 190–211 в последовательности гена *gerHA*. Такое же положение сайта для прямого праймера в структуре гена *gerHA* и гомологичных генов *gerA* и *gerIA* белков прорастания спор WP\_000638058.1, WP\_080287580.1 и WP\_000638057.1 имели штаммы *B. anthracis* Pollino (GenBank NZ\_CP010813.1), CNEVA 9066 (WGS link AAEN01), SVA11 (GenBank NZ\_CP006742.1), Zimbabwe 89 (WGS link JMPU01), Kruger B (WGS link AAQ01) и HYU01 (GenBank NZ\_CP008846.1). Сайт для обратного праймера занимал положение 669–692 гена *gerHA* штаммов Ames Ancestor, Pollino и A1055, положение 593–614 гена *gerHA* штамма 2002013094, положение 749–770 гена *gerIA* штамма CNEVA 9066. У штаммов Kruger B, SVA11, Zimbabwe89 в этой области имелась делеция, а у штамма HYU01 – однонуклеотидные замены в позиции 669 (С→Т), 672 (С→Т), 681 (Т→С), 684 (Т→С), 686 (Т→С), 687 (А→С), 689 (С→А) и 690 (А→Т) (рис. 1).

Это объясняло отсутствие амплификации локуса Vams 34 с данными праймерами у штаммов HYU01, SVA11, Zimbabwe 89 и Kruger B, что могло быть причиной ее невозможности у штаммов 1339-24, 1342-12, 14/41, 1284, 140П, 1051/35 и служить маркером принадлежности к *canSNP* подгруппе В.Br.003.

Можно отметить, что тандемные повторы в локусе Vams34 отличались высокой степенью вырожденности, у штамма Ames Ancestor для 11 повторов существовало 7 вариантов, 2 варианта по 3 идентичных повтора и 5 вариантов повторов с числом однонуклеотидных замен 4, 8, 9, 11 и 20.

В целом, выявлено существование как минимум семи вариантов генов *gerHA*, *gerA* или *gerIA*, отличающихся размерами (2049, 2088, 2112, 2190, 2244, 2322 и 2385 п.н.). При этом размеры генов у разных штаммов варьируют как из-за разного числа тандемных повторов, так и наличия инделов. Варибельность этих генов предполагает варибельность белков GerA и вероятность отличий в реализации критически важной функции прорастания спор у разных штаммов *B. anthracis*, что может быть предметом специальных исследований.

Идентифицирован не описанный VNTR-локус с последовательностью единицы повтора ATATAGATA размером 9 п.н., занимающий положение с 1322 по 1339 в геноме референсного штамма Ames Ancestor, имеющего два повтора. Анализ последовательностей гена 46 штаммов, включая 10 штаммов из коллекции Ставропольского противочумного института, показал, что 10 штаммов главной генетической линии В и 3 штамма (2002013094, 2000031021 и A1055) линии С содержали в этой области три повтора, четвертый из известных штаммов линии С, 2000031052, содержал одну единицу повтора ATATAGATA. Остальные

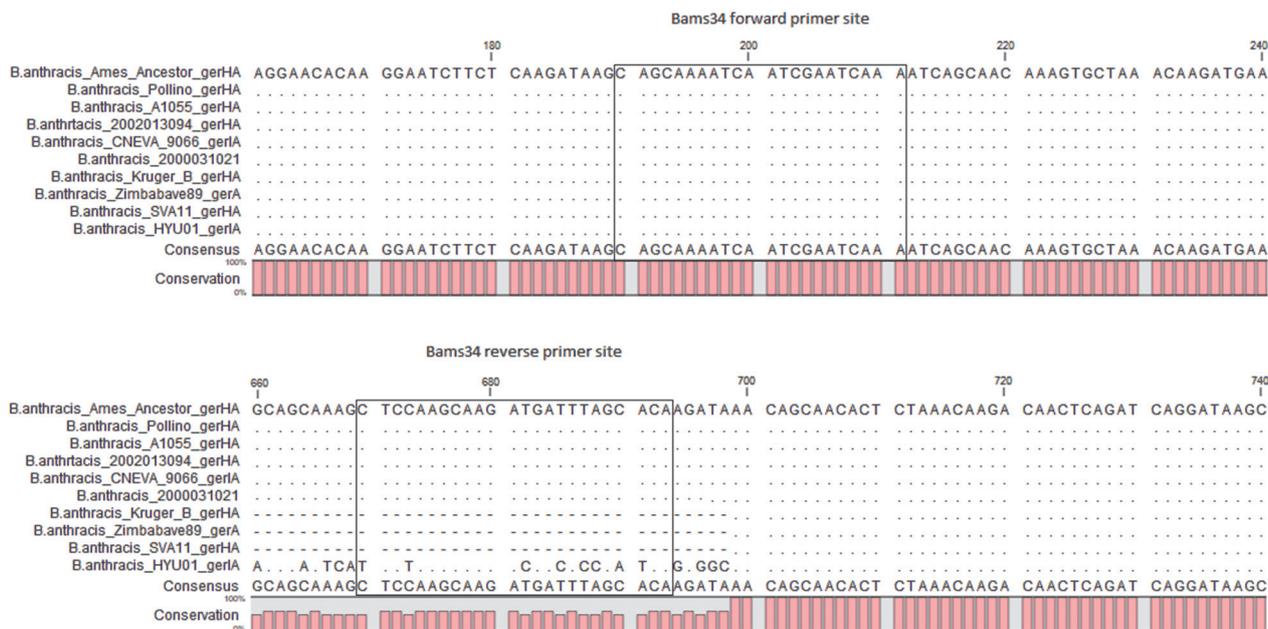


Рис. 1. Сайты для прямого и обратного праймера VNTR-локуса Bams34. Праймеры, описанные в работе S. Thierry *et al.* [20]

Fig. 1. Sites for forward and reverse primer VNTR-locus Bams34. Primers are described in reference [20] S. Thierry *et al.*

33 штамма (один штамм был рХО2) имели, как и штамм Ames Ancestor, два повтора и принадлежали к линии А (рис. 2, А). Из 37 штаммов из GenBank с полными последовательностями плазмид рХО2 у 29 штаммов, по результатам BLAST, ген *acpA* был идентичен гену штамма Ames Ancestor, у 8 штаммов имелись отличия. При этом у штамма 14RA5914, имевшего две отличающиеся копии гена *acpA*: в одной имелась делеция 1035А, в другой – 83А. Этот штамм принадлежал линии А. У остальных семи штаммов отличия состояли в замене 853G→А по сравнению со штаммом Ames Ancestor (рис. 2, В) и описанного выше VNTR-локуса с тремя повторами.

Все проверенные штаммы из коллекции Ставропольского противочумного института, относящиеся к линии В, также имели замену 853G→А и VNTR-локус с тремя повторами, у штаммов линии А в положении 853 был аденин А, а VNTR-локус содержал два повтора.

Сравнение последовательностей плазмиды рХО1 выявило наличие варибельной области протяженностью 408 п.н. между геном GBAA\_pХО1\_0149 гипотетического белка и геном GBAA\_pХО1\_0150 консервативного доменного белка, обусловленной инделом размером 38 п.н. в позиции 130776–130813 референсного штамма Ames Ancestor. Делеция 38 п.н. была присуща 10 штаммам главной генетической линии В, включая штаммы из коллекции Ставропольского НИПЧИ № 1339-24, 14-41, 1284, 140П и 1051-35, из общего числа 46 штаммов. Остальные штаммы, относящиеся к генетической линии А, имели вставку, но у штаммов 1СО и I-35 эта варибельная область имела размер 37 п.н. из-за делеции Т7 (рис. 2, С). У штамма 2002013094, одного из четырех известных штаммов линии С, имелась

такая же вставка, как у штаммов линии А. В геноме штамма линии С 2000031021 не было плазмиды рХО1, у остальных штаммов линии С гомологии индела 38 п.н. не наблюдалось.

Таким образом, VNTR-локус с единицей повтора АТАТАGАТА, SNP853G-А в последовательности гена *acpA* плазмиды рХО2, индел 38(37) п.н. (СТТТТТТТAAAGAAАТТАТТАТТТААТТТТАТАТААТТТ) в межгенной области плазмиды рХО1 можно расценивать как маркеры, позволяющие в совокупности дифференцировать диплоидные штаммы в соответствии с принадлежностью к главным генетическим линиям *B. anthracis* А, В и С.

Сконструированы две пары ПЦР-праймеров к этим варибельным областям (табл. 1).

Они позволяют дифференцировать штаммы по признаку принадлежности к основным генетическим линиям при ПЦР-амплификации ДНК с детекцией результатов методом простого гель-электрофореза (рис. 3, А). Дендрограмма, построенная по результатам анализа нуклеотидных последовательностей штаммов, показывает четкое разделение на два кластера, соответствующие основным генетическим линиям *B. anthracis* А и В, при этом штамм 2002013094, относящийся к генетической линии С, представленной всего четырьмя штаммами, кластеризуется вместе со штаммами линии В (рис. 3, В). Обращает на себя внимание тот факт, что штамм 140Р и его производный 140Рсар-wm относятся к двум разным генетическим линиям.

Все штаммы по отношению к главным генетическим линиям А, В и С разделяют сочетания однонуклеотидных замен в SNP853G-А и каноническом SNP А/В.Br.001 [2] (табл. 2).

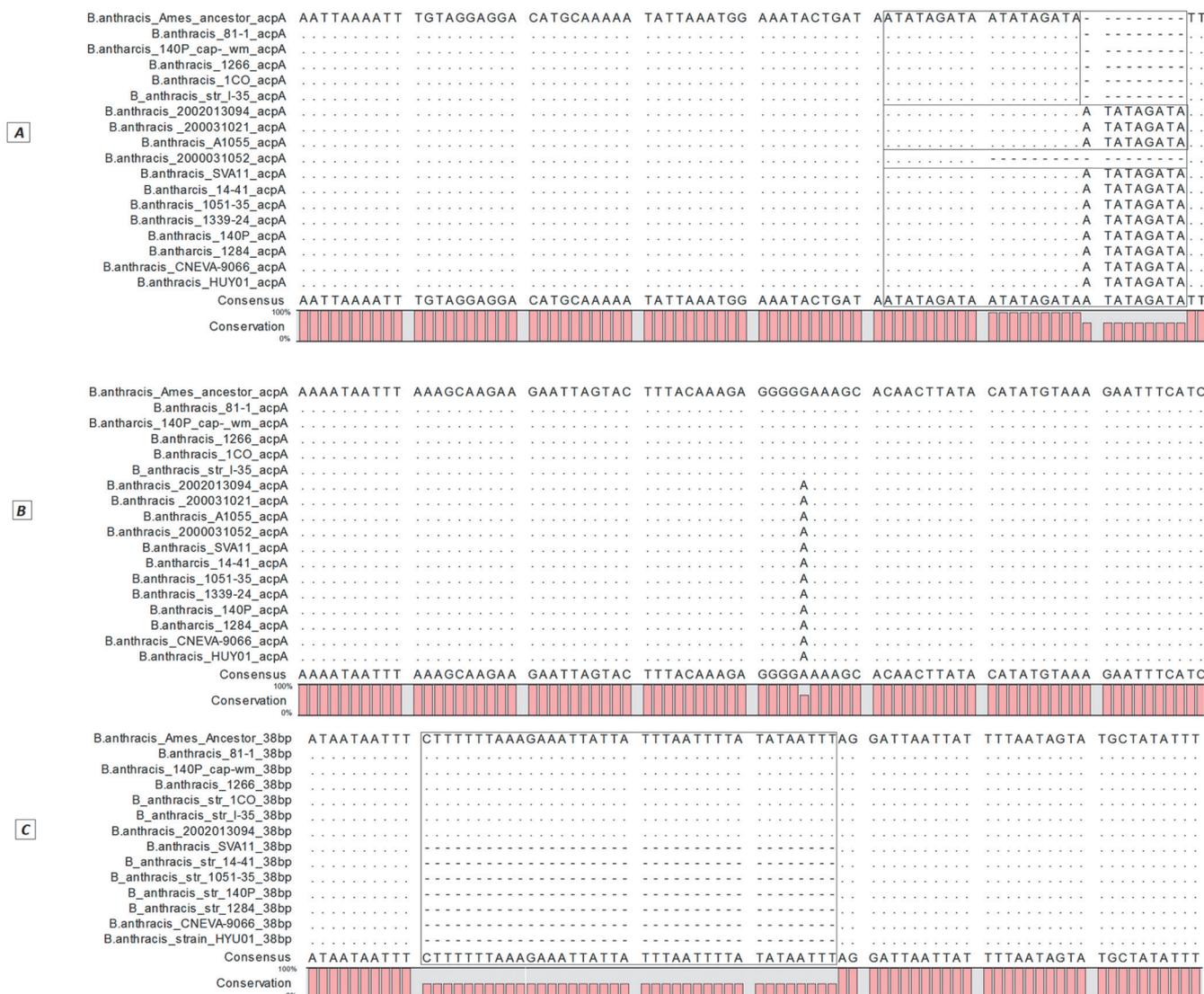


Рис. 2. Отличия последовательностей гена *acpA* плазмиды pXO2 и межгенной области плазмиды pXO1:

A – VNTR-локус гена *acpA*, B – SNP 853G →A гена *acpA*, C – полиморфная межгенная область плазмиды pXO1

Fig. 2. Differences in sequences of plasmid pXO2 *acpA* gene and the intergenic region of plasmid pXO1:

A – VNTR-locus of *acpA* gene; B – SNP 853G →A of *acpA* gene; C – polymorphic intergenic region of pXO1 plasmid

У штаммов *Bacillus cereus* BC-AK и *Bacillus cereus* biovar *anthracis* str. CI, несущих плазмиды, подобные pXO1 и pXO2 *B. anthracis*, размеры областей составляли 493 и 233 п.н. соответственно, как у штаммов *B. anthracis* линии A. При этом, у штамма *B. cereus* biovar *anthracis* str. CI был аллель G SNP 853, а у штамма *B. cereus* BC-AK – аллель A. У обоих штам-

мов присутствовал аллель G SNP A/B.Br.001. Штаммы *B. cereus*, несущие только pXO1-подобные плазмиды, имели размер варибельной области 493 п.н. (штаммы G9241 и 03BB87) или 454 п.н. (штамм 03BB102).

**Особенности SNP гена *glpT*.** В коровом геноме штаммов *B. anthracis* 1342-12 и 1339-24 в сравнении с референсным геномом штамма *B. anthracis* Ames

Таблица 1 / Table 1

**Дифференциация главных генетических линий *B. anthracis* на основании результатов ПЦР с праймерами к области с инделом плазмиды pXO1 и VNTR-локусу плазмиды pXO2**

**Differentiation of major genetic lineages of *B. anthracis* based on the results of PCR with primers to the region with pXO1 plasmid indel and VNTR locus of pXO2 plasmid**

Праймеры, 5' – 3' Primers, 5' – 3'	Размер ампликона для штаммов основных генетических линий, п.н. The size of the amplicon for the strains of the major genetic lineages, bp		
	A	B	C
9bp for ACCGGTGAAGGAAAAAGTTG 9bp rev ATTCTATTTTCATAAAAAATCA	233	242(243)	242 (224)
38bp for TTTGCGGGGTTTTGTATTTC 38bp rev CACCAATAATACTTCTCTC	493(492)	455(456)	493(492)

Таблица 2 / Table 2

**Дифференциация главных генетических линий *B. anthracis* на основании сочетания однонуклеотидных замен в двух SNP**

**Differentiation of major genetic lineages of *B. anthracis* based on combination of single nucleotide substitutions in two SNP**

Обозначения SNP SNP designations	Однонуклеотидные замены в SNP, соответствующие главным генетическим линиям Single nucleotide substitutions in SNP corresponding to the main genetic lineages		
	A	B	C
SNP 853G-A	G	A	A
SNP A/B.Br.001	A	A	G

Ancestor обнаружено 598 и 599 SNP соответственно.

Между собой штаммы отличает один полиморфизм в позиции 679227 по референсному геному, который присутствует у штамма 1339-24 и отсутствует у штамма 1342-12 (рис. 4). Замена С→Т в позиции 679227 приводит к аминокислотной замене Gly→Glu в гене *glpT*, кодирующем транспортер глицерол-3-фосфата. Эта замена не выявлена у других штаммов из GenBank и нашей коллекции, она встречалась только у штамма 1339-24 и являлась штаммоспецифичной. Кроме того, в гене *glpT* у обоих штаммов есть еще одна общая несинонимичная замена С→Т по сравнению с референсным геномом в позиции 679557, которая приводит к аминокислотной замене Gly→Asp. Та же замена была у штаммов 1051-35, 14-41, 140P, I-29, I-373 и 12-16, но не отмечалась у 1284, NYU01, SVA11, а также у двух штаммов линии А, 140Pcap-wm и 14-41-1, производных штаммов 140P и 14-41 соответственно, которые имели эту замену и относились к линии В. Это совпадает с распределением штаммов 140Pcap-wm и 140P в две основные генетические линии, А и В, полученным при анализе VNTR-локуса и индела в последовательностях плазмид (рис. 2, А и С).

В итоге результаты проведенного исследования выявили некоторые значимые особенности генома сибирезявленного микроба. Установлено, что область отжига праймеров к VNTR-локусу Vams34 приходится на ген прорастания спор *gerHA* штамма *B. anthracis* Ames Ancestor. У ряда штаммов главной генетической линии В отсутствие амплификации локуса Vams34 с данными праймерами связано с делецией или заменами оснований в области отжига обратного праймера, что в свою очередь обусловлено существованием гомологичных генов в геномах разных штаммов. Кроме того, что данная особенность может использоваться для молекулярного субтипирования, изучение различий генов и влияние их на функцию белков прорастания спор возбудителя сибирской язвы важно, поскольку процесс прорастания спор является критическим в жизненном цикле этого патогена и становлении инфекции.

Идентификация ранее не описанных VNTR-локуса, SNP и индела в последовательностях плазмид рХО1 и рХО2 дает возможность использовать их в качестве генетических маркеров для дифференциации типичных вирулентных диплазмидных штаммов по принадлежности к основным генетическим линиям *B. anthracis* А, В и С. Дифференциация проводится на основе результатов ПЦР с разработанными двумя парами праймеров в электрофорезном формате или аллель-специфической ПЦР с детекцией в режиме реального времени с зондами и праймерами к двум SNP – каноническому А/В.Br.001 [2] и описанному нами SNP 853G-A. Определение принадлежности штамма к одной из главных генетических линий *B. anthracis* предложено нами в качестве быстрого первого предварительного этапа в алгоритме молекулярного типирования, что особенно важно в ходе эпидемиологического расследования вспышки сибирской язвы, когда необходимо как можно скорее

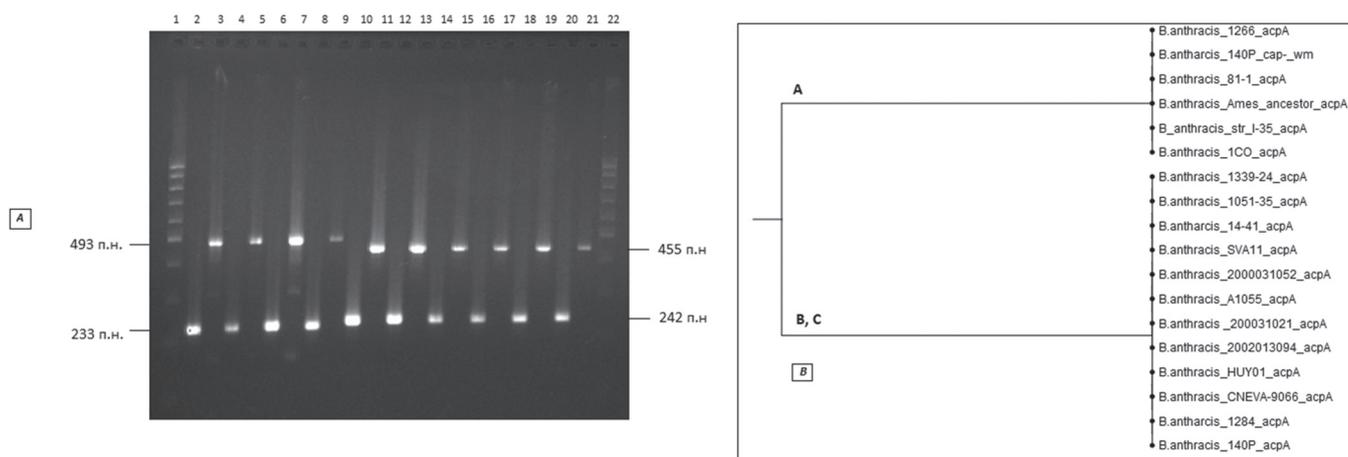


Рис. 3. А – амплификация ДНК штаммов *B. anthracis* с праймерами 38 bp и 9 bp: треки 1, 22 – ladder 100 bp; четные треки – ампликоны с праймерами 9bp, нечетные – ампликоны с праймерами 38bp; 2, 3 – 1266; 4, 5 – 81-1; 6, 7 – 1CO; 8, 9 – 140Pcap-wm; 10, 11 – 1051-35; 12, 13 – 14-41; 14, 15 – 140P; 16, 17 – 1339-24; 18, 19 – 1284; 20, 21 – 14-41. В – кластеризация штаммов *B. anthracis*

Fig. 3. А – amplification of DNA of *B. anthracis* strains with primer 38 bp and 9 bp: tracks 1, 22 – ladder 100 bp; the even-numbered tracks – amplicon with primers 9bp, odd tracks – amplicon with primers 38 bp; 2, 3 – 1266; 4, 5 – 81-1; 6, 7 – 1CO; 8, 9 – 140Pcap-wm; 10, 11 – 1051-35; 12, 13 – 14-41; 14, 15 – 140P; 16, 17 – 1339-24; 18, 19 – 1284; 20, 21 – 14-41. В – clustering of *B. anthracis* strains

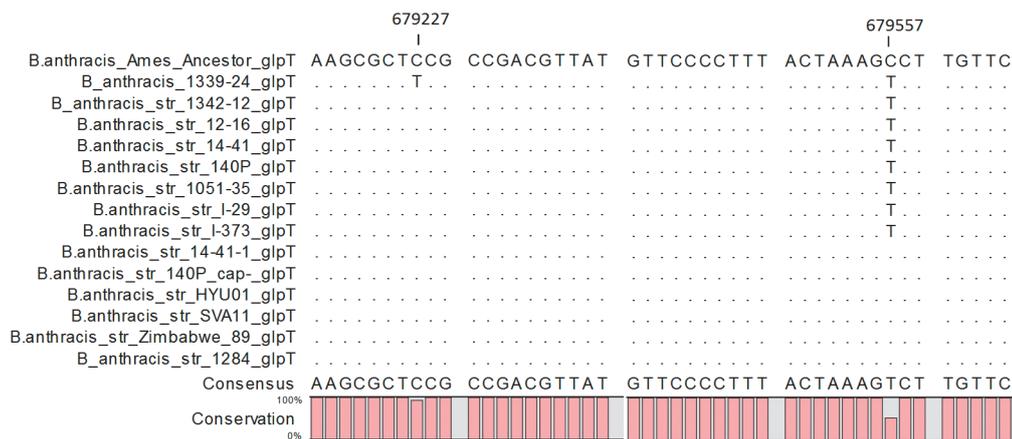


Рис. 4. Единичные нуклеотидные замены в области гена *glpT* штаммов *B. anthracis*

Fig. 4. Single nucleotide substitutions in the *glpT* gene region of *B. anthracis* strains

получить представление о возможном происхождении штамма, вызвавшего вспышку.

Два SNP в гене *glpT* разных штаммов возбудителя сибирской язвы также являются маркерными. Замена С→Т в позиции 679227 по референсному геному свойственна единственному штамму 1339-24, специфична для него и отличает этот штамм, выделенный из крови оленя, от штамма 1342-12, выделенного от человека в ходе вспышки сибирской язвы в 2016 г. на Ямале. Такая же замена в позиции 679557 характерна для этих двух и части других штаммов, относящихся к подгруппе V.Br.002, а также двух производных штаммов данной подгруппы с таким полиморфизмом, но относящихся к подгруппе A.Br.008.

Таким образом, идентифицированы ранее не описанные VNTR-локус, SNP и инделы в последовательностях плазмид, пригодные в качестве генетических маркеров для молекулярного типирования *B. anthracis*. Сконструированы две пары праймеров для ПЦР, по результатам которой достигается дифференциация типичных вирулентных диплазмидных штаммов по принадлежности к основным генетическим линиям *B. anthracis*. Показано, что VNTR-локус Vams34 локализуется в пределах генов *gerA*, размеры и последовательности которых и кодируемых ими белков варьируются у разных штаммов. Определена природа нарушения амплификации VNTR-локуса Vams34, оценена распространенность этой особенности среди штаммов *B. anthracis*, которая может служить маркером принадлежности к *can*SNP подгруппе V.Br.003. Подчеркнуто, что вариабельность генов *gerA* предполагает вариабельность белков GerA и вероятность отличий в реализации критически важной функции прорастания спор у разных штаммов *B. anthracis*, что может быть предметом специальных исследований.

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

**Список литературы**

1. Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K.L., Schupp J.M., Okinaka R., Jackson P.J., Hugh-Jones M.E. Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Reveals Genetic Relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 2000;

182(10):2928–36. DOI: 10.1128/jb.182.10.2928-2936.2000.  
 2. Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., Okinaka R.T., Hugh-Jones M.E., Ravel J., Zanecki S.R., Pearson T., Simonson T.S., U'Ren J.M., Kachur S.M., Leadem-Dougherty R.R., Rhoton S.D., Zinser G., Farlow J., Coker P.R., Smith K.L., Wang B., Kenefic L.J., Fraser-Liggett C.M., Wagner D.M., Keim P. Global Genetic Population Structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One.* 2007; 2(5):e461. DOI: 10.1371/journal.pone.0000461.  
 3. Gierczyński R., Jakubczak A., Jagielski M. Extended Multiple-Locus Variable Tandem-Repeat Analysis of *Bacillus anthracis* Strains Isolated in Poland. *Pol. J. Microbiol.* 2009; 58(1):3–7. PMID: 19469279.  
 4. Okutani A., Sekizuka T., Boldbaatar B., Yamada A., Kuroda M., Inoue S. Phylogenetic Typing of *Bacillus anthracis* Isolated in Japan by Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeats and the Comprehensive Single Nucleotide Polymorphism. *J. Vet. Med. Sci.* 2010; 72(1):93–7. DOI: 10.1292/jvms.09-0213.  
 5. Antwerpen M., Ilin D., Georgieva E., Meyer H., Savov E., Frangoulidis D. MLVA and SNP analysis identified a unique genetic cluster in Bulgarian *Bacillus anthracis* strains. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 30(7):923–30. DOI: 10.1007/s10096-011-1177-2.  
 6. Jung K.H., Kim S.H., Kim S.K., Cho S.Y., Chai J.C., Lee Y.S., Kim J.C., Kim S.J., Oh H.B., Chai Y.G. Genetic populations of *Bacillus anthracis* isolates from Korea. *J. Vet. Sci.* 2012; 13(4):385–93. DOI: 10.4142/jvs.2012.13.4.385.  
 7. Eremenko E.I., Ryazanova A.G., Tsygankova O.I., Tsygankova E.A., Buravtseva N.P., Kulitchenko A.N. Genotype Diversity of *Bacillus anthracis* Strains Isolated from the Caucasus Region. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2012; 27(2):74–8. DOI: 10.3103/S0891416812020024.  
 8. Beyer W., Bellan S., Eberle G., Ganz H.H., Getz W.M., Haumacher R., Hilss K.A., Kilian W., Lazak J., Turner W.C., Turnbull P.C.B. Distribution and Molecular Evolution of *Bacillus anthracis* Genotypes in Namibia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012; 6(3):e1534. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001534.  
 9. Vergnaud G., Girault G., Thierry S., Pourcel C., Madani N., Blouin Y. Comparison of French and Worldwide *Bacillus anthracis* Strains Favors a Recent, Post-Columbian Origin of the Predominant North-American Clade. *PLoS One.* 2016; 11(2):e0146216. DOI: 10.1371/journal.pone.0146216.  
 10. Derzelle S., Thierry S. Genetic Diversity of *Bacillus anthracis* in Europe: Genotyping Methods in Forensic and Epidemiologic Investigations. *Biosecurity and Bioterrorism: Biodefense Strategy, Practice, and Science.* 2013; 11(1):166–76. DOI: 10.1089/bsp.2013.0003.  
 11. Aikembayev A. M., Lukhnova L., Temiraliyeva G., Meka-Mechenko T., Pazylov Y., Zakaryan S., Denissov G., Easterday W. R., Van Ert M. N., Keim P., Francesconi S. C., Blackburn J. K., Hugh-Jones M., Hadfield T. Historical Distribution and Molecular Diversity of *Bacillus anthracis*, Kazakhstan. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16(5):789–96. DOI: 10.3201/eid1605.091427.  
 12. Durmaz R., Doganay M., Sahin M., Percin D., Karahocagil M.K., Kayabas U., Oflu B., Karagoz A., Buyuk F., Celebi O., Ozturk Z., Ertek M. Anthrax Study Group. Molecular epidemiology of the *Bacillus anthracis* isolates collected throughout Turkey from 1983 to 2011. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012; 31(10):2783–90. DOI: 10.1007/s10096-012-1628-4.  
 13. Okutani A., Tungalag H., Boldbaatar B., Yamada A., Tserenrorov D., Otgonchimeg I., Erdenebat A., Otgonbaatar D., Inoue S. Molecular Epidemiological Study of *Bacillus anthracis* Isolated in Mongolia by Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis for 8 Loci (MLVA-8). *Jpn J. Infect. Dis.* 2011; 64:345–8. PMID: 21788715.  
 14. Еременко Е.И., Писаренко С.В., Аксенова Л.Ю., Рязанова А.Г., Жиров А.М., Семенова О.В., Бобрышева О.В., Ковалев

Д.А., Куличенко А.Н. Филогенетика, эволюция и филогеография *Bacillus anthracis*. *Бактериология*. 2018; 3(2):57–63.

15. Куличенко А.Н., Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Аксенова Л.Ю., Ковалев Д.А., Писаренко С.В., Варфоломеева Н.Г., Жиров А.М., Волинкина А.С., Буравцева Н.П., Головинская Т.М., Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Дятлов И.А., Тимофеев В.С., Богун А.Г., Бахтеева И.В., Кисличкина А.А., Миронова Р.И., Титарева Г.М., Скрябин Ю.П., Селянинов Ю.О., Егорова И.Ю., Колбасов Д.В. Биологические свойства и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Bacillus anthracis*, выделенных во время вспышки сибирской язвы в Ямало-Ненецком автономном округе в 2016 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; 1:94–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-94-99.

16. Pilo P., Frey J. Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis*. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 64:115–25. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.06.024.

17. Sahl J.W., Pearson T., Okinaka R., Schupp J.M., Gillette J.D., Heaton H., Birdsell D., Hepp C., Fofanov V., Noseda R., Fasanella A., Hoffmaster A., Wagner D.M., Keim P. A *Bacillus anthracis* genome sequence from the Sverdlovsk 1979 autopsy specimens. *mBio*. 2016; 7(5):e01501–16. DOI: 10.1128/mBio.01501-16.

18. Van Ert M.N., Easterday W.R., Simonson T.S., U'Ren J.M., Pearson T., Kenefic L.J., Busch J.D., Huynh L.Y., Dukerich M., Trim C.B., Beaudry J., Welty-Bernard A., Read T., Fraser C.M., Ravel J., Keim P. Strain-Specific Single-Nucleotide Polymorphism Assays for the *Bacillus anthracis* Ames Strain. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(1):47–53. DOI: 10.1128/JCM.01233-06.

19. Beyer W., Bellan S., Eberle G., Ganz H.H., Getz W.M., Haumacher R., Hilss K.A., Kilian W., Lazak J., Turner W.C., Turnbull P.C. Distribution and Molecular Evolution of *Bacillus anthracis* Genotypes in Namibia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012; 6(3):e1534. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001534.

20. Thierry S., Tourterel C., Le Flèche P., Derzelle S., Dekhil N., Mendy C., Colaneri C., Vergnaud G., Madani N. Genotyping of French *Bacillus anthracis* strains based on 31-loci multi locus VNTR analysis: epidemiology, marker evaluation, and update of the internet genotype database. *PLoS One*. 2014; 9(6):e95131. DOI: 10.1371/journal.pone.0095131.

## References

1. Keim P., Price L.B., Klevytska A.M., Smith K.L., Schupp J.M., Okinaka R., Jackson P.J., Hugh-Jones M.E. Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis Reveals Genetic Relationships within *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 2000; 182(10):2928–36. DOI: 10.1128/jb.182.10.2928-2936.2000.

2. Van Ert M.N., Easterday W.R., Huynh L.Y., Okinaka R.T., Hugh-Jones M.E., Ravel J., Zanecki S.R., Pearson T., Simonson T.S., U'Ren J.M., Kachur S.M., Leadem-Dougherty R.R., Rhoton S.D., Zinser G., Farlow J., Coker P.R., Smith K.L., Wang B., Kenefic L.J., Fraser-Liggett C.M., Wagner D.M., Keim P. Global Genetic Population Structure of *Bacillus anthracis*. *PLoS One*. 2007; 2(5):e461. DOI: 10.1371/journal.pone.0000461.

3. Gierczyński R., Jakubczak A., Jagielski M. Extended Multiple-Locus Variable Tandem-Repeat Analysis of *Bacillus anthracis* Strains Isolated in Poland. *Pol. J. Microbiol.* 2009; 58(1):3–7. PMID: 19469279.

4. Okutani A., Sekizuka T., Boldbaatar B., Yamada A., Kuroda M., Inoue S. Phylogenetic Typing of *Bacillus anthracis* Isolated in Japan by Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeats and the Comprehensive Single Nucleotide Polymorphism. *J. Vet. Med. Sci.* 2010; 72(1):93–7. DOI: 10.1292/jvms.09-0213.

5. Antwerpen M., Ilin D., Georgieva E., Meyer H., Savov E., Frangoulidis D. MLVA and SNP analysis identified a unique genetic cluster in Bulgarian *Bacillus anthracis* strains. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011; 30(7):923–30. DOI: 10.1007/s10096-011-1177-2.

6. Jung K.H., Kim S.H., Kim S.K., Cho S.Y., Chai J.C., Lee Y.S., Kim J.C., Kim S.J., Oh H.B., Chai Y.G. Genetic populations of *Bacillus anthracis* isolates from Korea. *J. Vet. Sci.* 2012; 13(4):385–93. DOI: 10.4142/jvs.2012.13.4.385.

7. Eremenko E.I., Ryzanova A.G., Tsygankova O.I., Tsygankova E.A., Buravtseva N.P., Kulitchenko A.N. Genotype Diversity of *Bacillus anthracis* Strains Isolated from the Caucasus Region. *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2012; 27(2):74–8. DOI: 10.3103/S0891416812020024.

8. Beyer W., Bellan S., Eberle G., Ganz H.H., Getz W.M., Haumacher R., Hilss K.A., Kilian W., Lazak J., Turner W.C., Turnbull P.C.B. Distribution and Molecular Evolution of *Bacillus anthracis* Genotypes in Namibia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012; 6(3):e1534. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001534.

9. Vergnaud G., Girault G., Thierry S., Pourcel C., Madani N., Blouin Y. Comparison of French and Worldwide *Bacillus anthracis* Strains Favors a Recent, Post-Columbian Origin of the Predominant North-American Clade. *PLoS One*. 2016; 11(2):e0146216. DOI: 10.1371/journal.pone.0146216.

10. Derzelle S., Thierry S. Genetic Diversity of *Bacillus anthracis* in Europe: Genotyping Methods in Forensic and Epidemiological Investigations. *Biosecurity and Bioterrorism: Biodefense Strategy, Practice, and Science*. 2013; 11(1):166–76. DOI: 10.1089/bsp.2013.0003.

11. Aikembayev A. M., Lukhnova L., Temiraliyeva G., Meka-Mechenko T., Pazylov Y., Zakaryan S., Denissov G., Easterday W. R., Van Ert M. N., Keim P., Francesconi S. C., Blackburn J. K., Hugh-Jones M., Hadfield T. Historical Distribution and Molecular Diversity of *Bacillus anthracis*, Kazakhstan. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16(5):789–96. DOI: 10.3201/eid1605.091427.

12. Durmaz R., Doganay M., Sahin M., Percin D., Karahocagil M.K., Kayabas U., Oflu B., Karagoz A., Buyuk F., Celebi O., Ozturk Z., Ertek M. Anthrax Study Group. Molecular epidemiology of the *Bacillus anthracis* isolates collected throughout Turkey from 1983 to 2011. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012; 31(10):2783–90. DOI: 10.1007/s10096-012-1628-4.

13. Okutani A., Tungalag H., Boldbaatar B., Yamada A., Tserennorov D., Otgonchimeg I., Erdenebat A., Otgonbaatar D., Inoue S. Molecular Epidemiological Study of *Bacillus anthracis* Isolated in Mongolia by Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for 8 Loci (MLVA-8). *Jpn J. Infect. Dis.* 2011; 64:345–8. PMID: 21788715.

14. Eremenko E.I., Pisarenko S.V., Aksенова Л.Ю., Рязанова А.Г., Зhirov А.М., Семенова О.В., Бобрышева О.В., Ковалев Д.А., Куличенко А.Н. [Phylogeny, evolution, and phylogeography of *Bacillus anthracis*]. *Bakteriologiya [Bacteriology]*. 2018; 3(2):57–63.

15. Kulichenko A.N., Eremenko E.I., Ryzanova A.G., Aksенова Л.Ю., Ковалев Д.А., Pisarenko S.V., Varfolomeeva N.G., Zhirov A.M., Volynkina A.S., Buravtseva N.P., Golovinskaya T.M., Koteneva E.A., Tsygankova O.I., Dyatlov I.A., Timofeev V.S., Bogun A.G., Bakhteeva I.V., Kislchikina A.A., Mironova R.I., Titareva G.M., Skryabin Yu. O., Selyaninov Yu. O., Egorova I. Yu., Kolbasov D.V. [Biological properties and molecular-genetic characteristics of *Bacillus anthracis* strains, isolated during the outbreak of anthrax in the Yamalo-Nenets Autonomous District in 2016]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 1:94–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-94-99.

16. Pilo P., Frey J. Pathogenicity, population genetics and dissemination of *Bacillus anthracis*. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 64:115–25. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.06.024.

17. Sahl J.W., Pearson T., Okinaka R., Schupp J.M., Gillette J.D., Heaton H., Birdsell D., Hepp C., Fofanov V., Noseda R., Fasanella A., Hoffmaster A., Wagner D.M., Keim P. A *Bacillus anthracis* genome sequence from the Sverdlovsk 1979 autopsy specimens. *mBio*. 2016; 7(5):e01501–16. DOI: 10.1128/mBio.01501-16.

18. Van Ert M.N., Easterday W. R., Simonson T.S., U'Ren J.M., Pearson T., Kenefic L.J., Busch J.D., Huynh L.Y., Dukerich M., Trim C.B., Beaudry J., Welty-Bernard A., Read T., Fraser C.M., Ravel J., Keim P. Strain-Specific Single-Nucleotide Polymorphism Assays for the *Bacillus anthracis* Ames Strain. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(1):47–53. DOI: 10.1128/JCM.01233-06.

19. Beyer W., Bellan S., Eberle G., Ganz H.H., Getz W.M., Haumacher R., Hilss K.A., Kilian W., Lazak J., Turner W.C., Turnbull P.C. Distribution and Molecular Evolution of *Bacillus anthracis* Genotypes in Namibia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012; 6(3):e1534. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001534.

20. Thierry S., Tourterel C., Le Flèche P., Derzelle S., Dekhil N., Mendy C., Colaneri C., Vergnaud G., Madani N. Genotyping of French *Bacillus anthracis* strains based on 31-loci multi locus VNTR analysis: epidemiology, marker evaluation, and update of the internet genotype database. *PLoS One*. 2014; 9(6):e95131. DOI: 10.1371/journal.pone.0095131.

## Authors:

Eremenko E.I., Ryzanova A.G., Pisarenko S.V., Buravtseva N.P., Pechkovskiy G.A., Aksенова Л.Ю., Семенова О.В., Варфоломеева Н.Г., Головинская Т.М., Чмеренко Д.К., Ковалев Д.А., Зhirov А.М., Шапакон Н.А., Куличенко А.Н. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

## Об авторах:

Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Писаренко С.В., Буравцева Н.П., Печковский Г.А., Аксенова Л.Ю., Семенова О.В., Варфоломеева Н.Г., Головинская Т.М., Чмеренко Д.К., Ковалев Д.А., Жиров А.М., Шапакон Н.А., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Поступила 21.06.19.

Отправлена на доработку 19.08.19.

Принята к публ. 22.08.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-51-57

UDC (Universal Decimal Classification) 616.98:579.842.23(470)

G.A. Eroshenko<sup>1</sup>, N.V. Popov<sup>1</sup>, Zh.V. Alkhova<sup>1</sup>, A.N. Balykova<sup>1</sup>, L.M. Kukleva<sup>1</sup>, N.S. Chervyakova<sup>1</sup>, N.S. Maykanov<sup>2</sup>, A.Kh. Sarmuldina<sup>2</sup>, V.V. Kutyrév<sup>1</sup>**Circulation of *Yersinia pestis* in the Volga-Ural Sandy Focus: Spatiotemporal Analysis**<sup>1</sup>Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation;<sup>2</sup>Ural Control Plague Station, Uralsk, Republic of Kazakhstan

**Abstract. Aim.** The present paper provides a comparative analysis of the phylogenetic relationship between *Yersinia pestis* strains isolated in the Volga-Ural sandy natural focus during the periods of 1912–1945 and 1963–2003, which were characterised by different levels of epidemic activity, in order to identify the spatiotemporal patterns in the circulation of the plague pathogen in the North Caspian region. **Materials and methods.** We studied the properties and performed whole-genome sequencing of 18 *Y. pestis* strains from the Volga-Ural sandy focus, along with 12 strains from other foci in the North Caspian and North Aral regions, isolated from 1912 to 2003. The phylogenetic analysis was performed drawing on the whole-genome SNP analysis, which was conducted on the basis of 2188 SNPs identified in the core genome using the Wombac 2.0 program. Maximum Likelihood Dendrogram (GTR model) was used for the analysis of phylogenetic relationships between strains. **Results and discussion.** All studied strains from the foci of the North Caspian region belong to the main subspecies (biovar *medievalis*) of the plague pathogen. These are highly virulent and epidemiologically dangerous strains. The whole-genome sequencing and phylogenetic analysis of 30 strains from the Volga-Ural sandy focus, as well as adjacent plague foci, reveal that the strains (biovar *medievalis*) of two phylogenetic branches – 2.MED4 and 2.MED1 – were spread across the focus under study in the early 20th century. It is confirmed that 2.MED1 strains were the etiological agents of plague outbreaks in the Volga-Ural sandy focus during this period. The study revealed the presence of parallel evolutionary lines in 2.MED1 associated with plague outbreaks in the first half of the last century. In the second half of the 20th and early 21st centuries, the modern evolutionary line of 2.MED1 became widespread in the Volga-Ural sandy focus. The strains of this line are closely grouped, which indicates their close genetic relationship. Only sporadic cases of plague were recorded during this period. Modern strains from the Volga-Ural sandy focus (1963–2003), as well as the strains previously isolated there (1912–1945), do not originate from each other. These strains represent closely related, independent evolutionary branches, extending from the common trunk of 2.MED1. Modern strains originating from those of the North Aral desert focus (1945) form a separate cluster in the dendrogram. This suggests that, following a break in the 1950s, the Volga-Ural sandy focus was re-colonised by closely related strains from the North Aral region.

**Key words:** *Yersinia pestis* strains, Volga-Ural sandy focus, phylogenetic analysis, circulation of plague agent.

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

**Corresponding author:** Galina A. Eroshenko, e-mail: rusrap1@microbe.ru.

**Citation:** Eroshenko G.A., Popov N.V., Alkhova Zh.V., Balykova A.N., Kukleva L.M., Chervyakova N.S., Maykanov N.S., Sarmuldina A.Kh., Kutyrév V.V. Circulation of *Yersinia pestis* in the Volga-Ural Sandy Focus: Spatiotemporal Analysis. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 3:51–57. (In English). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-51-57

Received 17.07.19. Revised 02.08.19. Accepted 09.08.19.

This article was translated by Natalia Popova Laboratory of Scientific Translation.

Г.А. Ерошенко<sup>1</sup>, Н.В. Попов<sup>1</sup>, Ж.В. Альхова<sup>1</sup>, А.Н. Балыкова<sup>1</sup>, Л.М. Куклева<sup>1</sup>, Н.С. Червякова<sup>1</sup>, Н.С. Майканов<sup>2</sup>, А.Х. Сармулдина<sup>2</sup>, В.В. Кутырев<sup>1</sup>**ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННОЙ АНАЛИЗ ЦИРКУЛЯЦИИ *YERSINIA PESTIS* В ВОЛГО-УРАЛЬСКОМ ПЕСЧАНОМ ОЧАГЕ**<sup>1</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация;<sup>2</sup>РГУ «Уральская противочумная станция» Комитета контроля качества безопасности товаров и услуг Министерства здравоохранения Республики Казахстан, Уральск, Республика Казахстан

**Цель работы** – сравнительный анализ филогенетического родства штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в периоды 1912–1945 и 1963–2003 гг. с различной эпидемической активностью в Волго-Уральском песчаном природном очаге, для выявления пространственно-временных закономерностей циркуляции возбудителя чумы в регионах Северного Прикаспия. **Материалы и методы.** Проведено исследование свойств и полногеномное секвенирование 18 штаммов *Y. pestis* из Волго-Уральского песчаного очага и 12 штаммов из других очагов Северного Прикаспия и Северного Приаралья, выделенных с 1912 по 2003 год. Филогенетический анализ выполнен по данным полногеномного SNP-анализа на основе 2188 выявленных SNPs. Поиск SNPs в коровом геноме проведен с помощью программы Wombac 2.0. Для анализа филогенетических связей штаммов использована дендрограмма Maximum Likelihood, модель GTR. **Результаты и обсуждение.** Все исследованные штаммы из очагов Северного Прикаспия относятся к средневековому биовару основного подвида возбудителя чумы. Это высококовирулентные и эпидемически опасные штаммы. По данным полногеномного секвенирования и филогенетического анализа 30 штаммов из Волго-Уральского песчаного и сопредельных очагов чумы установлено, что в начале XX в. на территории очага были распространены штаммы двух филогенетических ветвей средневекового биовара – 2.MED4 и

2.MED1. Доказано, что штаммы 2.MED1 являлись этиологическими агентами вспышек чумы в Волго-Уральском песчаном очаге в этот период. Выявлено наличие параллельных линий эволюции в ветви 2.MED1, связанных со вспышками чумы в первой половине прошлого века. Во второй половине XX и начале XXI вв. в Волго-Уральском песчаном очаге получила распространение современная линия эволюции ветви 2.MED1, штаммы которой тесно сгруппированы, что свидетельствует о близком генетическом родстве этих штаммов. В этот период зарегистрированы лишь спорадические случаи заболевания людей чумой. Современные штаммы из Волго-Уральского песчаного очага (1963–2003 гг.) и ранее выделявшиеся штаммы (1912–1945 гг.) не ведут происхождения друг от друга, а представляют близкородственные, но независимые ветви эволюции, отходящие от общего ствола ветви 2.MED1. Современные штаммы образуют отдельный кластер дендрограммы, в основании которого лежат штаммы из Северо-Приаральского пустынного очага 1945 г. Это позволяет сделать предположение о повторном заселении территории Волго-Уральского песчаного очага после перерыва активности в 50-е годы прошлого столетия близкородственными штаммами из Северного Приаралья.

*Ключевые слова:* штаммы *Yersinia pestis*, Волго-Уральский песчаный очаг, филогенетический анализ, циркуляция возбудителя чумы.

*Корреспондирующий автор:* Ерошенко Галина Александровна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

*Для цитирования:* Ерошенко Г.А., Попов Н.В., Альхова Ж.В., Балькова А.Н., Куклева Л.М., Червякова Н.С., Майканов Н.С., Сармулдина А.Х., Кутырев В.В. [Пространственно-временной анализ циркуляции *Yersinia pestis* в Волго-Уральском песчаном очаге]. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 3:51–57. (Англ. яз.). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-51-57

Оригинал статьи на русском языке размещен на сайте журнала (вып. 3, 2019).

## Introduction

The Russian Federation encompasses 11 natural foci of plague, which are located in the Caspian region, Siberia and the Caucasus [1, 2]. The total plague-enzootic area on the territory of the Russian Federation comes to 222,377 km<sup>2</sup>. The North Caspian region includes the transboundary Volga-Ural sandy natural focus occupying sandy landscapes in the southern part of the Volga-Ural interfluvium [3]. Administratively, the above-mentioned focus is located in the Astrakhan Region of the Russian Federation, as well as in the Ural and Atyrau regions of the Republic of Kazakhstan. This focus, encompassing a total area of 61,000 km<sup>2</sup> (including 8,625 km<sup>2</sup> on the territory of Russia), constitutes a multi-host and multi-vector system. Main plague hosts are small gerbils: midday gerbil (*Meriones meridianus*) and tamarisk gerbil (*M. tamariscinus*), accounting for 93 % of the total cultures that have been isolated from rodents since 1926. The plague vectors are parasites specific to gerbils (*Nosopsyllus laeviceps* and *Xenopsylla conformis*), accounting for 74.7 % of the total cultures that have been isolated from fleas since 1926. In the last century, the Volga-Ural sandy focus was one of the most epizootically and epidemically active natural plague foci of the Russian Federation and other countries of the Commonwealth of Independent States (CIS). The focus has been regularly monitored since 1926, with plague epizootics being first recorded in that area in 1922. From 1922 to 2007 (85 years), epizootics were recorded for 65 years (epizootic index of 0.76). Major deterioration of the epizootic situation occurred in 1937–1941, 1945–1946, 1951–1952, 1962–1963, 1966, 1971–1972, 1979–1980 and 1989–2002. The periods when infected animals were registered in different parts of the focus varied from 1 to 13 years. In separate landscape areas of the focus, intervals between infected animals being registered reached from 2–6 to 10–38 years. In 1989–2007, epizootic manifestations were recorded mainly in the northern and central parts of the focus. From 2008 to 2019, no infected

animals were found on the territory of the focus. Long intervals between registered epizootic manifestations of plague on the territory of the Volga-Ural sandy focus are referred to as inter-epizootic periods [4, 5]. The mechanism involved in the subsequent reactivation of the focus remains unclear [6–8]. Significantly, long intervals between registered epizootic manifestations of plague are also characteristic of other plain natural foci of the North Caspian and North Aral regions. In particular, the cessation of epizootics that took place in 2002–2019 also occurred on the plague-enzootic territory of the Ural-Emba interfluvium, which is adjacent to the Volga-Ural sandy focus, as well as in other landscape regions in the northern part of the desert zone of the Russian Federation and the Republic of Kazakhstan [9, 10]. In 1899–2019, 38 epidemiological years and 117 outbreaks were recorded in the Volga-Ural sandy focus, with most of these outbreaks being associated with livestock breeders working in sandy areas. The largest outbreaks were noted in 1905 (Beketay; 659 cases, 621 deaths); 1911 (Kulken; 148 cases, 148 deaths), 1923 (Kunbergen; 80 cases, 76 deaths) and 1937–1938 (Volga-Akhtuba floodplain, 61 cases) [11]. The total number of infected people amounted to 2,450 in 214 populated localities. The epidemic outbreaks were facilitated by the socio-economic conditions of the local population, migration when changing pastures, living in dugouts, an abundance of insects in dwellings and hunting. Bubonic forms of the disease predominated, although pneumonic forms of plague were often recorded.

Presently, the risk of plague infection is increasing due to the closer contacts of the population with natural foci (agricultural work, oil and gas extraction, an increase in the migratory activity of the population, hunting, etc.). The long-term environmental and epidemiological forecast for 2019–2020 indicates a high probability that the natural plain foci in the northern and eastern Caspian regions will become more active [12, 13]. In this connection, a number of measures need to be implemented in order to ensure the epidemiological welfare on the

territory of the Volga-Ural sandy focus. Firstly, the epidemiological surveillance of plague should be strengthened significantly. Secondly, it is necessary to decipher the mechanisms involved in activating the natural foci of this highly dangerous infection on the plague-zoonotic transboundary territory of the Russian Federation and the Republic of Kazakhstan [14–16].

As it was previously shown using traditional microbiological methods and confirmed by molecular genetic analysis, as well as the whole-genome sequencing, *Y. pestis* strains from the natural foci of the Caspian region belong to the medieval biovar for the main subspecies, i.e. they are highly virulent and epidemiologically significant. The *Y. pestis* strains of medieval biovar (2.MED line according to the genetic nomenclature) constitute one of the youngest evolutionary lines, which includes the following branches: 2.MED0 (strains from the Central Caucasian high-mountain focus of the Russian Federation), 2.MED1 (most foci of the Russian Federation and other CIS countries, Iran, China), 2.MED2 and 2.MED3 (foci of China) [17–19].

Over a long period of monitoring the Volga-Ural sandy focus, a large number of *Y. pestis* strains were isolated from patients, hosts and vectors (1912–2003). This collection, whose chronology reflects the history of the focus, belongs to the State collection of pathogenic bacteria housed by the Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. Modern technologies of molecular genetic analysis and whole-genome sequencing provide a unique opportunity to study the evolution of *Y. pestis* in the Volga-Ural sandy focus over a period of about 100 years, as well as to analyse epizootological and epidemiological data. Earlier, we published a similar work on the phylogenetic analysis of the *Yersinia pestis* strains (biovar *medievalis*) isolated in the North-West Caspian steppe focus [20].

**Aim:** The present paper provides a comparative analysis of the phylogenetic relationship between *Yersinia pestis* strains isolated in the Volga-Ural sandy focus during the periods of 1912–1945 and 1963–2003, which are characterised by different epidemic activity, as well as identifies the spatiotemporal patterns in the circulation of plague pathogens in the North Caspian region.

## Materials and methods

***Y. pestis* strains, culture conditions, biochemical analysis.** The strains of *Y. pestis* used in this work were obtained from the State collection of pathogenic bacteria at the premises of the Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. The strains were cultured in agar and Hottinger broth at 28 °C for 24–48 hours. The capacity of *Y. pestis* strains for the fermentation of sugars and glycerol, as well as for the reduction of nitrates was determined using standard laboratory diagnostic methods [21].

**Whole-genome sequencing, identification of SNPs, dendrogram construction.** The DNA of *Y. pestis* strains was isolated using a PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, USA). The whole-genome se-

quencing of *Y. pestis* strains was performed in the Ion PGM system (Life technologies), with the Ion Torrent Suite software package 3.4.2 and Newbler gsAssembler 2.6 being used for data processing. SNPs were identified by aligning the contigs of strains against the CO92 genome using Wombac 2.0 followed by the removal of 28 SNP homoplasies [22]. A model of nucleotide substitutions was selected using two programs: jMODELTEST 2.1.7 and MEGA X. Considering the AIC and BIC criteria, the GTR model was selected. Phylogenetic analysis was performed through the Maximum Likelihood method using the following programs: Mesquite 3.6 and PhyML-3.1 (500 bootstrap replicas).

## Results

**Features of strains from the Volga-Ural sandy focus.** We studied a total of 18 *Y. pestis* strains isolated in the Volga-Ural sandy focus during the 1912–2003 period. In addition, a total of 12 strains from other foci of the North Caspian and North Aral regions were taken for comparison, which included two strains from the North-West Caspian steppe focus, one strain from the Volga-Ural steppe focus, two strains from the Trans-Ural steppe focus, one strain from the Ustyurt desert focus, three strains from the North Aral desert focus, one strain from the Caspian sandy focus, as well as one strain from the Central Caucasian high-mountain focus and one strain from the Zangezur-Karabakh mesofocus of the Transcaucasian high-mountain focus (Table). Strains from the Volga-Ural sandy focus were isolated at different time periods and from different sources. Eleven strains obtained in the first half of the 20th century from (1912–1945) were isolated from humans (7 strains), camels (1 strain), house mice (1 strain), yellow ground squirrels (1 strain) and midday gerbils (1 strain).

In the second half of the 20th century (1963–2002), seven of the other studied *Y. pestis* strains were isolated in the Volga-Ural sandy focus from hosts and vectors: tamarisk gerbils (*M. tamaricinus*, 4 strains), midday gerbils (*M. meridianus*, 1 strain) and their fleas (1 strain), as well as from little ground squirrels (*C. pygmaeus*, 1 strain). Twelve strains taken for comparison from other foci of the North Caspian and North Aral regions were isolated in 1923–1992 from humans (6 strains), little ground squirrels (*C. pygmaeus*, 3 strains), great gerbils (*Rhombomys opimus*, 2 strains) and fleas (*Citellophilus tesquorum*, 1 strain) (Table). In this study, we performed a comprehensive analysis of the properties exhibited by these strains. We studied phenotypic and genetic properties; performed whole-genome sequencing of 30 strains (including 18 strains from the Volga-Ural sandy focus), as well as their phylogenetic analysis.

All strains from the Volga-Ural sandy focus exhibited cultural and morphological properties typical of *Y. pestis* and were uniform in terms of biochemical characteristics. They did not ferment rhamnose and melibiose, which suggests they belonged to the main subspecies of the plague pathogen. In addition, they uti-

Origin and characteristics of the studied *Y. pestis* strains from the State collection of pathogenic bacteria at the premises of the Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe"

Strain No., name and No. of the focus	Isolation source	Location	Phylogenetic branch
2 Volga-Ural sandy focus (16)	human, 1912	Western Kazakhstan	2.MED1
3 Volga-Ural sandy focus (16)	<i>Mus musculus</i> , 1917	Western Kazakhstan	2.MED1
4 Volga-Ural sandy focus (16)	camel, 1917	Western Kazakhstan	2.MED4
7 Volga-Ural sandy focus (16)	human (corpse), 1922	Western Kazakhstan	2.MED1
8 Volga-Ural sandy focus (16)	human (corpse), 1922–1923	Western Kazakhstan	2.MED1
15 Volga-Ural sandy focus (16)	human (corpse), pneumonic form, 1923	Ural province	2.MED1
31 Volga-Ural sandy focus (16)	yellow ground squirrel, <i>Citellus fulvus</i> , 1924	Ural province	2.MED4
260 Volga-Ural sandy focus (16)	human, 1924	No data	2.MED1
106 Volga-Ural sandy focus (16)	midday gerbil <i>Pallasiomys meridianus</i> , 1928	Ural province	2.MED1
174 Volga-Ural sandy focus (16)	human, 1932	Kazakhstan	2.MED1
556 Volga-Ural sandy focus (16)	human (corpse), 1945	Guryev Region	2.MED1
768 Volga-Ural sandy focus (16)	tamarisk gerbils <i>Meriones tamariscinus</i> , 1963	Astrakhan Region	2.MED1
M-1722 Volga-Ural sandy focus (16)	8 tamarisk gerbils <i>Meriones tamariscinus</i> , 1977	Guryev Region	2.MED1
KM639 Volga-Ural sandy focus (16)	tamarisk gerbils <i>Meriones tamariscinus</i> , 1980	Ural province	2.MED1
KM642 Volga-Ural sandy focus (16)	7 tamarisk gerbils <i>Meriones tamariscinus</i> , 1980	Guryev Region	2.MED1
M-1478 Volga-Ural sandy focus (16)	3 little ground squirrels <i>Citellus pygmaeus</i> , 1992	Aygyr	2.MED1
M-1501 Volga-Ural sandy focus (16)	3 midday gerbils <i>Meriones meridianus</i> 1992	city of Sary	2.MED1
M-1773 Volga-Ural sandy focus (16)	from fleas of midday gerbil <i>Meriones meridianus</i> , 2002	Astrakhan Region	2.MED1
146 Transcaucasian high-mountain focus (Zangezur-Karabakh mesofocus, 09)	human (corpse), pneumonic form, 1931	Azerbaijan SSR, Nagorno-Karabakh	2.MED4
27 North-West Caspian focus (14)	little ground squirrel <i>Citellus pygmaeus</i> , 1924	Rostov Region	2.MED4
9 North-West Caspian steppe focus (14)	human (corpse) Demetrius, 1923	Rostov Region	2.MED1
M-1484 Volga-Ural steppe focus (16)	5 little ground squirrels <i>Citellus pygmaeus</i> , 1992	Boltay	2.MED1
M-1448 Trans-Ural steppe focus (17)	little ground squirrel <i>Citellus pygmaeus</i> 1990	Chapaev anti-plague division, Esensay	2.MED1
M-1489 Trans-Ural steppe focus (17)	great gerbil <i>Rhombomys opimus</i> , 1992	Kois	2.MED1
M-1467 Ustyurt desert focus (19)	great gerbil <i>Rhombomys opimus</i> , 1990	Guryev Region	2.MED1
578 North Aral desert focus (21)	human, bubonic form, 1945	Kazakhstan, Kyzylorda Region	2.MED1
580 North Aral desert focus (21)	human, primary pneumonic form, 1945	Kazakhstan, Kyzylorda Region	2.MED1
928 North Aral desert focus (21)	human, bubonic form, 1955	Kazakh SSR	2.MED1
258 Caspian sandy focus (43)	human, bubonic form, 1930	Astrakhan	2.MED1
KM 919 Central Caucasian high-mountain focus (1)	fleas <i>Citellophilus tesquorum</i> from Caucasian Mountain ground squirrel <i>Citellus musicus</i> , 1986	Kabardino-Balkar ASSR, city of Kzyz-Kol	2.MED1

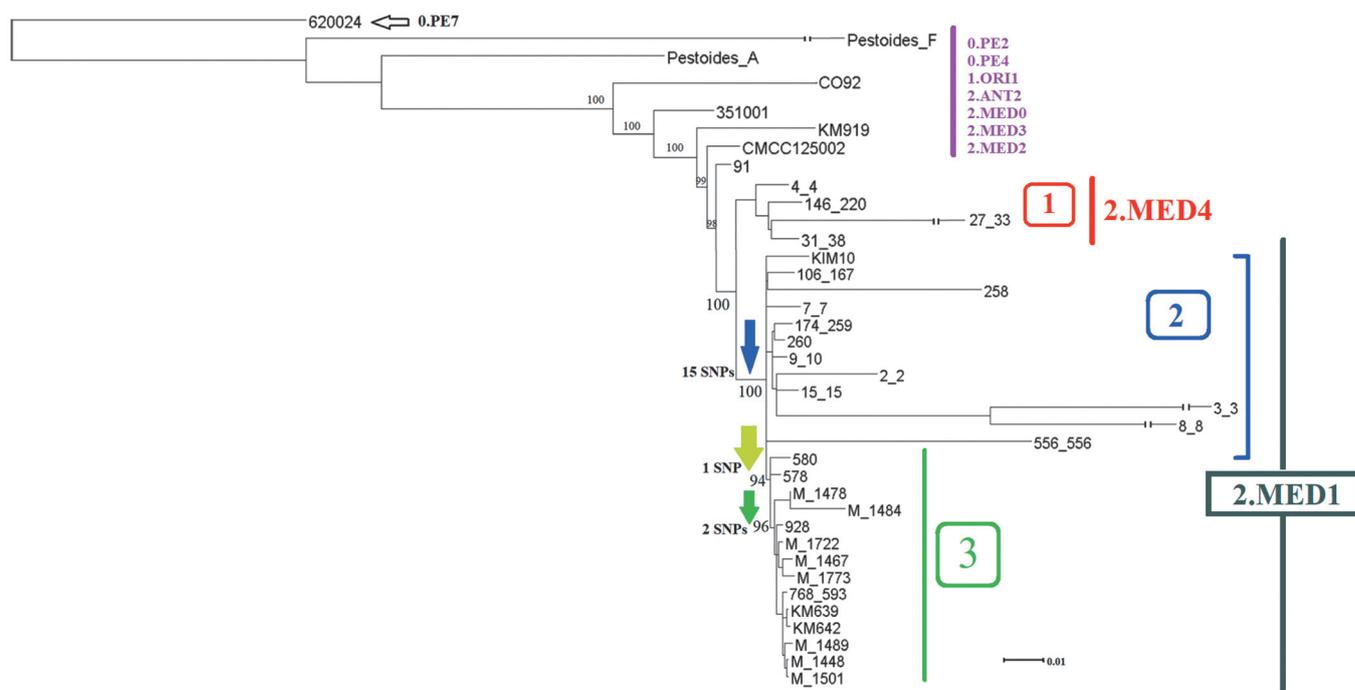
lised glycerol and didn't reduce nitrates which proves their belonging to the biovar *medievalis* of the main subspecies *Y. pestis*. The strains taken for comparison from other foci (North-West Caspian steppe focus, Volga-Ural steppe focus, Trans-Ural steppe focus, Ustyurt desert focus, Caspian sandy focus and North Aral desert focus) belonged to the medieval biovar of the main subspecies and exhibited the same set of properties.

**The phylogeny of strains from the Volga-Ural sandy focus.** In order to construct a phylogenetic tree of strains from the Volga-Ural sandy focus, we analysed the whole-genome sequences of all 18 strains from this focus and 10 strains from the adjacent foci of the North Caspian and North Aral regions, as well as 1 strain from the Central Caucasian high-mountain focus and 1 strain from the Zangezur-Karabakh mesofocus (Transcaucasian high-mountain focus), which we sequenced. The analysis also included strains of other phylogenetic lines from different world foci, whose sequences were taken from

the NCBI GenBank database. These include the following genomes: Pestoides F (ssp. *caucasica*), Pestoides A (ssp. *altaica*), 620024 (ssp. *tibetica*), C092 (main subspecies, biovar *orientalis*), 351001 (main subspecies, biovar *antiqua*), 91 (main subspecies, biovar *medievalis*, 2.MED2), CMCC125002 (main subspecies, biovar *medievalis*, 2.MED3).

Drawing on the whole-genome SNP analysis of these genomes performed on the basis of 2188 found SNPs, we constructed a dendrogram showing phylogenetic relationships between strains from the Volga-Ural sandy focus (Figure). As it follows from the dendrogram, all strains from the Volga-Ural sandy focus are divided into three phylogeographic groups (No. 1, No. 2, No. 3) in accordance with the time and place of their isolation.

Two strains – 4 (1917) and 31 (1924) – were included into a separate early diverged branch of the medieval biovar strains, which is denoted as 2.MED4. In the dendrogram, 2.MED4 (Figure, No. 1) precedes a large clus-



Dendrogram of the phylogenetic relationship between *Y. pestis* strains from the Volga-Ural sandy focus constructed in accordance with the whole-genome SNP analysis. The Maximum Likelihood Dendrogram showing 38 genomes of *Y. pestis* strains was constructed on the basis of 2188 SNPs using PHYML 3.1 and the GTR model

ter of strains belonging to the biovar *medievalis* of the phylogenetic branch 2.MED1. In addition to two strains from the Volga-Ural sandy natural focus (4 and 31), 2.MED4 includes strain 27 (1924) from the North-West Caspian focus and strain 146 (1931) from the Zangezur-Karabakh high-mountain focus. Strain 146 was isolated from a human (1 case), the other three strains were obtained from a camel (1 case) and ground squirrels (2 cases), which confirms the circulation of *Y. pestis* belonging to 2.MED4 in the natural biocenosis of the Volga-Ural sandy focus. Thus, strains belonging to the early evolutionary branch of medieval biovar (2.MED4) were isolated in these foci in the early 20th century, with their subsequent disappearance from this territory.

The remaining sequenced strains from the Volga-Ural sandy focus, obtained in the first half of the 20th century (1912–1945), make up another group of strains that belongs to 2.MED1 (Figure, No. 2). The 2.MED1 population of this period in the Volga-Ural sandy focus includes a number of separate evolutionary lines represented in the dendrogram by single strains and one cluster, which consists of 7 strains isolated in 1912–1932, mainly in Western Kazakhstan. This cluster, in turn, includes two subclusters, one of which consists of two strains, 174 (1932) and 260 (1924); whereas the other subcluster includes strains 2 (1912) and 15 (1923), as well as a far branch consisting of two strains 3 (1917) and 8 (1922–1923). Strain 9 (1923) from the North-West Caspian steppe focus is also included in the same cluster. In addition to the cluster made up of seven strains, the phylogenetic group No. 2 comprises strains forming separate evolutionary lines: 7 (1922, human), 106 (1928, midday gerbil), 556 (1945, human), as well as a single

strain 258 (1930, human) from the Caspian sandy focus. Thus, of nine 2.MED1 strains isolated in 1912–1945 in the Volga-Ural sandy natural focus, 7 strains were obtained from humans. Clearly, this cluster is represented by epidemic strains – aetiological agents of plague outbreaks in this focus.

In general, 2.MED1 strains isolated in the Volga-Ural sandy focus in the early 20th century (1912–1945) are characterised by the presence of separate parallel evolutionary lines having long branches, which indicates their rapid evolution, possibly associated with the occupation of new territories and/or changes in climatic conditions. Many of these strains were obtained from humans, proving that outbreaks that occurred in this area in the early 20th century were caused by the *Y. pestis* of the 2.MED1 phylogenetic branch (biovar *medievalis*), which circulated in the natural biocenosis of the Volga-Ural sandy focus. Strains belonging to the phylogenetic lines of 2.MED1 (1912–1945), subsequently disappeared from this territory.

The phylogeny, differing from the strains of the early 20th century, is represented by *Y. pestis* strains isolated in the Volga-Ural sandy focus in the second half of the 20th and early 21st centuries, which form a separate phylogenetic group within 2.MED1 (Figure, No. 3). The strains in question were obtained from hosts and their fleas in 1963–2003. The entire cluster is preceded by strains from the North Aral desert focus – *Y. pestis* 578 (1945) and 580 (1945). The group of modern strains from the Volga-Ural sandy natural focus is divided into three subclusters, the first of which, includes strain M-1478 (1992) from the Volga-Ural sandy natural focus and strain M-1484 (1992) from the Volga-Ural steppe

focus. The strains of this phylogenetic group are further divided into two subclusters, which are preceded by *Y. pestis* strain 928 (1955) from the North Aral focus. One of them (strains isolated in 1976–2003) includes a separately located strain M-1722 (1977) from the Volga-Ural sandy focus, as well as two related strains: M-1773 (2002) from the Volga-Ural sandy focus and M-1467 (1990) from the Ustyurt desert focus (19). The other large subcluster includes six strains, mainly from the Volga-Ural sandy focus (1963–1992). This subcluster contains a separately located strain 768 (1963). Two strains KM639 (1980) and KM642 (1980) also form a separate group in the subcluster. One more group consists of two strains: M-1501 (1992) from the Volga-Ural sandy focus and M-1448 (1990) from the Trans-Ural steppe focus. In the dendrogram, these two strains are preceded by strain M-1489 (1992) from the Trans-Ural steppe focus (17).

In general, the modern strains from the Volga-Ural sandy focus isolated from hosts and vectors in 1963–2003 exhibit a close clustering of strains, which indicates close genetic affinity of these strains and the constancy of their living conditions that are not associated with climate changes and/or the occupation of new territories. Evidently, they are well adapted to the current biocenosis of the Volga-Ural sandy focus. These strains are not associated with plague outbreaks, which distinguishes them from strains isolated at the beginning of the 20th century in the Volga-Ural sandy focus. In general, the strains of these two phylogenetic groups do not originate from each other; they represent closely related, independent branches of evolution, extending from the common trunk of 2.MED1.

### Discussion

The *Y. pestis* strains of the main subspecies (biovar *medievalis*) are widespread in the natural foci of the Russian Federation, other CIS countries, Iran and China. These are highly virulent and epidemiologically dangerous strains. In the late 18th – early 20th centuries, numerous plague outbreaks of unknown aetiology were recorded in the Caucasus and the Caspian region. The study results presented in this article along with the data that we have published previously [12], prove that at least since the beginning of the 20th century (1912), outbreaks in the North Caspian region have been caused by the strains of a biovar *medievalis*. The strains belonging to 2.MED4, which were isolated in the early 20th century in the foci of the Caspian region (Volga-Ural sandy focus, North-West Caspian steppe focus) and the Transcaucasian high-mountain focus, were detected for the first time. This branch which diverged earlier from the common evolutionary trunk might be associated with the plague outbreaks that occurred there in the late 18th – early 20th centuries. A younger phylogenetic branch 2.MED1 diverged from the common evolutionary trunk of the medieval biovar later than 2.MED4. However, 2.MED1 strains are currently widespread in the various

foci (mountain, high-mountain, low-mountain, steppe and desert) of the Russian Federation and other CIS countries in the Caucasus, in Caspian region and Central Asia. The reasons for biovar *medievalis* being adapted to different geographical landscapes and, especially, to foci characterised by a highly arid climate (where other strains of the plague pathogen are not found) are not known. It is also unknown when the medieval biovar occupied these territories. Paleogenetic studies, which have become possible with the development of high-resolution whole-genome sequencing, can provide the answer to this question. It is known that *Y. pestis* strains (biovar *antiqua*) of the 1.ANT branch were isolated on the territory of the 16th century Tatarstan. These strains – not biovar *medievalis* strains, as previously thought – supposedly caused the second plague pandemic [17]. We assume that the biovar *medievalis* became widespread later – in the 18th century, at the end of the second plague pandemic. The data obtained in this study confirm that 2.MED1 strains underwent intensive evolution in the early 20th century on the territory of the North Caspian region, with the development of independent parallel evolutionary branches of 2.MED1, whose strains occupied new territories or adapted to a changing habitat. In the early 20th century, these strains served as aetiological agents for a large number of high-mortality plague outbreaks in the foci of the Caspian region. Mass high-mortality outbreaks resulted from a wide distribution of these strains in nature; a high number of hosts in the foci of the Caspian region, as well as the proximity of a large, at that time, population to rodent colonies, the abundance of fleas and a low social level. In the years following the 1940s, such strains were no longer isolated. The evolution of 2.MED1 continued with the formation of the modern branch, which includes strains isolated in the second half of the 20th century. For at least 10 years (1950s), there was a temporary break between strain isolations of the first and second halves of the 20th century in the Volga-Ural sandy focus. During this period, the strains were not isolated; no epizootic manifestations, as well as no outbreaks and sporadic cases of plague in humans, were observed. The last point mentioned indirectly confirms the “healing” of the focus as a result of *Y. pestis* strains of various phylogenetic groups being eliminated under the influence of climatic and anthropogenic factors. At the same time, strains of the modern phylogenetic group have been isolated here since 1962. According to the phylogenetic analysis, they are closely related to strains that were previously isolated there in the first half of the 20th century; however, they do not originate directly from them. The dendrogram shows that modern strains from the Volga-Ural sandy focus are preceded by strains from the North Aral desert focus isolated in 1945. This may indicate that, following a break associated with unfavourable climatic conditions, the territory of Volga-Ural sandy focus was once again populated by closely related strains of 2.MED1, which originated from the northern subzone of the Aral deserts. Prior to that, strains belonging to one of the indepen-

dent evolutionary branches of 2.MED1 (presumably from the Volga-Ural sandy focus) could be introduced into the North Aral desert focus in the first half of the 20th century. A plague epidemic was recorded there in 1945, followed by epidemic outbreaks in 1947, 1955, 1966 and 1967. Thus, it can be assumed that, following a break in the 1950s, the territory of the Volga-Ural sandy focus was re-colonised by closely related *Y. pestis* strains, which 'returned' from the North Aral desert region. However, in order to confirm the phylogenetic relationships of strains from the North Caspian and North Aral regions, it is necessary to study a larger number of strains from the North Aral desert focus. From this point of view, it is the elimination of the plague pathogen that is one of the possible reasons for no infected animals being currently found in the enzootic territory of the northern part of the desert zone of the Russian Federation and the Republic of Kazakhstan. In this regard, the conditions for another plague expansion on the territory of the Volga-Ural sandy focus will be entirely determined by the epizootic activity of adjacent natural plague foci in the North Caspian and North Aral regions.

In terms of virulence, there is no difference between the strains of the biovar *medievalis* of the beginning and the second half of the 20th century. Differences in the incidence rate of plague are associated with the following points: difference in the epizootic activity; a wide distribution of *Y. pestis* strains in the foci of the Caspian region at the beginning of the 20th century; a greater population density in the foci; as well as lower living standards in the early 20th century.

## References

1. Onishchenko G.G., Kutuyev V.V., editors. Natural plague foci of the Caucasus, Caspian area, Central Asia and Siberia. Moscow: Medicine; 2004. 192 p.
2. Wang S.B., Sun Y.Z. The geographical distribution and main ecological characteristics of plague natural foci in the Middle Asia, Russian Siberia and Mongolia. *Endem. Dis. Bull.* 1999; 14:83–8.
3. Burdelova L.A., editor. Atlas of highly dangerous infections in the Republic of Kazakhstan. Almaty; 2012. 232 p.
4. Kalabukhov N.I. Long breaks in the epizootic activity of natural plague foci and their probable causes. *Zoological Journal.* 1969; 48(2):165–75.
5. Shevchenko V.L., Kaimashnikov V.I., Andreeva T.A. The mechanism involved in maintaining natural plague focality in the Volga-Ural sands. *Zoological Journal.* 1969; 48(2):270–81.
6. Bidashko F.G., Pak M.V., Belonozhkina L.B., Parfenov A.V. Cyclicity of plague activity in the foci located in the north-west of Kazakhstan. *Quarantine and zoonotic infections in Kazakhstan.* Almaty. 2018; 1–2:14–25.
7. Davis S, Begon M, De Bruyn L, Ageyev VS, Klassovskiy NL, Pole SB, Viljugrein H, Stenseth NC, Leirs H. Predictive thresholds for plague in Kazakhstan. *Science.* 2004; 304(5671):736–8. DOI: 10.1126/science.1095854.
8. Samia NI, Kausrud KL, Heesterbeek H, Ageyev V, Begon M, Chan KS, Stenseth NC. Dynamics of the plague-wildlife-human system in Central Asia are controlled by two epidemiological thresholds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011; 108(35):14527–32. DOI: 10.1073/pnas.1015946108.
9. Khamzin E.Kh., Saraev F.A., Kozulina I.G., Nasikhanova K.N., Bashmakova A.A., Melyatova I.B., Bashmakov A.A. Epizootic activity in the Volga-Ural sandy plague focus on the territory of the Atyrau region in the last decade and the number of main carriers. *Quarantine and zoonotic infections in Kazakhstan.* Almaty. 2017; 1–2:34–6.
10. Atshabar B. B., Burdelov L. A., Izbanova U.A., Lukhnova L. Yu., Meka-Mechenko T.V., Meka-Mechenko V.G., Kunitsa T.N., Sadovskaya V.P., Saptaev S.K., Sarmantayeva A.B., Sansyzbaev E.B., Nurmakhanov T.I., Abdel Z.Zh., Kozhakhmetova M.K., Aymakhanov B.K., Kuznetsov A.N., Sagiev Z.A., Kulbaeva M.M., Alybaev S.D., Bekshin Zh.M., Esmagametova A.S., Zhumadilova Z.B., Kazakov S.V., Kuatbaeva A.M. Passport of highly dangerous infections in Kazakh regions. *Quarantine and zoonotic infections in Kazakhstan.* Almaty. 2015; 1(31):5–177.
11. Kutuyev V.V., Popova A.Yu., editors. Cadastre of the epidemic and epizootic manifestations of plague on the territory of the Russian Federation and neighbouring countries (from 1876 to 2015). Saratov: "Amirit"; 2016. 248 p.
12. Serzhan O.S., Aykimbaev A.M., Lukhnova L. Yu. Ecological forecast of the epidemic activity in the natural plague foci in the early 21st century. *Quarantine and zoonotic infections in Kazakhstan.* Almaty. 2000; 2:194–6.
13. Popov N.V., Toporkov V.P., Bezsmertny V.E., Popov V.P., Kuznetsov A.A., Matrosov A.N., Sludsky A.A., Udovikov A.I., Karavaeva T.B., Merkulova T.K., Kutuyev V.V. Long-term prognosis of the epizootic activity in the natural plague foci of the Russian Federation as the basis for increasing the effectiveness of preventive measures. *Life without danger. Health. Prevention Longevity.* 2012; 7(3):14–7.
14. Popova A.Yu., Kutuyev V.V., editors. Assurance of epidemiological welfare in the natural plague foci on the territory of the CIS countries and Mongolia in the modern context. Izhevsk: "Print"; 2018. 336 p.
15. Suleymenov B.M. The mechanism of enzootic plague. Almaty; 2004. 234 p.
16. Jones S.D., Atshabar B., Schmid B.V., Zuk M., Amramina A., Stenseth N.C. Living with plague: Lessons from the Soviet Union's antiplague system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019; 116(19): 9155–63. DOI: 10.1073/pnas.1817339116.
17. Kutuyev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'khova J.V., Oglodin E.G., Guseva N.P. Phylogeny and classification of *Yersinia pestis* through the lens of strains from the plague foci of Commonwealth of Independent States. *Front. Microbiol.* 2018; 9:1106. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01106.
18. Achtman M., Zurth K., Morelli G., Torrea G., Guiyoule A., Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96:14043–8. DOI: 10.1073/pnas.96.24.14043.
19. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110 PMID: 23271803. 5.
20. Eroshenko G.A., Popov N.V., Alkhova Zh.V., Balykova A.N., Kukleva L.M., Kutuyev V.V. Phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* strains of biovar *medievalis*, isolated in the North-West Caspian steppe plague focus in the 20th century. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2019; 2:55–61. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-55-61.
21. Onishchenko G.G., Kutuyev V.V., editors. Laboratory diagnosis of highly dangerous infectious diseases. Practical Guide. Moscow: "Shiko"; 2013. 560 p.
22. Spyrou M. A., Tukhbatova, R. I., Feldman, M., Drath, J., Kacki, S., Beltrán de Heredia J., Arnold S., Sitdikov A.G., Castex D., Wahl J., Gazimzyanov I.R., Nurgaliev D.K., Herbig A., Bos K.I., Krause J. Historical *Y. pestis* genomes reveal the European Black Death as the source of ancient and modern plague pandemics. *Cell Host Microbe.* 2016; 19:874–81. DOI: 10.1016/j.chom.2016.05.012.

## Authors:

Eroshenko G.A., Popov N.V., Alkhova Zh.V., Balykova A.N., Kukleva L.M., Chervyakova N.S., Kutuyev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.  
Maykanov N.S., Sarmuldina A.Kh. Ural Control Plague Station. 36/1, Chapaeva St., Uralsk, Republic of Kazakhstan. E-mail: pchum@mail.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-58-65

УДК 616.98:579.834.114(470)

О.А. Зайцева, Е.С. Котенев, Ю.С. Артюшина, Л.А. Кот, Л.И. Шапошникова, Т.И. Чишенюк,  
О.А. Гнусарева, А.Н. Куличенко

## СОВРЕМЕННАЯ ЭПИДЕМИОЛОГО-ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ИКСОДОВОМУ КЛЕЩЕВОМУ БОРРЕЛИОЗУ НА ЮГЕ ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ

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

**Цель** – анализ современной эпидемиолого-эпизоотологической ситуации по иксодовому клещевому боррелиозу на юге европейской части России. **Материалы и методы.** Материалами исследования послужили эпидемиологические и эпизоотологические данные за 2014–2018 гг., предоставленные Управлениями Роспотребнадзора, Центрами гигиены и эпидемиологии субъектов Северо-Кавказского и Южного федеральных округов и противочумными учреждениями региона: Ставропольским, Волгоградским и Ростовским-на-Дону научно-исследовательскими противочумными институтами, Астраханской, Дагестанской, Кабардино-Балкарской, Причерноморской, Северо-Кавказской, Элистинской противочумными станциями, а также ПЧС Республики Крым. Исследованы данные научных публикаций по эпизоотологическому мониторингу, видовому составу переносчиков и возбудителей иксодового клещевого боррелиоза, участвующих в эпизоотическом и эпидемическом процессе в регионе. При выполнении работы использованы описательные, аналитические эпидемиологические методы, ретроспективный эпидемиологический и картографический анализы. **Результаты и обсуждение.** Отмечено, что на юге европейской части России заболеваемость иксодовым клещевым боррелиозом с 1999 г. имела место в 11 из 15 административных субъектов региона. В Республике Калмыкия заболеваемость иксодовым клещевым боррелиозом не регистрировалась с 2007 г., в Чеченской Республике – с 2014 г. Для выяснения источников заражения иксодовым клещевым боррелиозом на территории Краснодарского и Ставропольского края, Волгоградской и Ростовской областей, Республики Дагестан и Карачаево-Черкесской Республики, а также определения границ природных и природно-антропоургических очагов иксодового клещевого боррелиоза необходимо проведение постоянного эпизоотологического мониторинга. Кроме того, необходимо создание единого алгоритма мониторинга природных очагов, проведение анализа данных с применением современных геоинформационных и статистических инструментов.

**Ключевые слова:** иксодовый клещевой боррелиоз, иксодовые клещи, эпидемиолого-эпизоотологическая ситуация.

*Корреспондирующий автор:* Зайцева Ольга Александровна, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

*Для цитирования:* Зайцева О.А., Котенев Е.С., Артюшина Ю.С., Кот Л.А., Шапошникова Л.И., Чишенюк Т.И., Гнусарева О.А., Куличенко А.Н. Современная эпидемиолого-эпизоотологическая ситуация по иксодовому клещевому боррелиозу на юге европейской части России. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 3:58–65. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-58-65

O.A. Zaitseva, E.S. Kotenev, Yu.S. Artyushina, L.A. Kot, L.I. Shaposhnikova, T.I. Chishenyuk, O.A. Gnusareva,  
A.N. Kulichenko

## Modern Epidemiological and Epizootiological Situation on Ixodic Tick-Borne Borreliosis in the South of the European Part of Russia

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

**Abstract. The aim** is to analyze the current epidemiological and epizootiological situation on ixodic tick-borne borreliosis in the South of the European part of Russia. **Materials and methods.** The research materials were the epidemiological and epizootiological data for 2014–2018 provided by the Rospotrebnadzor Departments, the Hygiene and Epidemiology Centers of the North Caucasian and Southern Federal Districts, and regional anti-plague institutes: Stavropol, Volgograd and Rostov-on-Don research anti-plague institutes, Astrakhan, Dagestan, Kabardino-Balkar, Black Sea, North Caucasus, Elista plague control stations, as well as the plague control station of the Republic of Crimea. The data of scientific publications on epizootiological monitoring, the species composition of vectors and agents of tick-borne borreliosis involved in the epizootic and epidemic process in the region were studied. In the study descriptive, analytical epidemiological methods, retrospective epidemiological and cartographic analyzes were used. **Results and discussion.** It has been noted that in 1999, the incidence of tick-borne borreliosis in the South of the European part of Russia, has occurred in 11 of the 15 administrative regions. The incidence of tick-borne borreliosis in the Republic of Kalmykia, has not been recorded since 2007, in the Chechen Republic – since 2014. To clarify the sources of tick-borne borreliosis infection in the territory of the Krasnodar and Stavropol Territories, the Volgograd and Rostov Regions, the Republic of Dagestan and the Karachay-Cherkess Republic, and also, to determine the boundaries of natural and natural-anthropurgic foci of ixodic tick-borne borreliosis constant epizootiological monitoring is required. In addition, it is necessary to create a unified algorithm for monitoring natural foci, to analyze data using modern geographic information and statistical tools.

**Key words:** ixodic tick-borne borreliosis, ixodid ticks, epidemiological and epizootiological situation.

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

**Corresponding author:** Olga A. Zaitseva, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Citation: Zaitseva O.A., Kotenev E.S., Artyushina Yu.S., Kot L.A., Shaposhnikova L.I., Chishenyuk T.I., Gnusareva O.A., Kulichenko A.N. Modern Epidemiological and Epizootiological Situation on Ixodic Tick-Borne Borreliosis in the South of the European Part of Russia. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 3:58–65. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-58-65

Received 09.07.19. Revised 21.08.19. Accepted 28.08.19.

Иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ) – широко распространенное природно-очаговое, трансмиссивное заболевание, чаще всего регистрируется в Северном полушарии в странах Европы, Азии и Северной Америки [1–6].

Возбудителями ИКБ являются спирохеты, ранее относимые к комплексу *Borrelia burgdorferi sensu lato*. В 2014 г. предложено выделить возбудителей ИКБ в отдельный род *Borrelia*, так как было доказано, что возбудители ИКБ и возвратных лихорадок, ранее объединенные в род *Borrelia*, генетически имеют разных предков [7]. В 2018 г. внесены изменения в «Bergeys Manual of Systematic Bacteriology» [8]. Однако ряд ученых предлагает сохранить прежнее название в связи с рисками возникновения путаницы в информационном потоке [9]. Выделяют 21 генетическую группу (вид) возбудителей ИКБ, вероятно, патогенны для человека: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. valaisiana*, *B. spielmani*, *B. lusitaniae*, *B. bavariensis*, *B. mayonii*, *B. bissettii* [10]. Однако имеются публикации, как указывающие на патогенность *B. valaisiana*, *B. lusitaniae*, *B. mayonii*, *B. bissettii*, так и опровергающие ее [11–14]. В 1995 г. в клещах *Ixodes persulcatus* обнаружен новый вид боррелий, возбудитель клещевых возвратных лихорадок *Borrelia miyamotoi*. Заболевание, вызванное данным видом боррелий, относят к отдельной группе – иксодовым клещевым боррелиозам, вызываемым *B. miyamotoi* (ИКБ-БМ), оно широко распространено в России [15, 16]. Переносчиками и основным резервуаром возбудителей ИКБ являются клещи рода *Ixodes*, в России основное эпидемическое значение имеют клещи *I. persulcatus*, *I. ricinus* [17], но высокую значимость в поддержании циркуляции возбудителей ИКБ в природных очагах имеют и другие иксодовые клещи [18, 19].

Случаи заболевания ИКБ в России регистрируются с 1985 г., последние 7 лет ИКБ занимает первое место по распространенности и регистрации среди инфекций, передающихся клещами.

К регионам с высокой заболеваемостью ИКБ относятся Красноярский край, Республика Алтай,

Томская область и Республика Хакасия. В 2017 г. зарегистрировано 6717 случаев заболевания ИКБ в 76 из 85 субъектов страны, в 2018 г. – 6481 случай. Среднее число регистрируемых случаев за период 2009–2018 гг. составило 7374,2, что свидетельствует о снижении заболеваемости в последние годы [3, 20] (рис. 1).

Заболеваемость ИКБ в России регистрируется круглогодично, самые высокие средние показатели отмечаются в июне–августе (1348–1859 случаев), самые низкие в марте (23,4), что связано с периодом активности клещей. По поводу присасывания клещей в России ежегодно обращается 400–550 тыс. человек, более половины всех случаев приходится на май и июнь. В 2018 г. отмечено 521107 обращений, из которых 164903 зарегистрировано в мае, 170707 в июне [20].

На юге европейской части России – Южный и Северо-Кавказский федеральные округа (ЮФО и СКФО), число случаев за последние 10 лет колеблется между 78 и 311 в год, средний показатель за 10 лет составил 168,1 случаев (рис. 1), что составляет 0,8–4,63 % от общей заболеваемости ИКБ в Российской Федерации. По поводу укусов клещей в медицинские учреждения обращаются более 33 тыс. человек в год, наибольшее число обращений приходится на май–июнь – более 20 тыс., самые низкие показатели отмечаются в декабре–феврале – 38–77 обращений.

На юге России случаи ИКБ регистрируются с 1999 г. В настоящее время заболеваемость отмечается на территории Волгоградской (с 1999 г.), Ростовской (с 2012 г.) областей, Краснодарского и Ставропольского края (с 2000 г.), в республиках Крым (с 2000 г.), Адыгея (с 2011 г.) и Дагестан (с 2016 г.). В 2007 г. зарегистрирован единичный случай заболевания ИКБ в Республике Калмыкия, в 2014 г. – 4 случая в Чеченской Республике, в 2018 г. – 2 случая в Карачаево-Черкесской Республике, при этом в другие годы больные боррелиозом в республиках не регистрировались. По данным государственных докладов Роспотребнадзора, в период с 2009 по 2018 год в

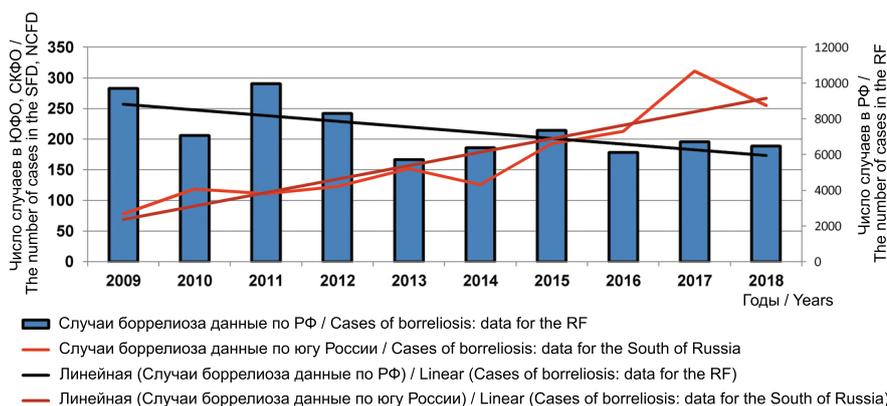


Рис. 1. Динамика уровня заболеваемости иксодовым клещевым боррелиозом на юге России в сравнении с данными по Российской Федерации

Fig. 1. Dynamics of the incidence rate of ixodic tick-borne borreliosis in the South of Russia in comparison with data for the Russian Federation

разных субъектах ЮФО и СКФО уровень заболеваемости колеблется от 1 до 149 случаев в год.

В структуре заболеваемости преобладают женщины (62,4–71,9 %), взрослые, дети до 14 лет составили от 9,3 до 15 % всех регистрируемых случаев. ИКБ преимущественно отмечается у городских жителей – в разные годы от 83,1 до 91,6 %, при этом с присасыванием клеща связывают 92,5–100 % случаев.

До 2018 г. наблюдалась тенденция к увеличению числа регистрируемых случаев ИКБ в Краснодарском крае, Республике Крым, Севастополе и Ростовской области, в прошлом году ситуация по заболеваемости в этих субъектах юга России стабилизировалась. В Ставропольском крае в 2018 г. отмечен небольшой рост заболеваемости ИКБ – на 3 случая в сравнении с данными 2017 г. (2018 г. – 35, 2017 г. – 32) (рис. 2). За последние 10 лет нет данных о заболеваниях ИКБ в республиках Ингушетия, Калмыкия и Северная Осетия-Алания, Кабардино-Балкарской Республике и Астраханской области. Единичные случаи ИКБ регистрируются в республиках Дагестан и Адыгея, Чеченской и Карачаево-Черкесской республиках, Волгоградской области. Таким образом, юг России является территорией с низким уровнем заболеваемости, но в большинстве субъектов региона отмечен тренд к усилению интенсивности эпидемического процесса, на фоне снижения заболеваемости на территории РФ (рис. 1).

Высокий уровень зараженности клещей боррелиями отмечен в Ставропольском крае, на долю которого приходится до 51 % всех положительных проб юга России [21]. Природные очаги ИКБ сформировались в лесостепной, предгорной, степной, полупустынной зонах края, наиболее неблагоприятная эпидемиологическая обстановка наблюдается в Кисловодске. Иксодофауна региона представлена шестью основными видами, у трех из которых (*Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus*, *D. reticulatus*) обнаружены рНК возбудителя ИКБ. Эпидемическое значение в крае имеют спирохеты видов *B. afzelii*, *B. garinii*, обнаружены *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* [22]. В 2011 г. сотрудниками ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора опубликованы данные

об обнаружении ДНК *B. miyamotoi* в пробах клещей *I. ricinus*, собранных на территории Ставропольского края. Участие возбудителя «нового» боррелиоза в эпидемическом процессе на юге России не подтверждено [23].

Мониторинг природных очагов боррелиоза на территории Крыма проводился в 1986–2009 гг. и возобновлен с 2014 г. В ходе эпизоотологического обследования рНК *Borrelia burgdorferi* s. l. обнаружена у клещей видов *I. ricinus*, *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *Haemaphysalis punctata*, *Rhipicephalus sanguineus* и *I. redikorzevi*. Наиболее значимым видом иксодид в эпидемическом процессе ИКБ в регионе является *I. ricinus*. В исследованных пробах обнаружены боррелии *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s. str. К зоне риска относятся центральные и южные районы Крыма, расположенные в горно-лесном, предгорном и лесостепном ландшафтах, в том числе города Феодосия и Ялта [24]. В 2017 г. впервые выявлены маркеры ИКБ у мелких млекопитающих (малой белозубки, лесной мыши и др.), отловленных в степной зоне республики, которая ранее не считалась эндемичной по боррелиозу [25].

В Ростовской области ИКБ является актуальной проблемой. Впервые возбудитель боррелиоза (*B. afzelii*) на территории Ростовской области обнаружен в 2007 г. в пробах клещей *I. ricinus*. Эпидемические проявления регистрируются с 2013 г. Мониторинг, проведенный в 2014–2017 гг., показал, что основным переносчиком и резервуаром *B. burgdorferi* s. l. в регионе являются иксодовые клещи *I. ricinus*. В эпизоотическом процессе ИКБ также принимают участие клещи *I. redikorzevi*, *I. kaiseri*, *Rhipicephalus rossicus*, *R. sanguineus*, *R. turanicus*, *D. marginatus*, *D. reticulatus*, *H. punctate* и *Hyalomma marginatum*. На территории области циркулируют боррелии видов *B. afzelii*, *B. burgdorferi* s. str., *B. lusitaniae*, *B. garinii* 20047 [26]. Обнаружение маркеров возбудителя ИКБ при исследовании слепней, комаров, мух-кровососок, птиц и рукокрылых свидетельствует об их участии в циркуляции *B. burgdorferi* s. l. в природных очагах клещевого боррелиоза Ростовской области [26].

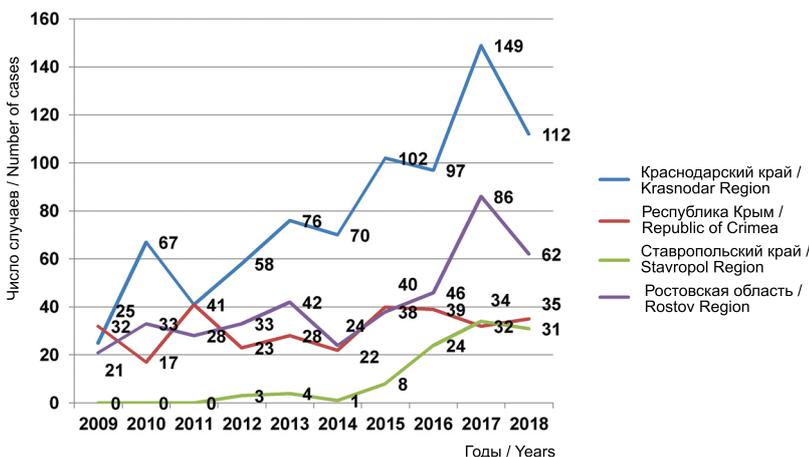


Рис. 2. Заболеваемость иксодовым клещевым боррелиозом в отдельных субъектах ЮФО и СКФО в 2009–2018 гг.

Fig. 2. The incidence of tick-borne tick-borne borreliosis in selected subjects of the Southern and North-Caucasian Federal Districts in 2009–2018

Эндемичными по Лайм-боррелиозу в Краснодарском крае и Республике Адыгея являются равнинно-степная, предгорно-горная, причерноморская, лиманно-плавневая зоны и расположенные в них города Сочи, Новороссийск, Краснодар, Армавир, Анапа, Геленджик, Славянск-на-Кубани, а также Брюховецкий, Гулькевичский, Каневский, Туапсинский, Горячключевский районы Краснодарского края и большинство районов Адыгеи. На территории циркулируют боррелии видов *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. lusitania*, *B. valasiana*, *B. burgdorferi* s. str. Фауна иксодовых клещей региона представлена 24 видами, основное участие в эпидемическом процессе ИКБ принимают клещи *I. ricinus* [27].

Отмечается активность природных очагов иксодового клещевого боррелиоза в Волгоградской области и Республике Дагестан [21].

Таким образом, очаги клещевого боррелиоза присутствуют на территориях большинства субъектов юга России, преимущественно расположенных в предгорных, лесостепных ландшафтах, что связано с местом обитания основного переносчика – клещей *I. ricinus*. В регионе циркулируют боррелии видов *B. garinii*, *B. afzelii*, *B. lusitania*, *B. valasiana*, *B. burgdorferi* s. str.

Эпизоотологическое обследование территорий субъектов юга России, проведенное в 2014–2018 гг., показало активность природных очагов ИКБ. Показатель инфицированности полевого материала возбудителями ИКБ колеблется в пределах от 14,1 до 25,6 %. В 2018 г. он составил 15,89 %. Эпизоотологическим обследованием охвачены все административные территории республик Крым и Адыгея, большинство районов Республики Калмыкия, в других субъектах ежегодно обследуется не более 50 % административных территорий. Объем проводимых исследований и перечень объектов в разных субъектах значительно отличается, что не позволяет делать выводы о распространении переносчика в регионе, границах очагов ИКБ и степени зараженности клещей.

Проведен картографический анализ данных, предоставленных Управлениями Роспотребнадзора, Центрами гигиены и эпидемиологии субъектов Северо-Кавказского и Южного федеральных округов, Ставропольским, Волгоградским и Ростовским-на-Дону научно-исследовательскими противочумными институтами, Астраханской, Дагестанской, Кабардино-Балкарской, Причерноморской, Северо-Кавказской и Элистинской противочумными станциями, а также ПЧС Республики Крым. В ходе анализа сопоставлены регистрируемые случаи заболевания ИКБ и инфицированность клещей боррелиями в 2017–2018 гг. для ЮФО и СКФО. Данные представлены на картах (рис. 3, 4).

В Южном федеральном округе (рис. 3) неблагоприятная эпидемическая обстановка сложилась в южных и юго-западных районах. В Республике Крым высокие показатели заболеваемости отмеча-

ют в Симферопольском районе, Ялте и Севастополе. Маркеры возбудителя ИКБ обнаруживают на всех административных территориях республики, за исключением Черноморского, Первомайского, Кировского.

В Республике Адыгея заболеваемость регистрируется в Майкопе, Майкопском, Тахтамукайском и Теучежском районах. Положительные пробы от клещей на ИКБ получены при эпизоотологическом обследовании всех районов за исключением Шовгеновского.

На территории Краснодарского края высокие показатели заболеваемости отмечаются в Краснодаре и Сочи. Маркеры возбудителя ИКБ обнаруживают на территории восьми районов и трех городов края. Несмотря на эпидемические проявления в некоторых районах и городах Краснодарского края (Мостовский, Апшеронский, Курганинский, Брюховецкий, Динской, Кореновский, Отрадненский, Новокубанский районы, города Горячий Ключ, Армавир, Анапа, Крымск, Геленджик) маркеры возбудителя ИКБ в полевом материале не обнаруживали, что требует корректировки эпизоотологического мониторинга данных территорий.

В Ростовской области большая часть регистрируемых случаев ИКБ приходится на Ростов-на-Дону. Очаги ИКБ сформировались в южных и восточных районах области. В двух эпизоотически не активных районах области регистрировалась заболеваемость ИКБ (Белокалитвинский и Багаевский районы).

В Волгоградской области регистрируются единичные случаи заболевания. Маркеры возбудителя ИКБ обнаруживали в Урюпинском районе. Регистрация заболеваний в Дубовском, Камышинском, Николаевском, Новониколаевском, Новонинском районах и городе Волгоград требует корректировки эпизоотологического мониторинга на территории Волгоградской области.

Данные о случаях заболевания и результатах эпизоотологического обследования в Астраханской области и Республике Калмыкия отсутствуют.

В Северо-Кавказском федеральном округе (рис. 4) заболеваемость в 2017–2018 гг. регистрируется в Ставропольском крае, Карачаево-Черкесской Республике, Республике Дагестан. По полученным данным, в Ставропольском крае наиболее неблагоприятная эпидемическая обстановка наблюдается в городах Кисловодск и Ставрополь. Маркеры возбудителя ИКБ обнаруживают преимущественно в пробах клещей, собранных в районах и городах, расположенных в предгорной и лесостепной ландшафтных зонах края. В Георгиевском районе, несмотря на высокое число обращений с укусами клещей и имеющиеся данные о зараженности клещей боррелиями, случаи заболевания ИКБ за последние два года не регистрировались. В ходе анализа отмечена заболеваемость в Андроповском, Апанасенковском, Новоселицком, Петровском и Шпаковском районах Ставропольского края, где отсутствуют данные об инфицированности клещей боррелиями, данное об-

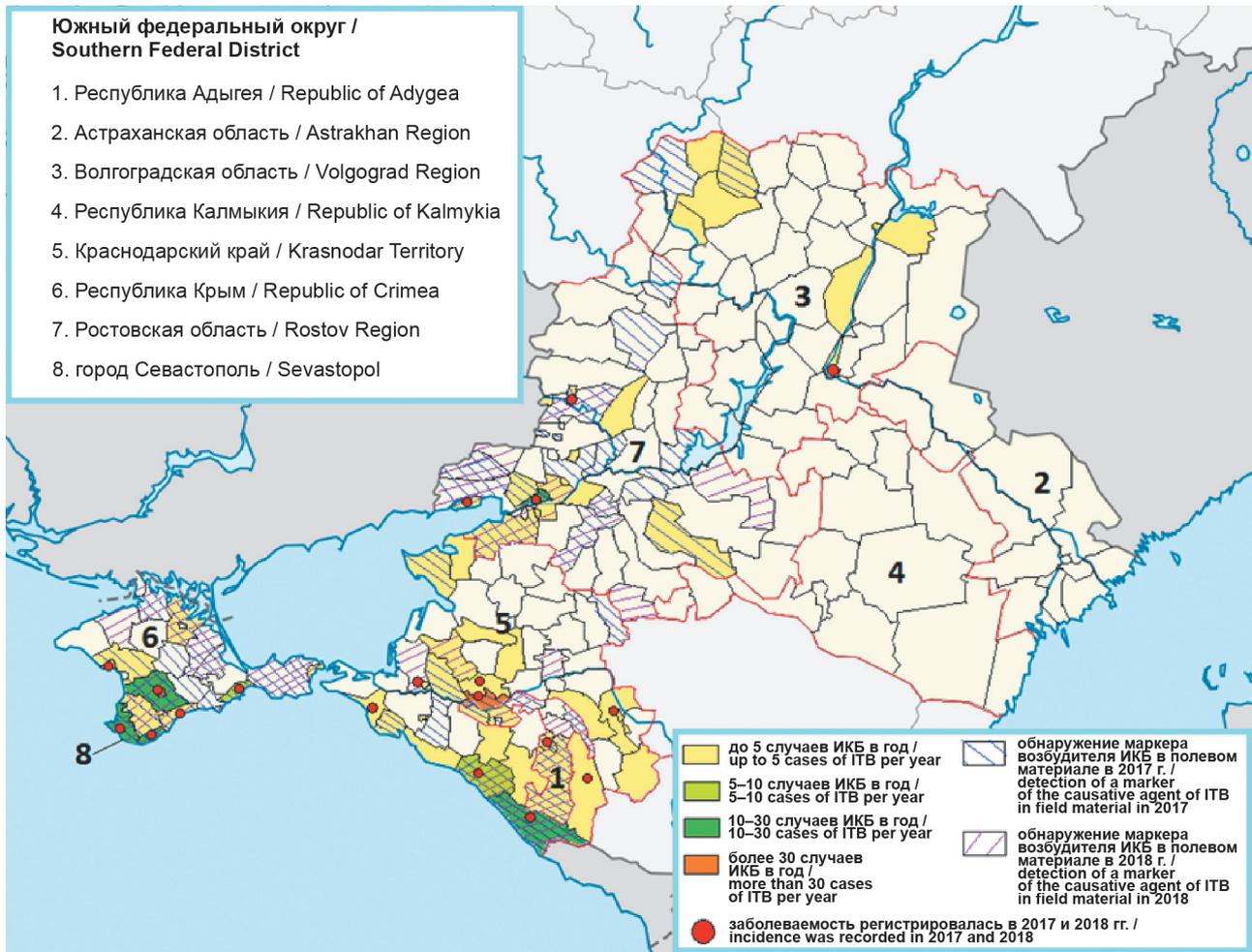


Рис. 3. Эпидемиолого-эпизоотологическая ситуация по иксодовому клещевому боррелиозу в ЮФО в 2017–2018 гг.

Fig. 3. The epidemiological and epizootiological situation on ixodic tick-borne borreliosis in the Southern Federal District in 2017–2018

стоятельство требует усиления эпизоотологического мониторинга в этих районах.

На территории Карачаево-Черкесской Республики ИКБ регистрируется в Усть-Джегутинском и Урупском районах, что дает основание для проведения в этих районах эпизоотологического мониторинга.

В Республике Дагестан регистрируются единичные случаи заболевания. Положительные пробы на ИКБ получены в Дахадаевском, Карабудахкентском и Табасаранском районах. Регистрация заболеваний в Тарумовском и Дербентском районах, где отсутствуют данные о зараженности клещей боррелиями, требует проведения эпизоотологического мониторинга в этих районах.

На территории республик Ингушетия и Северная Осетия-Алания, а также Чеченской и Кабардино-Балкарской республик заболеваемость ИКБ в 2017–2018 гг. не регистрируется. Эпизоотическая активность очагов ИКБ отмечается в Моздокском районе Республики Северная Осетия-Алания, Урванском районе и Нальчике (Кабардино-Балкарская Республика).

Таким образом, эпидемиолого-эпизоотологическая ситуация по ИКБ на юге европейской части России имеет следующие особенности. На

фоне снижения уровня заболеваемости в РФ отмечен тренд к усилению интенсивности эпидемического процесса в отдельных субъектах ЮФО и СКФО: Краснодарском крае, Республике Крым и Севастополе, Ставропольском крае, Ростовской области. В последнее десятилетие отмечается расширение перечня эндемичных по ИКБ субъектов региона за счет его регистрации в Волгоградской области (с 2007 г.), Республике Адыгея (с 2011 г.), Ростовской области (с 2012 г.), Республике Дагестан (с 2016 г.) и единичных случаев в Чеченской (2014 г.) и Карачаево-Черкесской (2018 г.) республиках. Отмечено расширение границ природных очагов ИКБ в большинстве субъектов региона, в том числе на территориях рекреационных зон, включение в эпизоотический процесс новых районов Ростовской области и Республики Крым, ранее не эндемичных по ИКБ, расположенных в степной и равнинно-степной ландшафтных зонах. Исследование, проведенное в Ростовской области, указывает на участие в циркуляции ИКБ в природных очагах области не свойственных переносчиков и носителей (слепни, мухи-кровососки, рукокрылые, птицы). Анализ эпизоотологического обследования территорий свиде-



Рис. 4. Эпидемиолого-эпизоотологическая ситуация по иксодовому клещевому боррелиозу в СКФО в 2017–2018 гг.

Fig. 4. The epidemiological and epizootiological situation on ixodic tick-borne borreliosis in the North Caucasian Federal District in 2017–2018

тельствует о различной интенсивности мониторинга в разных субъектах, значительных отличиях в объемах проводимых исследований и перечнях объектов. Данные обстоятельства требуют дальнейшего проведения обследования территорий ЮФО и СКФО, корректировки проводимого эпизоотологического мониторинга, создания единого алгоритма обследования территорий, использования современных геоинформационных и статистических инструментов для мониторинга ситуации и прогнозирования заболеваемости ИКБ.

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

**Список литературы**

1. Cosson J.F. Ecology of Lyme disease. *Santé Publique*. 2019; S1(HS):73–87. DOI: 10.3917/spub.190.0073.  
 2. Sykes R.A., Makiello P. An estimate of Lyme borreliosis incidence in Western Europe. *J. Public Health (Oxf)*. 2017 39(1):74–81. DOI: 10.1093/pubmed/fdw017.  
 3. Государственный доклад Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2017 году». [Электронный ресурс]. URL: [https://www.rosпотреbnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT\\_ID=10145](https://www.rosпотреbnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=10145) (дата обращения 24.06.2019).

4. Nguyen A., Mahaffy J., Vaidya N.K. Modeling transmission dynamics of lyme disease: multiple vectors, seasonality, and vector mobility. *Infect. Dis. Model.* 2019; 4: 28–43. DOI: 10.1016/j.idm.2019.03.001.  
 5. DeLong A., Hsu M., Kotsoris H. Estimation of cumulative number of post-treatment Lyme disease cases in the US, 2016 and 2020. *BMC Public Health*. 2019; 19(1):352. DOI: 10.1186/s12889-019-6681-9.  
 6. Kuehn B.M. CDC estimates 300,000 US cases of Lyme disease annually. *JAMA*. 2013; 310(11):1110. DOI: 10.1001/jama.2013.278331.  
 7. Adeolu M., Gupta R.S. A phylogenomic and molecular marker based proposal for the division of the genus *Borrelia* into two genera: the emended genus *Borrelia* containing only the members of the relapsing fever *Borrelia*, and the genus *Borreliella* gen. nov. containing the members of the Lyme disease *Borrelia* (*Borrelia burgdorferi sensu lato* complex) *Antonie van Leeuwenhoek*. 2014; 105(6):1049–72. DOI: 10.1007/s10482-014-0164-x.  
 8. Barbour A.G. *Borreliaceae*. In: Whitman W.B., Rainey F., Kämpfer P., Trujillo M., Chun J., DeVos P., Hedlund B., Dedysh S. editors. *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 2018. DOI: 10.1002/9781118960608.fbm00308.  
 9. Stevenson B., Fingerle V., Wormser G.P., Margos G. Public health and patient safety concerns merit retention of Lyme borreliosis-associated spirochetes within the genus *Borrelia*, and rejection of the genus novum *Borreliella*. *Ticks Tick-borne Dis.* 2019; 10(1):1–4. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2018.08.010.  
 10. Нефедова В.В., Коренберг Э.И., Горелова Н.Б. Мультилокусный сиквенс анализ «нетипичных» *Borrelia burgdorferi sensu lato*, изолированных в России. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2017; 4:145–50. DOI: 10.18821/0208-0613-2017-35-4-145-150.  
 11. Pritt B.S., Respicio-Kingry L.B., Sloan L.M., Schriefer M.E., Replogle A.J., Bjork J., Liu G., Kingry L.C., Mead P.S., Neitzel D.F., Schiffman E., Hoang Johnson D.K., Davis J.P., Paskewitz S.M.,

- Boxrud D., Deedon A., Lee X., Miller T.K., Feist M.E., Steward C.R., Theel E.S., Patel R., Irish C.L., Petersen J.M. *Borrelia mayonii* sp. nov., a member of the *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex, detected in patients and ticks in the upper Midwestern United States. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016; 66(11):4878–80. DOI: 10.1099/ijsem.0.001445.
12. Nunes M., Parreira R., Maia C., Lopes N., Fingerle V., Vieira M.L. Molecular identification of *Borrelia* genus in questing hard ticks from Portugal: Phylogenetic characterization of two novel Relapsing Fever-like *Borrelia* sp. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 40:266–74. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.03.008.
13. Margos G., Sing A., Fingerle V. Published data do not support the notion that *Borrelia valaisiana* is human pathogenic. *Infection.* 2017; 45(4):567–9. DOI: 10.1007/s15010-017-1032-1.
14. Golovchenko M., Vancová M., Clark K., Oliver Jr J.H., Grubhoffer L., Rudenko N. A divergent spirochete strain isolated from a resident of the southeastern United States was identified by multilocus sequence typing as *Borrelia bissettii*. *Parasit. Vectors.* 2016; 9:68. DOI: 10.1186/s13071-016-1353-4.
15. Платонов А.Е., Малеев В.В., Карань Л.С. Боррелиозные возвратные лихорадки: забытые и новые. *Терапевтический архив.* 2010; 11:74–80.
16. Cutler S., Vayssier-Taussat M., Estrada-Peña A., Potkonjak A., Mihalca A.D., Zeller H. A new *Borrelia* on the block: *Borrelia miyamotoi* – a human health risk? *Euro Surveill.* 2019; 24(18):pii=1800170. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.18.1800170.
17. Манзенюк И.Н., Манзенюк О.Ю. Клещевые боррелиозы (болезнь Лайма). Кольцово; 2005. 85 с.
18. Pukhovskaya N.M., Morozova O.V., Vysochina N.P., Belozeroва N.B., Ivanov L.I. Prevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Borrelia miyamotoi* in ixodid ticks in the Far East of Russia. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 2019; 8:192–202. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2019.01.005.
19. Korenberg E.I., Nefedova V.V., Romanenko V.N., Gorelova N.B. The tick *Ixodes pavlovskyi* as a host of spirochetes pathogenic for humans and its possible role in the epizootiology and epidemiology of Borrelioses. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010; 10(5):453–8. DOI: 10.1089/vbz.2009.0033.
20. Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях за январь–декабрь 2018 г. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. [Электронный ресурс]. URL: [https://www.rosпотребнадзор.ru/activities/statistical-materials/statistic\\_details.php?ELEMENT\\_ID=11277](https://www.rosпотребнадзор.ru/activities/statistical-materials/statistic_details.php?ELEMENT_ID=11277) (дата обращения 24.06.2019).
21. Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Манин Е.А., Прислегина Д.А., Шапошникова Л.И., Волынкина А.С., Лисицкая Я.В., Зайкина И.Н., Куличенко А.Н. Клещевые природно-очаговые инфекции на юге России в 2016 г. В кн.: Попова А.Ю., редактор. Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения : материалы XI съезда Всерос. науч.-практ. о-ва эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. Москва, 16–17 ноября 2017 г. СПб.: ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера; 2017. С. 193–4. [Электронный ресурс]. URL: [http://www.pasteurorg.ru/files/materials/Materiali\\_XIsiezda\\_VNPOEMP.pdf](http://www.pasteurorg.ru/files/materials/Materiali_XIsiezda_VNPOEMP.pdf) (дата обращения 24.06.2019).
22. 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. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2008; 2:20–2. DOI: 10.21055/0370-1069-2008-2(96)-20-22.
23. Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M., Makhneva N.A., Toporkova M.G., Maleev V.V., Fism D., Krause P.J. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17:1816–22. DOI: 10.3201/eid1710.101474.
24. Горovenko M.B., Karimov I.Z. Актуальные трансмиссивные природно-очаговые инфекции Крыма. *Инфекция и иммунитет.* 2016; 6(1):25–32. DOI: 10.15789/2220-7619-2016-1-25-32.
25. Коваленко И.С., Зинич Л.С., Якунин С.Н., Полуэктова О.А., Раменская О.Ю., Афонина А.Н., Тихонов С.Н. Результаты эпизоотологического мониторинга мелких млекопитающих в Крыму за период 2015–2017 гг. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2018; 2:57–61. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-2-57-61.
26. Ковалев Е.В., Ерганова Е.Г., Ненадская С.А., Леоненко Н.В., Гончарова О.В., Новикова А.И. Эпидемиологический мониторинг и профилактика клещевых инфекций в условиях сочетанных природных и антропогенных очагов в Ростовской области. В кн.: Попова А.Ю., редактор. Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения : материалы XI съезда Всерос. науч.-практ. о-ва эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. Москва, 16–17 ноября 2017 г. СПб.: ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера; 2017. С. 209–210. [Электронный ресурс]. URL: [http://www.pasteurorg.ru/files/materials/Materiali\\_XIsiezda\\_VNPOEMP.pdf](http://www.pasteurorg.ru/files/materials/Materiali_XIsiezda_VNPOEMP.pdf) (дата обращения 24.06.2019).
27. Авдеева М.Г., Мошкова Д.Ю., Блажняя Л.П., Горodin В.Н., Зотов С.В., Ванюков А.А., Ковалевская О.И. Клинико-эпидемиологическая характеристика клещевого боррелиоза в Краснодарском крае. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2014; 1:4–11.

## References

1. Cosson J.F. Ecology of Lyme disease. *Santé Publique.* 2019; S1(HS):73–87. DOI: 10.3917/spub.190.0073.
2. Sykes R.A., Makiello P. An estimate of Lyme borreliosis incidence in Western Europe. *J. Public Health (Oxf).* 2017 39(1):74–81. DOI: 10.1093/pubmed/fdw017.
3. State report of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-Being “On the State of Sanitary and Epidemiological Well-Being of the Population in the Russian Federation in 2017”. (Cited 24 June 2019). [Internet]. Available from: [https://www.rosпотребнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT\\_ID=10145](https://www.rosпотребнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=10145).
4. Nguyen A., Mahaffy J., Vaidya N.K. Modeling transmission dynamics of Lyme disease: multiple vectors, seasonality, and vector mobility. *Infect. Dis. Model.* 2019; 4: 28–43. DOI: 10.1016/j.idm.2019.03.001.
5. DeLong A., Hsu M., Kotsoris H. Estimation of cumulative number of post-treatment Lyme disease cases in the US, 2016 and 2020. *BMC Public Health.* 2019; 19(1):352. DOI: 10.1186/s12889-019-6681-9.
6. Kuehn B.M. CDC estimates 300,000 US cases of Lyme disease annually. *JAMA.* 2013; 310(11):1110. DOI: 10.1001/jama.2013.278331.
7. Adeolu M., Gupta R.S. A phylogenomic and molecular marker based proposal for the division of the genus *Borrelia* into two genera: the emended genus *Borrelia* containing only the members of the relapsing fever *Borrelia*, and the genus *Borrelia* gen. nov. containing the members of the Lyme disease *Borrelia* (*Borrelia burgdorferi sensu lato* complex) *Antonie van Leeuwenhoek.* 2014; 105(6):1049–72. DOI: 10.1007/s10482-014-0164-x.
8. Barbour A.G. *Borreliaceae*. In: Whitman W.B., Rainey F., Kämpfer P., Trujillo M., Chun J., DeVos P., Hedlund B., Dedysh S. editors. *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria.* 2018. DOI: 10.1002/9781118960608.fbm00308.
9. Stevenson B., Fingerle V., Wormser G.P., Margos G. Public health and patient safety concerns merit retention of Lyme borreliosis-associated spirochetes within the genus *Borrelia*, and rejection of the genus novum *Borrelia*. *Ticks Tick-borne Dis.* 2019; 10(1):1–4. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2018.08.010.
10. Nefedova V.V., Korenberg E.I., Gorelova N.B. Multilocus sequence analysis of “atypical” *Borrelia burgdorferi sensu lato* isolated in Russia. *Molecular genetics, microbiology and virology.* 2017; 4:145–50. DOI: 10.18821/0208-0613-2017-35-4-145-150.
11. Pritt B.S., Respicio-Kingry L.B., Sloan L.M., Schriefer M.E., Replogle A.J., Bjork J., Liu G., Kingry L.C., Mead P.S., Neitzel D.F., Schiffman E., Hoang Johnson D.K., Davis J.P., Paskewitz S.M., Boxrud D., Deedon A., Lee X., Miller T.K., Feist M.E., Steward C.R., Theel E.S., Patel R., Irish C.L., Petersen J.M. *Borrelia mayonii* sp. nov., a member of the *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex, detected in patients and ticks in the upper Midwestern United States. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016; 66(11):4878–80. DOI: 10.1099/ijsem.0.001445.
12. Nunes M., Parreira R., Maia C., Lopes N., Fingerle V., Vieira M.L. Molecular identification of *Borrelia* genus in questing hard ticks from Portugal: Phylogenetic characterization of two novel Relapsing Fever-like *Borrelia* sp. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 40:266–74. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.03.008.
13. Margos G., Sing A., Fingerle V. Published data do not support the notion that *Borrelia valaisiana* is human pathogenic. *Infection.* 2017; 45(4):567–9. DOI: 10.1007/s15010-017-1032-1.
14. Golovchenko M., Vancová M., Clark K., Oliver Jr J.H., Grubhoffer L., Rudenko N. A divergent spirochete strain isolated from a resident of the southeastern United States was identified by multilocus sequence typing as *Borrelia bissettii*. *Parasit. Vectors.* 2016; 9:68. DOI: 10.1186/s13071-016-1353-4.
15. Platonov A.E., Maleev V.V., Karan L.S. Borreliosis relapsing fevers: forgotten and new. *Therapeutic Archive [Terapevtichesky Arkhiv].* 2010; 11:74–80.
16. Cutler S., Vayssier-Taussat M., Estrada-Peña A., Potkonjak A., Mihalca A.D., Zeller H. A new *Borrelia* on the block: *Borrelia miyamotoi* – a human health risk? *Euro Surveill.* 2019; 24(18):pii=1800170. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.18.1800170.
17. Manzenyuk I.N., Manzenyuk O.Yu. Tick-borne borreliosis (Lyme disease). Koltsovo; 2005. 85 с.
18. Pukhovskaya N.M., Morozova O.V., Vysochina N.P., Belozeroва N.B., Ivanov L.I. Prevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Borrelia miyamotoi* in ixodid ticks in the Far East of Russia. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 2019; 8:192–202. DOI: 10.1016/j.ijppaw.2019.01.005.
19. Korenberg E.I., Nefedova V.V., Romanenko V.N., Gorelova N.B. The tick *Ixodes pavlovskyi* as a host of spirochetes pathogenic for humans and its possible role in the epizootiology and epidemiology of Borrelioses. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010; 10(5):453–8.

DOI: 10.1089/vbz.2009.0033.

20. Information on infectious and parasitic diseases for January–December 2018, the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-Being. (Cited 24 June 2019). [Internet]. Available from: [https://www.rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/statistic\\_details.php?ELEMENT\\_ID=11277](https://www.rospotrebnadzor.ru/activities/statistical-materials/statistic_details.php?ELEMENT_ID=11277).

21. Vasilenko N.F., Maletskaya O.V., Manin E.A., Prislegina D.A., Shaposhnikova L.I., Volynkina A.S., Lisitskaya Y.V., Zaikina I.N., Kulichenko A.N. Tick-borne natural focal infections in Southern Russia in 2016. In the book: A. Popova, editor. Ensuring the epidemiological well-being: challenges and solutions: Materials of the XI All-Russian Congress of Scientific-Practical Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists. Moscow, November 16–17, 2017. St. Petersburg: Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; 2017. C. 193–4. (Cited 24 June 2019). [Internet]. Available from: [http://www.pasteurorg.ru/files/materials/Materiali\\_XIsiezda\\_VNPOEMP.pdf](http://www.pasteurorg.ru/files/materials/Materiali_XIsiezda_VNPOEMP.pdf).

22. Orlova T.N., Vasilenko N.F., Afanasyev E.N., Chumakova I.V., Sannikova I.V., Kulichenko A.N. The study of the circulation of the causative agent of Lyme borreliosis in the Stavropol Territory. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2008; 2:20–2. DOI: 10.21055/0370-1069-2008-2(96)-20-22.

23. Platonov A.E., Karan L.S., Kolyasnikova N.M., Makhneva N.A., Toporkova M.G., Maleev V.V., Fism D., Krause P.J. Humans infected with relapsing fever spirochete *Borrelia miyamotoi*, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17:1816–22. DOI: 10.3201/eid1710.101474.

24. Gorovenko M.V., Karimov I.Z. Actual transmissible natural focal infections of the Crimea. *Infektsiya i immunitet [Russian Journal of Infection and Immunity]*. 2016; 6(1):25–32. DOI: 10.15789/2220-7619-2016-1-25-32.

25. Kovalenko I.S., Zinich L.S., Yakunin S.N., Poluektova O.A., Ramenskaya O.Yu., Afonina A.N., Tikhonov S.N. The results of epizootological monitoring of small mammals in Crimea for the period 2015–2017. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; 2:57–61. DOI:

10.21055/0370-1069-2018-2-57-61.

26. Kovalev E.V., Erganova E.G., Nenadskaya S.A., Leonenko N.V., Goncharova O.V., Novikov A.I. Epidemiological monitoring and prevention of tick-borne infections in conditions of combined natural and anthropogenic foci in the Rostov Region. In the book: A. Popova, editor. Ensuring the epidemiological well-being: challenges and solutions: Materials of the XI All-Russian Congress of Scientific-Practical Society of Epidemiologists, Microbiologists and Parasitologists. Moscow, November 16–17, 2017. St. Petersburg: Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology; 2017. C. 209–10. (Cited 24 June 2019). [Internet]. Available from: [http://www.pasteurorg.ru/files/materials/Materiali\\_XIsiezda\\_VNPOEMP.pdf](http://www.pasteurorg.ru/files/materials/Materiali_XIsiezda_VNPOEMP.pdf).

27. Avdeeva M.G., Moshkova D.Yu., Blazhnaya L.P., Gorodin V.N., Zotov S.V., Vanyukov A.A., Kovalevskaya O.I. Clinical and epidemiological characteristics of tick-borne borreliosis in the Krasnodar Territory. *Epidemiologiya i infektionnye bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2014; 1:4–11.

#### Authors:

Zaitseva O.A., Kotenev E.S., Artyushina Yu.S., Kot L.A., Shaposhnikova L.I., Chishenyuk T.I., Gnusareva O.A., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

#### Об авторах:

Зайцева О.А., Котенев Е.С., Артюшина Ю.С., Кот Л.А., Шапошникова Л.И., Чишениук Т.И., Гнусарева О.А., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Поступила 09.07.19.

Отправлена на доработку 21.08.19.

Принята к публ. 28.08.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-66-74

УДК 616.921.5:614.4

Д.К. Львов<sup>1</sup>, Е.И. Бурцева<sup>1</sup>, Е.А. Мукашева<sup>1</sup>, Л.В. Колобухина<sup>1</sup>, В.С. Богданова<sup>1</sup>, Н.В. Бовин<sup>2</sup>,  
 Е.Л. Феодоритова<sup>1</sup>, С.В. Трушакова<sup>1</sup>, Н.В. Бреслав<sup>1</sup>, И.М. Кириллов<sup>1</sup>, Л.Н. Меркулова<sup>1</sup>,  
 И.Т. Федякина<sup>1</sup>, К.Г. Краснослободцев<sup>1</sup>, О.Л. Воронина<sup>1</sup>, Е.И. Аксенова<sup>1</sup>, М.С. Кунда<sup>1</sup>, Н.Н. Рыжова<sup>1</sup>,  
 С.В. Альховский<sup>1</sup>, Р.В. Вартамян<sup>3</sup>, Л.Б. Кистенева<sup>1</sup>, А.Г. Росаткевич<sup>1</sup>, И.С. Кружкова<sup>3</sup>, М.В. Базарова<sup>3</sup>,  
 С.В. Сметанина<sup>3</sup>

## ОСОБЕННОСТИ ЦИРКУЛЯЦИИ И СВОЙСТВ ВИРУСОВ ГРИППА В ЭПИДЕМИЧЕСКОМ СЕЗОНЕ 2018–2019 гг. В РОССИИ И СТРАНАХ СЕВЕРНОГО ПОЛУШАРИЯ

<sup>1</sup>Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Российская Федерация;

<sup>2</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Российская Федерация;

<sup>3</sup>Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения, Москва, Российская Федерация

С целью выявления дрейфовой изменчивости вирусов гриппа в период эпидемического подъема заболеваемости ОРВИ в период 2018–2019 гг. проведено изучение биологических и молекулярно-генетических свойств эпидемических штаммов, выделенных на отдельных территориях Российской Федерации, и сравнение их с данными стран Северного полушария. **Материалы и методы.** Применен спектр методов лабораторной диагностики, среди которых МФА, ОТ-ПЦР, изоляция, секвенирование, методы определения чувствительности к противовирусным препаратам и рецепторной специфичности. **Результаты и обсуждение.** Долевое участие вирусов гриппа составило: А(Н1N1)pdm09 – 53 %, А(Н3N2) – 46 %, В – около 1 %. Случаи тяжелой острой респираторной инфекции наиболее часто были связаны с вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09. По антигенным свойствам изолированные штаммы соответствовали свойствам вакцинных вирусов (А/Мичиган/45/2015 на 99,6 % и А/Сингапур/INFIMH-16-0019/2016 на 86 %). Выявлена гетерогенность популяции штаммов вирусов гриппа А по отдельным мутациям в гемагглютинине. Популяция вируса гриппа В равнозначно представлена обеими эволюционными линиями (В/Виктория- и В/Ямагата-подобными). Рецепторная специфичность была благоприятной для течения и исходов заболевания. Среди 70 изученных эпидемических штаммов не выявлено резистентных штаммов к антинейраминидазным препаратам – озельтамивиру и занамивиру. В статье приведены рекомендации ВОЗ по составу гриппозных вакцин для стран Северного полушария на 2019–2020 гг., представлены данные по случаям инфицирования людей вирусами гриппа птиц А(Н5N1), А(Н5N6), А(Н7N9) и А(Н9N2).

**Ключевые слова:** семейство *Orthomyxoviridae*, биобезопасность, эпидсезон 2018–2019 гг., заболеваемость, антигенные свойства, генетические особенности, рецепторная специфичность, чувствительность к ингибиторам нейраминидазы.

Корреспондирующий автор: Львов Дмитрий Константинович, e-mail: dk\_lvov@mail.ru.

Для цитирования: Львов Д.К., Бурцева Е.И., Мукашева Е.А., Колобухина Л.В., Богданова В.С., Бовин Н.В., Феодоритова Е.Л., Трушакова С.В., Бреслав Н.В., Кириллов И.М., Меркулова Л.Н., Федякина И.Т., Краснослободцев К.Г., Воронина О.Л., Аксенова Е.И., Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Альховский С.В., Вартамян Р.В., Кистенева Л.Б., Росаткевич А.Г., Кружкова И.С., Базарова М.В., Сметанина С.В. Особенности циркуляции и свойств вирусов гриппа в эпидемическом сезоне 2018–2019 гг. в России и странах Северного полушария. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 3:66–74. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-66-74

D.K. Lvov<sup>1</sup>, E.I. Burtseva<sup>1</sup>, E.A. Mukasheva<sup>1</sup>, L.V. Kolobukhina<sup>1</sup>, V.S. Bogdanova<sup>1</sup>, N.V. Bovin<sup>2</sup>,  
 E.L. Feodoritova<sup>1</sup>, S.V. Trushakova<sup>1</sup>, N.V. Breslav<sup>1</sup>, I.M. Kirillov<sup>1</sup>, L.N. Merkulova<sup>1</sup>, I.T. Fedyakina<sup>1</sup>,  
 K.G. Krasnoslobodtsev<sup>1</sup>, O.L. Voronina, E.I. Aksenova<sup>1</sup>, M.S. Kunda<sup>1</sup>, N.N. Ryzhova<sup>1</sup>,  
 S.V. Alkhovsky<sup>1</sup>, R.V. Vartanyan<sup>3</sup>, L.B. Kisteneva<sup>1</sup>, A.G. Rosatkevich<sup>1</sup>, I.S. Kruzhkova<sup>3</sup>,  
 M.V. Bazarova<sup>3</sup>, S.V. Smetanina<sup>3</sup>

## Peculiarities of the influenza viruses circulation and their properties during 2018–2019 epidemic season in Russia and countries of the Northern Hemisphere

<sup>1</sup>D.I. Ivanovsky Institute of Virology, FSBI “National Research Center of Microbiology and Epidemiology Named after Honorary Academician N.F. Gamaleya”, Moscow, Russian Federation; <sup>2</sup>M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation; <sup>3</sup>Clinical Hospital for Infectious Diseases № 1, Moscow, Russian Federation

**Abstract. Objective.** To identify the drift variability of influenza viruses during the period of epidemic rise in the incidence of acute respiratory viral infections in the period 2018–2019. The biological and molecular-genetic properties of epidemic strains isolated in certain territories of the Russian Federation were studied and compared with data from the countries of the Northern Hemisphere. **Materials and methods.** A range of laboratory diagnostic methods has been applied, including immune fluorescence, RT-PCR, sequencing, methods for determining sensitivity to influenza drugs and receptor specificity. **Results and discussion.** The proportion of influenza viruses was as follows: A (H1N1) pdm09 – 53 %, A (H3N2) – 46 %, B – about 1 %. Cases of severe acute respiratory infections have most often been associated with influenza A(H1N1) pdm09 virus. According to antigenic properties, isolated strains corresponded to the properties of vaccine viruses (A/Michigan/45/2015 – by 99.6 % and A/Singapore INFIMH-16-0019/2016 – by 86 %). The heterogeneity of influenza A virus strains population was revealed as regards individual mutations in hemagglutinin. The influenza B virus population was equally represented by both evolutionary lines (B/Victoria and B/Yamagata-like). Receptor specificity was favorable for the course and outcome of the disease. Among 70 studied epidemic strains, no strains resistant to

anti-neuraminidase drugs, oseltamivir and zanamivir, were detected. The article presents WHO recommendations on the composition of influenza vaccines for the countries of the Northern Hemisphere for 2019–2020, provides data on cases of human infection with avian influenza viruses A(H5N1), A(H5N6), A(H7N9) and A(H9N2).

**Key words:** family Orthomyxoviridae, epidemic season 2018–2019, biosafety, morbidity, antigenic properties, genetic peculiarities, receptor affinity, sensitivity to neuraminidase inhibitors.

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

**Funding:** The research was supported by the grant from the Cooperative Agreement with Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA – “Maintaining the capacity for influenza surveillance in Russia” and the French Foundation for Influenza Epidemiology as part of the implementation of the Agreement on Influenza Monitoring in Hospitalized Patients.

**Corresponding author:** Dmitry K. Lvov, e-mail: dk\_lvov@mail.ru.

**Citation:** Lvov D.K., Burtseva E.I., Mukasheva E.A., Kolobukhina L.V., Bogdanova V.S., Bovin N.V., Feodoritova E.L., Trushakova S.V., Breslav N.V., Kirillov I.M., Merkulova L.N., Fedyakina I.T., Krasnoslobodtsev K.G., Voronina O.L., Aksenova E.I., Kunda M.S., Ryzhova N.N., Alkhovsky S.V., Vartanyan R.V., Kisteneva L.B., Rosatkevich A.G., Kruzhkova I.S., Bazarova M.V., Smetanina S.V. Peculiarities of the influenza viruses circulation and their properties during 2018–2019 epidemic season in Russia and countries of the Northern Hemisphere. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 3:66–74. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-66-74

Received 12.08.19. Revised 22.08.19. Accepted 26.09.19.

Среди вирусов, представляющих серьезную потенциальную угрозу национальной и глобальной биологической безопасности, особое место занимают представители семейства *Orthomyxoviridae* (рис. 1) [1, 2]. Вирусы рода *Quaranjavirus* передаются зараженными аргасовыми (*Argasidae*) клещами (Африка, Средний Восток, Океания, Россия, Кыргызстан); рода *Togotovirus* – передаются человеку и животным зараженными преимущественно иксодовыми (*Ixodidae*) клещами (Африка, южная Европа, Закавказье, Россия). Род *Gammainfluenzavirus* (вирус гриппа С) вызывает локальные вспышки и спорадическую заболеваемость людей и свиней с респираторной передачей; род *Betainfluenzavirus* (вирус гриппа В) связан с ежегодной сезонной заболеваемостью людей повсеместно в мире с респираторной передачей; род *Alphainfluenzavirus* (вирус гриппа А) включает вирусы 18 подтипов по гемагглютинину (HA1-18) и 11 подтипов по нейраминидазе (NA1-11), вызывающие повсеместно в мире обширные сезонные эпизоотии/панзоотии и эпидемии/пандемии при респираторном (у людей) заражении, а также через воду и корм (у животных). Природным резервуаром большинства вирусов являются птицы, преимущественно водного и околородного комплексов; вирусы, циркулирующие среди людей, домашних и диких животных, способны к обмену генетическим материалом в процессе реассортации сегментированных геномов, широко распространены в биосфере. Род *Deltainfluenzavirus*

(вирус гриппа D) инфицирует крупный рогатый скот; род *Isavirus* – представители поражают рыб в аквакультурах и в природных условиях.

В период сезонной активности вирусов гриппа регистрируют от 3 до 5 млн случаев тяжелого течения гриппозной инфекции и от 290 тыс. до 650 тыс. случаев с летальными исходами [3]. Особую тревогу вызвало появление в марте 2009 г. нового пандемического вируса гриппа А(H1N1)pdm09, обладавшего более высокой вирулентностью в сравнении с другими сезонными вирусами гриппа за счет смешанного типа рецепторной специфичности (РС) α2-6/α2-3 [4–6]. Клеточный рецептор вирусов гриппа А представлен двумя основными типами ковалентной связи терминального остатка нейраминовой кислоты со следующим моносахаридом в составе сиалогликанов: α2-6 для РС сайта гемагглютинина (HA) эпидемических штаммов и α2-3 для РС сайтов HA штаммов изолированных от птиц. Наблюдения за эволюцией циркулирующих высокопатогенных генетических вариантов вирусов птиц А(H5N1) свидетельствуют о тенденции к изменению РС в направлении эпителиальных клеток человека путем повышенного родства к рецепторам α2-6 типа [7, 8]. Эти факты указывают на реальную возможность появления в обозримом будущем высокопатогенного вируса гриппа птиц А(H5N1), обладающего способностью к эпидемическому (пандемическому) распространению.

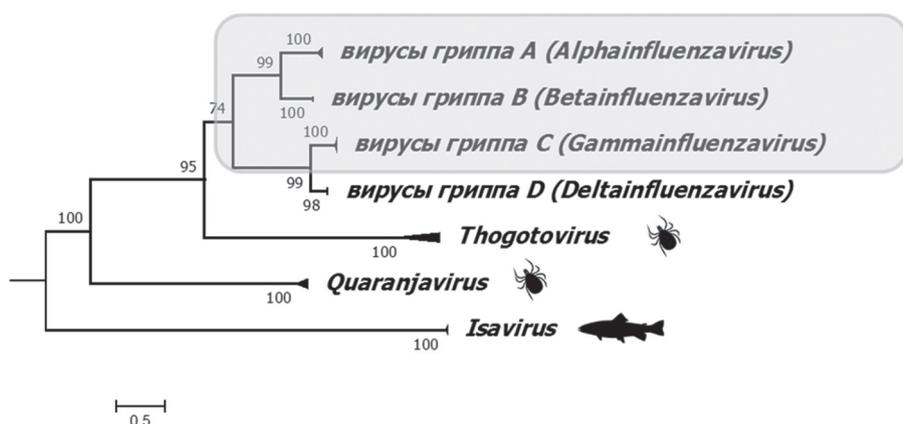


Рис. 1. Филогенетическая структура семейства *Orthomyxoviridae*

Fig. 1. Phylogenetic structure of *Orthomyxoviridae* family

Вскоре после появления вируса A(H1N1)pdm09 в Норвегии, России, Италии, а затем и в других странах мира у штаммов, выделенных от лиц, погибших от гриппа в результате первичной вирусной пневмонии, в рецептор-связывающем сайте HA1 выявлены мутации D222G/N. Эти мутации позволяют вирусу беспрепятственно проникать в нижние отделы респираторного тракта с поражением альвеол и бронхиол, вызывая острое повреждение легких с последующим развитием острого респираторного дистресс-синдрома, требующего искусственную вентиляцию легких и заканчивающегося летальным исходом в 60 % случаев [9–11]. D222G аминокислотная замена выявлена и у пандемического вируса гриппа «испанки» A(H1N1) в 1918 г. [5].

Вирулентность вирусов гриппа А птиц, свиней и человека зависит, помимо структуры HA, и от других генов. В частности, мутация E627K в белке полимеразного комплекса (PB2) играет важнейшую роль в превращении низко вирулентного вируса в высоковирулентный. Эти же исследования показали возможность экспериментального появления высоко патогенного вируса гриппа птиц A(H5N1), способного к трансмиссии среди людей [12–14]. Установлено, что мутации Q222L меняют РС пандемического вируса гриппа A(H2N2) 1957 г., G228S у вируса A(H3N2) 1968 г. [5]. Эти данные объясняют потенциальную угрозу использования вирусов гриппа в качестве биологического оружия [15, 16]. В этой связи обсуждался вопрос о степени публичной доступности информации к соответствующим технологическим подходам [14, 17].

**Цель** настоящей работы заключалась в выявлении дрейфовой изменчивости вирусов гриппа в период эпидемического подъема заболеваемости ОРВИ в период 2018–2019 гг. Проведено изучение биологических и молекулярно-генетических свойств эпидемических штаммов, выделенных на отдельных территориях РФ, и сравнение их с данными стран Северного полушария.

### Материалы и методы

В рамках осуществления эпидемиологического надзора за циркуляцией вирусов гриппа в РФ Центр экологии и эпидемиологии гриппа (ЦЭЭГ), Национальный центр по гриппу, сотрудничающий с ВОЗ (НЦГ), Института вирусологии им. Д.И. Иванова ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России в сотрудничестве с 10 опорными базами, представленными Территориальными управлениями и ФБУЗ «Центрами гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора в Европейской части (Великий Новгород, Липецк, Владимир, Ярославль, Пенза и Чебоксары), на Урале (Оренбург), в Сибири (Томск) и на Дальнем Востоке (Владивосток и Биробиджан), провели изучение особенностей циркуляции вирусов гриппа А и В в сезоне 2018–2019 гг.

Анализ заболеваемости гриппом и ОРВИ в раз-

ных возрастных группах, изоляция вирусов гриппа и их типирование, постановка методов иммунофлюоресцирующих антител (МИФ), ОТ-ПЦР, оценки чувствительности к противогриппозным препаратам, рецепторной специфичности, секвенирования фрагментов, полногеномного секвенирования и сборки геномов, а также статистическая обработка полученных результатов описаны ранее в статьях авторов настоящей работы [18–20]. Данные полногеномного секвенирования зарегистрированы в GenBank NCBI (Accession Numbers: MK495274 – MK495353, MN061080 – MN061231, MN061232 – MN061263).

### Результаты и обсуждение

**Особенности распространения и активности вирусов гриппа.** На сотрудничающих с ЦЭЭГ территориях превышение эпидемического порога заболеваемости ОРВИ по отношению к среднему показателю по РФ (72,6 на 10 тыс. населения) регистрировали с 4 недели 2019 г., т.е. в более ранние сроки по сравнению с предыдущим сезоном 2017–2018 гг.: рост показателей отмечен с первых недель 2019 г., максимальные показатели – на 5 неделе и снижение ниже порогового значения к 10 неделе (рис. 2).

Наиболее высокие показатели заболеваемости регистрировали у детей 0–2 лет (321,7 на 10 тыс. населения) и 3–6 лет (300,3), при этом показатели были ниже по сравнению с предыдущим сезоном (367,5 и 323,3 соответственно). Заболеваемость школьников также оказалась ниже по сравнению с предыдущим годом, но более высокой по сравнению с 2016–2017 гг. (121,8, 140,0 и 63,2 соответственно), а показатели взрослого населения практически одинаковы (23,3 и 24,4 соответственно). Средние показатели по совокупному населению незначительно отличались между сезонами и составили 56,6 и 60,3 соответственно.

Первый случай с клиническим диагнозом «грипп» отмечен на 44 неделе 2018 г. (в группе 7–14 лет), к концу сезона общее число госпитализаций составило 90, что значительно больше по сравнению с предыдущим (10). Частота госпитализаций в возрастных группах распределилась следующим образом: 0–2 года – 16 % (в прошлом – 15,0 %), 3–6 лет – 19,0 % (19,0 %), 7–14 лет – 13,0 % (11,0 %), 15 лет и старше – 52,0 % (55,0 %).

Проведены исследования клинических материалов по диагностике гриппа и ОРВИ, объем которых составил в целом 13443 образца, в том числе: ПЦР – 11412 (грипп)/6401 (ОРВИ) образец, МИФ – 4076 образцов, изоляция штаммов на клетках культуры ткани MDCK, MDCK-SIAT1 и куриных эмбрионах – из 1798 образцов (носоглоточные смывы, аутопсийный материал). В период всего эпидемического сезона долевое участие вирусов гриппа по совокупности данных всех лабораторных методов составило: A(H1N1)pdm09 – 53,0 %, A(H3N2) – 46,0 %, В – 1,0 %.

**Мониторинг случаев ТОРИ.** В группу ТОРИ (тяжелая острая респираторная инфекция) включено

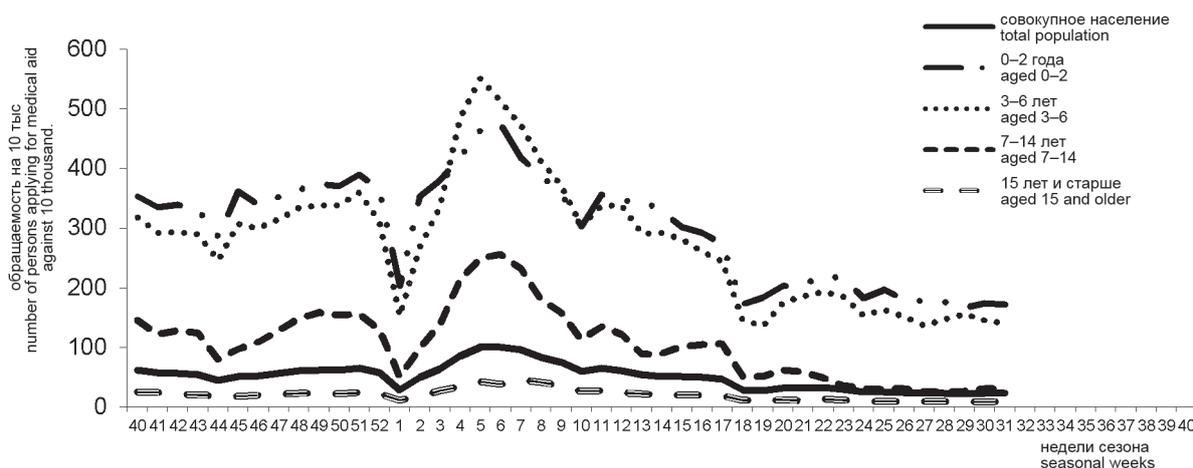


Рис. 2. Динамика средних показателей заболеваемости гриппом в различных возрастных группах на 10 опорных базах ЦЭЭГ в сезоне 2018–2019 гг.

Fig. 2. Dynamics of morbidity among different age groups of population on 10 territories collaborating with IEEC in season 2018–2019

56 пациентов с тяжелыми и средне-тяжелыми формами гриппоподобных заболеваний. Возрастное распределение: от 0 до 12 мес. – 16 человек (29 %), 1–4 года – 15 человек (27 %), 5–14 лет – 5 человек (9 %), 15–64 года – 14 человек (25 %), 65 лет и старше – 6 человек (10 %).

В ЦЭЭГ поступили информация и клинический материал (носоглоточные смывы, ткани трахеи, легкого) от семи пациентов, умерших от гриппозной инфекции, этиологически связанной с вирусами гриппа А(H1N1)pdm09 (6) и А(H3N2) (1). Все умершие не имели в анамнезе вакцинации против гриппа и раннего лечения противовирусными препаратами. У всех пациентов гриппозная инфекция осложнилась первичной вирусной пневмонией, что явилось причиной летального исхода.

**Антигенные свойства эпидемических штаммов вирусов гриппа.** Результаты антигенной характеристики 376 штаммов, выделенных в декабре 2018 г. – июле 2019 г., определили родство 243 штаммов вируса гриппа А(H1N1)pdm09 с эталоном А/Мичиган/45/2015 (входил в состав гриппозных вакцин в сезоне 2017–2018 гг.); штаммы взаимодействовали с сывороткой к этому вирусу от 1/8 до полного гомологичного титра. 86 % штаммов вируса гриппа А(H3N2) имели близкое родство с эталоном А/Гонконг/5738/2014 и взаимодействовали с сывороткой к этому вирусу от 1/4 (21,0 %) до полного гомологичного титра; 16 штаммов реагировали с референс-сывороткой до 1/8 гомологичного титра. Такая же гетерогенность прослеживалась по отношению с референс-сывороткой к А/Сингапур/INFIMH-16-0019/2016; восемь штаммов вируса гриппа типа В были родственны эталону В/Пхукет/3073/2013 (линии В/Ямагата-подобных, входил в состав четырех-валентных гриппозных вакцин) и взаимодействовали с сывороткой к этому вирусу до полного гомологичного титра. Девять штаммов виру-

са гриппа В типированы как В/Виктория-подобные, причем, восемь из них были близки к эталону В/Брисбен/60/2008, один – к В/Колорадо/06/2017.

**Чувствительность эпидемических штаммов к противогриппозным препаратам.** Изучена чувствительность эпидемических штаммов вирусов гриппа А(H1N1)pdm09 (45), А(H3N2) (19) и гриппа В (6) к препаратам с антинейраминидазной активностью. Все из изученных штаммов, проявили чувствительность к озельтамивиру и занамивиру.

**Рецепторная специфичность эпидемических штаммов.** Методом твердофазного сиалозидферментного анализа, основанного на определении взаимодействия рецептор-связывающего сайта (РСС) HA1 вируса с аналогами клеточных рецепторов, восемью синтетическими сиалогликополимерами (СГП), проведено изучение девяти штаммов вируса гриппа А(H1N1)pdm09.

В табл. 1 представлены результаты средства изученных штаммов со спектром сиалогликополимеров. Результаты показали, что штаммы обладают рецепторной специфичностью, характерной для вирусов гриппа человека (W3/6<1), причем наибольшее средство вирусы проявили к сиалогликополимерам 6'SLN и Su-6'SLN. Для сравнения: изолированный ранее от умершего больного штамм-мутант (D222N) обладал W3/6-2.1, а изолированный во время эпидемии от поганки *Podiceps cristatus* высоко-патогенный штамм А(H5N1) А/grebe/Тува/2010 – W3/6-6.3.

**Молекулярно-генетические исследования.** Изучены генетические свойства 34 эпидемических штаммов вирусов гриппа, выделенных на разных территориях РФ (табл. 2).

14 штаммов вируса гриппа А(H1N1)pdm09 принадлежали к клейдам 6В1.А (6), 6В1.А5 (7), 6В1.А6 (1) и различались по отдельным мутациям. Для группы 6В.1 (референс-вирус А/Мичиган/45/2015) характерны замены S162N и I216T. В популяции штаммов

Таблица 1 / Table 1

Показатели сродства эпидемических штаммов вируса гриппа А/Н1N1/pdm09, изолированных в эпидемическом сезоне 2018–2019 гг., к синалогликополимерам

Receptor affinity of epidemic strains A/H1N1/pdm09 isolated in 2018–2019 to syaloglycopolymers

Регион Region	Эпидемические штаммы вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 Epidemic influenza virus strains	W <sub>3/6</sub>	Вклад СГП в рецепторную специфичность вируса, % Impact of syaloglycopolymers in virus receptor specificity, %							
			3'SL	3'SLN	Su-3'SLN	SLe <sup>a</sup>	SLe <sup>x</sup>	6'SL	6'SLN	Su-6'SLN
Дальний Восток Far East	A/Birobidzhan/65/19	0,427	9,24	5,18	8,93	8,19	8,95	6,56	27,27	25,67
	A/Birobidzhan/97/19	0,538	11,43	5,87	6,64	3,61	5,13	2,43	31,58	33,30
Урал Ural	A/Orenburg/12/19	0,756	11,37	5,89	12,67	9,36	9,72	13,18	14,70	23,12
Центр Европейской части Center of European part	A/V.Novgorod/103/19	0,528	10,52	6,14	9,18	6,18	9,46	4,52	27,04	26,94
	A/V.Novgorod/106/19	0,788	11,08	9,11	12,42	8,59	8,26	2,71	23,62	24,20
	A/Moscow/2/19	0,318	7,24	4,31	7,38	7,43	4,45	11,81	29,34	28,04
	A/Moscow/3/19	0,590	10,72	6,60	11,01	11,62	7,11	3,23	26,40	23,27
Северный Кавказ North Caucasus	A/Grozny/100/19	0,838	14,69	8,27	10,20	8,38	10,66	3,39	24,00	20,33
	A/Makhachkala/58/19	0,774	13,65	11,47	11,02	9,27	1,62	9,70	23,62	19,61
<b>Среднее значение Mean value</b>		<b>0,617</b>	<b>11,10</b>	<b>6,98</b>	<b>9,94</b>	<b>8,07</b>	<b>7,26</b>	<b>6,39</b>	<b>25,29</b>	<b>24,94</b>

2018–2019 гг. в рамках клайда: 6B.1A – выявлены характерные мутации S74R, S164T и I295V; 6B.1A5 – 6B.1A+ S183P, N129D и N260D; 6B.1A6 – 6B.1A+ S183P, T120A. Кроме того, штамм А/Грозный/99/2019 имел дополнительно замену G140R. Несмотря на такие различия, все штаммы имели близкое родство по антигенным свойствам с А/Мичиган/45/2015 и взаимодействовали с сывороткой до 1/2 полного гомологичного титра.

Все штаммы вируса гриппа А(Н3N2) отнесены к генетической группе 3С.2а, несли замены в гемагглютинине (НA1), N128T, N144S (ответственны за потерю потенциального сайта гликозилирования), N145S, F159Y, K160T (ответственны за приобретение потенциального сайта гликозилирования), P198S, F219S, N225D и Q311H, что определило их родство с А/Гонконг/5738/2014. В то же время штаммы имели дополнительные замены N171K, K92R (характерны для референс-вируса А/Сингапур/INFIMH-16-0019/2016, подгруппа 3С.2a1) и H311K, которые определили их принадлежность к подгруппе 3С.2a1b, представители которой доминировали в эпидемическом сезоне 2018–2019 гг. (референс вирус – А/Эльзас/1746/2018).

Популяция штаммов вируса гриппа В была представлена обеими эволюционными линиями. Среди двух штаммов линии В/Виктория-подобных – один штамм содержал две делеции в НА1 (162 и 163 положения) и один штамм – три делеции (162–164). Оба штамма по антигенным свойствам имели близкое родство с референс-вирусом В/Брисбен/60/2018 и один из них – с В/Колорадо/06/2017. Два других штамма вируса гриппа В имели близкое родство с референс-вирусом В/Пхукет/3073/2013 (линия В/Ямагата, ветвь 3).

Этиологию эпидемических подъемов заболеваемости как в России, так и других странах мира, в сезоне 2018–2019 гг. определяли вирусы гриппа

А(Н1N1)pdm09 и А(Н3N2). В то же время активность вируса гриппа В была повсеместно крайне низкой. В странах, где большую активность имел вирус гриппа А(Н1N1)pdm09, вновь отмечены более высокие показатели частоты тяжелых случаев течения гриппозной инфекции и летальности.

В Северном полушарии рост активности вирусов гриппа начали регистрировать в октябре–ноябре 2018 г. с пиковой активностью в конце января – начале февраля 2019 г., что сравнимо с Россией [21, 2]. Этиологию заболеваний в этот период определяли вирусы А(Н1N1)pdm09, А(Н3N2) и В, причем их долевое участие несколько различалось по странам и континентам. Максимальное число положительных проб на вирусы гриппа отмечено на шестой неделе 2019 г. (32,0 %): при большей активности вируса А(Н1N1)pdm09 – 65 % и меньшей А(Н3N2) – 35,0 %.

В странах Европейского региона проведена оценка рисков гриппозной инфекции у пациентов с ТОРИ [23]. Среди 2843 положительных на грипп случаев, наиболее часто выявляли вирусы типа А (99 %). Среди 2540 случаев гриппа типа А, при которых определен подтип вируса, в 79 % выявлены вирусы А(Н1N1)pdm09, в остальных 21 % – А(Н3N2).

В США госпитализировано 17295 пациентов с диагнозом «грипп» (59,9 на 100 тыс. населения), что практически в 2 раза меньше по сравнению с предыдущим сезоном [24]. В то же время показатели в возрастных группах, как и ранее, различались: 195,9 – у лиц старше 65 лет; 75,5 – у лиц 50–64 года; 69,1 – дети 0–4 года. Частота положительных проб на «грипп» составила: тип А – 96,0 % (44,0 % – грипп А(Н3N2) и 66,0 % А(Н1N1)pdm09) и тип В – 3,0 %. Анализ рисков тяжелого течения гриппозной инфекции показал, что 50,0 % госпитализированных имели, как минимум, одно из сопутствующих заболеваний, среди которых наиболее часто астма. Частота госпитализаций среди беременных составила 27,3 %. По данным

Таблица 2 / Table 2

**Принадлежность эпидемических штаммов вирусов гриппа, изолированных на Дальнем Востоке, в Сибири, на Урале, в центре Европейской части России, на Северном Кавказе в эпидемическом сезоне 2018–2019 гг. к генетическим группам**

**Genetic clades of flu virus epidemic strains isolated in 2018–2019 in different parts of Russia**

Регион Region	Штаммы вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 (14) Strains of the influenza A virus (H1N1) pdm09 (14)		Штаммы вируса гриппа А(Н3N2) (16) Strains of the influenza A virus A(H3N2) (16)		Штаммы вируса гриппа В (4) Strains of the influenza B (4)	
	название name	клайд clade	название name	клайд clade	название name	клайд clade
Дальний Восток Far East	A/Vladivostok/15/19	6B1.A5				
	A/Birobidzhan 65/19	6B1.A5				
	A/Birobidzhan/97/19	6B1.A5				
Сибирь Siberia	A/Tomsk/9/19	6B.1A	A/Tomsk/243/18	3C.2a1b		
			A/Tomsk/244/18	3C.2a1b		
			A/Tomsk/245/18	3C.2a1b		
Урал Ural	A/Orenburg/12/19	6B1.A5				
Европейская часть European part	A/V.Novgorod/103/19	6B1.A5	A/Moscow/119/19	3C.2a1b	B/Moscow/2/19	V1A.1
	A/V.Novgorod/106/19	6B1.A5	A/Moscow/121/19	3C.2a1b	B/Moscow/3/19	V1A-3Del
	A/Moscow/2/19	6B1.A5	A/Moscow/122/19	3C.2a1b	B/Moscow/5/19	Y3
	A/Moscow/249/18	6B.1A	A/Moscow/236/18	3C.2a1b		
	A/Moscow/250/18	6B.1A	A/Moscow/238/18	3C.2a1b		
	A/Moscow/3/19	6B1.A6	A/Moscow/1/19	3C.2a1b		
			A/Yaroslavl/82/19	3C.2a1b		
A/Vladimir/87/19		3C.2a1b				
Северный Кавказ North Caucasus	A/Grozny/99/19	6B.1A	A/Grozny/88/19	3C.2a1b	B/Grozny/6/19	Y3
	A/Grozny/100/19	6B.1A	A/Grozny/89/19	3C.2a1b		
	A/Makhachkala/58/19	6B.1A	A/Grozny/90/19	3C.2a1b		
			A/Makhachkala/84/19	3C.2a1b		
			A/Makhachkala/86/19	3C.2a1b		

мониторинга гриппа у детей с летальными исходами, детектировано 114 случаев (грипп А – 105, грипп В – 7, не типировано – 1 и сочетанная инфекция гриппом А и В – 1), что значительно меньше по сравнению с прошлым эпидемическим сезоном (187).

По антигенным свойствам большинство изученных штаммов, как и в России, оказались близкородственны вакцинным вирусам. В популяции вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 появились антигенные варианты, несущие замены в 156 положении HA (N156K и N156D), которые слабо реагировали с сывороткой к вакцинному вирусу А/Мичиган/45/2015 (H1N1) pdm09. По генетическим свойствам большинство штаммов отнесено к подгруппе 6B.1A, 183-P5. Особое многообразие по представительству генетических групп отмечено в отношении вируса гриппа А(Н3N2): на фоне доминирования подгруппы 3C.2a.1b во многих странах мира. В США отмечено доминирование подгруппы 3C.3a с тенденцией ее роста в течение всего эпидемического сезона (56 %). Популяция штаммов вируса гриппа В/Виктория-подобных (эталон В/Брисбен/60/2008) также была гетерогенной и представлена как штаммами, не несущими аминокислотные замены (в Европе – 20 %), так и штаммами, несущими две аминокислотные замены, эталон В/Колорадо/06/2017 (в Европе – 20 %, в США – 25 %), в тоже время, отмечен рост активности

штаммов, несущих три аминокислотные замены (в Европе – 60 % и США – 56 %).

Подавляющее большинство штаммов, циркулировавших в странах Северного полушария (по данным тестирования 4636 штаммов), в основном сохранили чувствительность к препаратам с антинейраминидазной активностью (озельтамивиру, занамивиру) и, в то же время, были резистентными к препаратам адамантанового ряда (ремантадину и амантадину). Резистентность к озельтамивиру выявлена в 0,6 % к вирусу А(Н1N1)pdm09, 0,1 % – к вирусу А(Н3N2), 0,4 % – к вирусу В [23, 24].

21 марта 2019 г. опубликованы материалы консультативного совещания экспертов ВОЗ по составу гриппозных вакцин для стран Северного полушария на 2019–2020 гг. [25]. В состав трехвалентных гриппозных вакцин рекомендованы штаммы: вируса гриппа А(Н1N1)pdm09 – А/Брисбен/02/2018, вируса гриппа А(Н3N2) – А/Канзас/14/2017 (подгруппа 3C.3a) и вируса гриппа В – В/Колорадо/06/201760/2008 (линия В/Виктория-подобных, содержащая 2 делеции в HA). В состав четырехвалентных вакцин дополнительно рекомендован вирус гриппа В/Пхукет/3073/2013 (линия В/Ямагата-подобных).

Ситуация с инфицированием людей вирусами гриппа птиц была относительно благоприятной, и в последний год отмечен только один случай инфици-

рования вирусом гриппа А(Н5N1) в Непале (общее число составило 861, 445 (52,8 %) из которых – с летальными исходами) и 4 новых случая инфицирования людей вирусом гриппа птиц А(Н5N6), общее число составило 23, 7 из которых (30,4 %) – с летальными исходами [26, 27]. В 2019 г. детектировано 4 случая инфицирования людей вирусом гриппа А(Н9N2), всего с декабря 2015 г. зарегистрировано 26 случаев. На 21.02.2019 г. зарегистрировано 1568 случаев инфицирования людей вирусом гриппа А(Н7N9), 615 (39,2 %) из которых – с летальными исходами [28]. Большинство случаев зарегистрированы в Китае. В феврале 2018 г. в КНР выявлен случай заболевания человека вирусом гриппа А(Н7N4) [29].

Приведенные данные свидетельствуют о необходимости постоянного комплексного мониторинга на международном уровне циркуляции вирусов гриппа с привлечением вирусологов, клиницистов, молекулярных генетиков для минимизации последствий эпидемий/пандемий и эпизоотий/панзоотий.

#### Благодарности за многолетнее сотрудничество в надзоре за циркуляцией вирусов гриппа в Российской Федерации

Авторы благодарны сотрудникам региональных управлений Роспотребнадзора и ФБУЗ «Центрам гигиены и эпидемиологии», сотрудничающих с ЦЭЭГ: на Дальнем Востоке – Приморского края (Просьянниковой М.Н.), Еврейской автономной области (Авдошиной Л.Н.); в Сибири – Томской области (Кондратьевой Л.М.); на Урале – Оренбургской области (Скворцову В.О.); на Северном Кавказе – сотрудникам Республиканского центра инфекционных болезней г. Махачкалы (Магомедовой З.М.), Республиканского клинического центра инфекционных болезней г. Грозный (Салаватову М.Т.), Республиканской клинической больницы скорой медицинской помощи и Республиканской детской клинической больницы г. Владикавказа (Тавасиевой В.Э.); в центре Европейской части – Новгородской области (Харламову М.В., Сембратович П.П.), Ярославской области (Карповой Н.Л.), Владимирской области (Джапаридзе Н.И.), Чувашской Республики (Московской С.В.), Липецкой области (Савельеву С.И.), Пензенской области (Рябининой Т.В., Гусевой Ю.В.), Тверской области (Матюшковой В.В.), а также сотрудникам ФБУЗ «Инфекционной клинической больницы № 1» ДЗ г. Москвы за предоставление данных и образцов клинических материалов, необходимых в проведении мониторинга циркуляции вирусов гриппа в сезоне 2018–2019 гг. в России.

**Финансирование.** Исследования поддержаны грантом Кооперативного соглашения с Центрами по контролю за заболеваемостью и профилактике, Атланта, США – «Поддержание потенциала по надзору за гриппом в России», и Фондом Франции по эпидемиологии гриппа в рамках выполнения Соглашения по мониторингу гриппа у госпитализированных пациентов.

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

#### Список литературы

1. McCauley J.W., Hongo S., Kaverin N.V., Kochs G., Lamb R.A., Matrosovich M.N., Perez D.R., Palese P., Presti R.M., Rimstad E., Smith G.J.D. Family *Orthomyxoviridae*. In: Andrew M.Q. King, Elliot Lefkowitz, Michael J. Adams, Eric B. Carstens, editors. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the International Committee of Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier/Academic Press; 2012. P. 749–61.
2. Lvov D.K., Schelkanov M.Y., Alkhovskiy S.V., Deryabin P.G. Zoonotic viruses of Northern Eurasia. Taxonomy and ecology. London: Academic Press, 2015. 452 p.
3. Influenza (Seasonal) [Электронный ресурс]. URL: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) (дата обращения 10.07.2019).
4. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, Dawood F.S., Jain S., Finelli L., Shaw M.W., Lindstrom S., Garten R.J., Gubareva L.V., Xu X., Bridges C.B., Uyeki T.M. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360(25):2605–15. DOI: 10.1056/NEJMoa0903810.
5. Stevens J., Blixt O., Glaser L., Taubenberger J.K., Palese P., Paulson J.C., Wilson I.A. Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities. *J. Mol. Biol.* 2006; 355(5):1143–55. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.11.002.
6. Yang H., Camey P., Stevens J. Structure and receptor binding properties of a pandemic H1N1 virus hemagglutinin. *PLoS Curr.* 2010; 2:RRN152. DOI: 10.1371/currents.RRN152/
7. Lvov D.K., Schelkanov M.Y., Prilipov A.G., Vlasov N.A., Fedyakina I.T., Deryabin P.G., Alkhovskiy S.V., Grebennikova T.V., Zaberezhny A.D., Suarez D.L. Evolution of HPAI H5N1 virus in natural ecosystems of northern Eurasia. *Avian Dis.* 2010; 54(1 Suppl):483–95. DOI: 10.1637/8893-042509-Review.1
8. Watanabe Y., Ibrahim M.S., Ellakany H., Kawashita N., Mizuike R., Hiramatsu H., Sriwilajaroen N., Takagi T., Suzuki Y., Ikuta K. Acquisition of human-type receptor binding specificity by new H5N1 influenza virus sublineages during their emergence in birds in Egypt. *PLoS Pathog.* 2011; 7(5):e1002068. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002068.
9. Kilander A., Rykkvin R., Dudman S.G., Hungnes O. Observed association between the HA1 mutation D222G in the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus and severe clinical outcome, Norway 2009–2010. *Euro surveill.* 2010; 15(9):pii: 19498. DOI: 10.2807/ese.15.09.19498-en.
10. Mak G.C., Au K.W., Tai L.S., Chuang K.C., Cheng K.C., Shiu T.C., Lim W. Association of D222G substitution in haemagglutinin of 2009 pandemic influenza A (H1N1) with severe disease. *Euro Surveill.* 2010; 15(14):pii: 19534. DOI: 10.2807/ese.15.14.19534-en.
11. Puzelli S., Facchini M., Spagnolo D., De Marco M.A., Calzoletti L., Zanetti A., Fumagalli R., Tanzi M.L., Cassone A., Rezza G., Donatelli I.; Surveillance Group for Pandemic A H1N1 2009 Influenza Virus in Italy. Transmission of hemagglutinin D222G mutant strain of pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16(5):863–5. DOI: 10.3201/eid1605.091815.
12. Herfst S., Schrauwen E.J.A., Linster M., Chutinimitkul S., de Wit E., Munster V.J., Sorrell E.M., Bestebroer T.M., Burke D.F., Smith D.J., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science.* 2012; 336(6088):1534–41. DOI: 10.1126/science.1213362.
13. Imai M., Watanabe T., Hatta M., Das S.C., Ozawa M., Shinya K., Zhong G., Hanson A., Katsura H., Watanabe S., Li C., Kawakami E., Yamada S., Kiso M., Suzuki Y., Maher E.A., Neumann G., Kawaoka Y. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature.* 2012; 486(7403):420–8.
14. Imperiale M., Hanna M.B. 3rd. Biosafety considerations of mammalian transmissible H5N1 influenza. *MBio.* 2012; 3(2):e00043-12. DOI: 10.1128/mBio.00043-12.
15. Madjid M., Lillibridge S., Mirhaji P., Casscells W. Influenza as a bioweapon. *J. R. Soc. Med.* 2003; 96(7):345–6. DOI: 10.1258/jrsm.96.7.345.
16. O'Toole T., Inglesby T. Strategic priorities for U.S. biosecurity. *Bioterror: Bioterror.* 2009; 7:25–8. DOI: 10.1089/bsp.2009.1001.
17. Palese P., Wang T.T. H5N1 influenza viruses: facts, not fear. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109:2211–13. DOI: 10.1073/pnas.1121297109.
18. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Мукашева Е.А. Колобухина

- Л.В., Трушаква С.В., Бреслав Н.В., Феодоритова Е.Л., Меркулова Л.Н., Краснослободцев К.Г., Морозова Е.О., Федякина И.Т., Аристова В.А., Вартанян Р.В., Кистенева Л.Б., Прилипов А.Г., Альховский С.В., Росаткевич А.Г., Кружкова И.С., Беляев А.Л., Аксельрод Э.В., Базарова М.В., Сметанина С.В. Активность вирусов гриппа в сезоне 2017–2018 гг. в России и странах Северного полушария: конфликт по В-вирусному компоненту вакцин. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2019; 18(3):13–21. DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-3-13-21.
19. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Бовин Н.В., Малышев Н.А., Чучалин А.Г., Колобухина Л.В., Прилипов А.Г., Богданова В.С., Альховский С.В., Самохвалов Е.И., Федякина И.Т., Бурцевак Е.И., Дерыбин П.Г., Журавлева М.М., Шевченко Е.С., Лавришова В.В., Львов Д.М., Прошина Е.С., Стариков Н.С., Морозова Т.Н., Базарова М.В., Григорьева Т.А., Кириллов И.М., Шидловская Е.В., Келли Е.И., Маликов В.Е., Яшкульов К.Б., Ананьев В.Ю., Баранов Н.И., Гореликов В.Н., Цой О.В., Гарбуз Л.И., Резник В.И., Иванов Л.И., Федеш И.Ю., Пономаренко Р.А., Сахарова Е.А., Лебедев Г.Б., Маслов А.И. Корреляция между рецепторной специфичностью штаммов пандемического вируса гриппа А(H1N1)pdm09, изолированных в 2009–2011 гг., структурой рецепторсвязывающего сайта и вероятностью развития летальной первичной вирусной пневмонии. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(1):14–20.
20. Voronina O.L., Ryzhova N.N., Aksenova E.I., Kunda M.S., Sharapova N.E., Fedyakina I.T., Chvala I.A., Borisevich S.V., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. Genetic features of highly pathogenic avian influenza viruses A(H5N8), isolated from the European part of the Russian Federation. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 63:144–50. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.05.022.
21. Обзорные информации ВОЗ активности вирусов гриппа в мире (GISRS). [Электронный ресурс]. URL: [http://www.who.int/influenza/surveillance\\_monitoring/updates/en](http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/en) (дата обращения 17.09.2019).
22. Данные вирусологических исследований ВОЗ (FluNet). [Электронный ресурс]. URL: [http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/updates/summaryreport/en](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/updates/summaryreport/en) (дата обращения 17.09.2019).
23. Сайт Европейского бюро ВОЗ. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.flunews.euro.who.org/> (дата обращения 07.07.2019)
24. Сайт Центров по контролю за заболеваемостью и профилактике (CDC&P), Атланта США. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.cdc.gov/flu/weekly/index.htm> (дата обращения 15.09.2019).
25. Weekly Epidemiological Record. 2019, 22 March. Vol. 94. P. 141–60. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/wer/2019/wer9412/en/> (дата обращения 14.05.2019).
26. Human Infection with avian Influenza A(H5) viruses. WHO. Avian influenza weekly update number 696. 04.07.2019.
27. Данные по случаям инфицирования людей вирусами гриппа птиц. [Электронный ресурс]. URL: [http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/en](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/en) (дата обращения 04.07.2019).
28. Случаи инфицирования людей вирусом гриппа птиц А(H7N9). [Электронный ресурс]. URL: [http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/influenza\\_h7n9/en/index.html](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/influenza_h7n9/en/index.html) (дата обращения 15.08.2019).
29. Human infection with avian influenza A(H7N4) virus – China. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/csr/don/22-february-2018-ah7n4-china/en/> (дата обращения 08.09.2019).
- ent receptor specificities. *J. Mol. Biol.* 2006; 355(5):1143–55. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.11.002.
6. Yang H., Camey P., Stevens J. Structure and receptor binding properties of a pandemic H1N1 virus hemagglutinin. *PLoS Curr.* 2010; 2:RRN152. DOI: 10.1371/currents.RRN152/
7. Lvov D.K., Schelkanov M.Y., Prilipov A.G., Vlasov N.A., Fedyakina I.T., Deryabin P.G., Alkhovsky S.V., Grebennikova T.V., Zaberezhny A.D., Suarez D.L. Evolution of HPAI H5N1 virus in natural ecosystems of northern Eurasia. *Avian Dis.* 2010; 54(1 Suppl):483–95. DOI: 10.1637/8893-042509-Review.1
8. Watanabe Y., Ibrahim M.S., Ellakany H., Kawashita N., Mizuike R., Hiramatsu H., Sriwilajaroen N., Takagi T., Suzuki Y., Ikuta K. Acquisition of human-type receptor binding specificity by new H5N1 influenza virus sublineages during their emergence in birds in Egypt. *PLoS Pathog.* 2011; 7(5):e1002068. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002068.
9. Kilander A., Rykkvin R., Dudman S.G., Hungnes O. Observed association between the HA1 mutation D222G in the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus and severe clinical outcome, Norway 2009–2010. *Euro surveill.* 2010; 15(9):pii: 19498. DOI: 10.2807/ese.15.09.19498-en.
10. Mak G.C., Au K.W., Tai L.S., Chuang K.C., Cheng K.C., Shiu T.C., Lim W. Association of D222G substitution in haemagglutinin of 2009 pandemic influenza A (H1N1) with severe disease. *Euro Surveill.* 2010; 15(14):pii: 19534. DOI: 10.2807/ese.15.14.19534-en.
11. Puzelli S., Facchini M., Spagnolo D., De Marco M.A., Calzoletti L., Zanetti A., Fumagalli R., Tanzi M.L., Cassone A., Rezza G., Donatelli I.; Surveillance Group for Pandemic A H1N1 2009 Influenza Virus in Italy. Transmission of hemagglutinin D222G mutant strain of pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16(5):863–5. DOI: 10.3201/eid1605.091815.
12. Herfst S., Schrauwen E.J.A., Linster M., Chutinimitkul S., de Wit E., Munster V.J., Sorrell E.M., Bestebroer T.M., Burke D.F., Smith D.J., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science.* 2012; 336(6088):1534–41. DOI: 10.1126/science.1213362.
13. Imai M., Watanabe T., Hatta M., Das S.C., Ozawa M., Shinya K., Zhong G., Hanson A., Katsura H., Watanabe S., Li C., Kawakami E., Yamada S., Kiso M., Suzuki Y., Maher E.A., Neumann G., Kawakami Y. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature.* 2012; 486(7403):420–8.
14. Imperiale M., Hanna M.B. 3rd. Biosafety considerations of mammalian transmissible H5N1 influenza. *MBio.* 2012; 3(2):e00043-12. DOI: 10.1128/mBio.00043-12.
15. Madjid M., Lillibridge S., Mirhaji P., Casscells W. Influenza as a bioweapon. *J. R. Soc. Med.* 2003; 96(7):345–6. DOI: 10.1258/jrsm.96.7.345.
16. O’Toole T., Inglesby T. Strategic priorities for U.S. biosecurity. *Bio Secur. Bioterror.* 2009; 7:25–8. DOI: 10.1089/bsp.2009.1001.
17. Palese P., Wang T.T. H5N1 influenza viruses: facts, not fear. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109:2211–13. DOI: 10.1073/pnas.1121297109.
18. Lvov D.K., Burtseva E.I., Mukasheva E.A., Kolobukhina L.V., Trushakova S.V., Breslav N.V., Feodoritova E.L., Merkulova L.N., Krasnoslobodtsev K.G., Morozova E.O., Fedyakina I.T., Aristova V.A., Vartanyan R.V., Kisteneva L.B., Prilipov A.G., Alkhovsky S.V., Rosatkevich A.G., Kruzhkova I.S., Belyaev A.L., Axelrod E.V., Bazarova M.V., Smetanina S.V. Activity of influenza viruses in the season 2017–2018 in Russia and the Northern Hemisphere: Conflict over the B-virus component of vaccines. *Epidemiologiya i vakcinoprofilaktika [Epidemiology and Vaccinal Prevention]*. 2019; 18(3):13–21. DOI: 10.31631/2073-3046-2019-18-3-13-21.
19. Lvov D.K., Shchelkanov M.Yu., Bovин N.V., Malyshev N.A., Chuchalin A.G., Kolobukhina L.V., Prilipov A.G., Bogdanova V.S., Alkhovsky S.V., Samokhvalov E.I., Fedyakina I.T., Burtsevak E.I., Deryabin P.G., Zhuravleva M.M., Shevchenko E.S., Lavrishcheva V.V., Lvov D.M., Proshina E.S., Starikov N.S., Morozova T.N., Bazarova M.V., Grigoryeva T.A., Kirillov I.M., Shidlovskaya E.V., Kelly E.I., Malikov V.E., Yashkulov K.B., Ananyev V.Yu., Baranov N.I., Gorelikov V.N., Tsoi O.V., Garbus L.I., Reznik V.I., Ivanov L.I., Fedelesh I.Yu., Ponomarenko R.A., Sakharova E.A., Lebedev G.B., Maslov A.I. Correlation between the receptor specificity of strains of the pandemic influenza A (H1N1) pdm09 virus isolated in 2009–2011, the structure of the receptor-binding site and the likelihood of developing lethal primary viral pneumonia. *Voprosy virusologii [Problems of Virology]*. 2012; 57(1):14–20.
20. Voronina O.L., Ryzhova N.N., Aksenova E.I., Kunda M.S., Sharapova N.E., Fedyakina I.T., Chvala I.A., Borisevich S.V., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. Genetic features of highly pathogenic avian influenza viruses A(H5N8), isolated from the European part of the Russian Federation. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 63:144–50. DOI: 10.1016/j.meegid.2018.05.022.
21. Overview of WHO World Influenza Virus Activity (GISRS).

## References

1. McCauley J.W., Hongo S., Kaverin N.V., Kochs G., Lamb R.A., Matrosovich M.N., Perez D.R., Palese P., Presti R.M., Rimstad E., Smith G.J.D. Family *Orthomyxoviridae*. In: Andrew M.Q. King, Elliot Lefkowitz, Michael J. Adams, Eric B. Carstens, editors. *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. Ninth report of the International Committee of Taxonomy of Viruses. San Diego: Elsevier/Academic Press; 2012. P. 749–61.
2. Lvov D.K., Schelkanov M.Y., Alkhovsky S.V., Deryabin P.G. Zoonotic viruses of Northern Eurasia. *Taxonomy and ecology*. London: Academic Press, 2015. 452 p.
3. Influenza (Seasonal). (Cited 10 July 2019) [Internet]. Available from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)).
4. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, Dawood F.S., Jain S., Finelli L., Shaw M.W., Lindstrom S., Garten R.J., Gubareva L.V., Xu X., Bridges C.B., Uyeki T.M. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360(25):2605–15. DOI: 10.1056/NEJMoa0903810.
5. Stevens J., Blixt O., Glaser L., Taubenberger J.K., Palese P., Paulson J.C., Wilson I.A. Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals differ-

(Cited 17 Sept 2019). [Internet]. Available from: [http://www.who.int/influenza/surveillance\\_monitoring/updates/en](http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/en).

22. WHO Virological Research Data (FluNet). (Cited 17 Sept 2019) [Internet]. Available from: [http://www.who.int/influenza/gisrs\\_laboratory/updates/summaryreport/en](http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/updates/summaryreport/en).

23. Website of the WHO European Bureau. (Cited 07 July 2019). [Internet]. Available from: <http://www.flunews europe.org/>.

24. Website of the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Atlanta USA. (Cited 15 Sept 2019). [Internet]. Available from: <http://www.cdc.gov/flu/weekly/index.htm>.

25. Weekly Epidemiological Record. 2019, 22 March. Vol. 94. P. 141–60. (Cited 14 May 2019). [Internet]. Available from: <https://www.who.int/wer/2019/wer9412/en/>.

26. Human infection with avian influenza A(H5) viruses. WHO Western Pacific Region. Avian influenza weekly update number 696. 04 July 2019. (Cited 08 Sept 2019). Available from: <https://iris.wpro.who.int/bitstream/handle/10665.1/14328/AI-20190704.pdf> 04.07.2019.

27. Data on cases of human infection with avian influenza viruses. (Cited 04 July 2019) [Internet]. Available from: [http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/en](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/en).

28. Cases of human infection with avian influenza A virus (H7N9). (Cited 15 Aug 2019) [Internet]. Available from: [http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/influenza\\_h7n9/en/index.html](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/influenza_h7n9/en/index.html).

29. Human infection with avian influenza A(H7N4) virus – China. (Cited 08 Sept 2019). [Internet]. Available from <https://www.who.int/csr/don/22-february-2018-ah7n4-china/en/>.

#### Authors:

*L'vov D.K., Burtseva E.I., Mukasheva E.A., Kolobukhina L.V., Bogdanova V.S., Feodoritova E.L., Trushakova S.V., Breslav N.V., Kirillov I.M., Merkulova L.N., Fedyakina I.T., Krasnoslobodtsev K.G., Voronina O.L., Aksenova E.I., Kunda M.S., Ryzhova N.N., Alkhovskiy S.V., Kisteneva L.B., Rosatkevich A.G.* D.I. Ivanovsky Institute of Virology, FSBI "National Research Center of Microbiology and Epidemiology Named after Honorary Academician N.F. Gamaleya". 18, Gamaleya St., Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: [info@gamaleya.org](mailto:info@gamaleya.org).

*Bovin N.V.* M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Moscow, Russian Federation.

*Vartanyan R.V., Krzhkova I.S., Bazarova M.V., Smetanina S.V.* Clinical Hospital for Infectious Diseases № 1 Moscow, Russian Federation.

#### Об авторах:

*Львов Д.К., Бурцева Е.И., Мукашева Е.А., Колобухина Л.В., Богданова В.С., Феодоритова Е.Л., Трушакова С.В., Бреслав Н.В., Кириллов И.М., Меркулова Л.Н., Федякина И.Т., Краснослободцев К.Г., Воронина О.Л., Аксенова Е.И., Кунда М.С., Рыжова Н.Н., Альховский С.В., Кистенева Л.Б., Росаткевич А.Г.* Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи». Российская Федерация, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18. E-mail: [info@gamaleya.org](mailto:info@gamaleya.org).

*Бовин Н.В.* Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова. Российская Федерация, Москва.

*Вартанян Р.В., Кружкова И.С., Базарова М.В., Сметанина С.В.* Инфекционная клиническая больница № 1. Российская Федерация, Москва.

Поступила 12.08.19.

Отправлена на доработку 22.08.19.

Принята к публ. 26.09.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-75-80

UDC (Universal Decimal Classification) 616.932:579.25

E.V. Monakhova, I.V. Arkhangel'skaya, S.V. Titova, R.V. Pisanov

**MSHA-like pili of non-toxicogenic *Vibrio cholerae* strains**

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

**Abstract. Aim.** In this study, we set out to identify the homologues of genes from the *msh*-cluster in the genomes of non-toxicogenic *V. cholerae*, to perform the bioinformatics analysis of their products, as well as to study the adhesive properties of strains containing altered genes. **Materials and methods.** We analysed 17 clinical strains of non-O1/non-O139 *V. cholerae* and 2 strains of the O1 serogroup isolated from water bodies. Genes belonging to the *msh*-cluster were identified in the whole genomes using the BLASTN 2.2.29 and BioEdit 7.2.5 programs. Gene translation, comparative analysis of their nucleotide sequences and the amino acid sequences of deduced products were performed using the Vector NTI Advance 11 (Invitrogen). **Results and discussion.** In 18 out of the 19 studied genomes we identified gene clusters responsible for production of adhesion pili (*mshH-Q*) represented by diverse alleles, the majority of which differed from the prototype genes of the *msh*-cluster in nucleotide composition but had the same localization and arrangement. Only one strain had a cluster that was close to that of the prototype. A bioinformatics analysis of their deduced products indicated that the amino acid sequence of the major MshA pilus subunit is homologous to the prototype only in a short N-terminal region (1–41) while sharing no similarities with the rest of the sequence. Nevertheless, this protein, similar to VcfA described by Kuroki H. *et al.* (2001) and designated by us as MshA-like, retained a putative pilus domain. A similar pattern was observed in the minor subunits designated as MshC-like. Other minor subunits also retained their characteristic domains. All of the strains agglutinated human erythrocytes (group O) and chicken erythrocytes, and in isolates harboring modified *mshA-like* and *mshC-like* genes the reaction was not inhibited by mannose. Since most of the studied strains were isolated from hospitalized patients, it is possible that in non-toxicogenic *V. cholerae* lacking the pathogenicity island VPI, MSHA-like pili may serve as a colonization factor of the human intestine, in contrast to VPI-positive strains. The obtained information provides a basis for experimental verification of this assumption.

**Key words:** *Vibrio cholerae*, MSHA pili, bioinformatics analysis, adhesion, haemagglutination.

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

**Corresponding author:** Elena V. Monakhova, e-mail: monakhova\_ev@antiplague.ru.

**Citation:** Monakhova E.V., Arkhangel'skaya I.V., Titova S.V., Pisanov R.V. MSHA-like pili of non-toxicogenic *Vibrio cholerae* strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections], 2019; 3:75–80. (In English). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-75-80

Received 19.07.19. Revised 02.08.19. Accepted 06.08.19.

Monakhova E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9216-7777>

This article was translated by Natalia Popova Laboratory of Scientific Translation.

Е.В. Монахова, И.В. Архангельская, С.В. Титова, Р.В. Писанов

**MSHA-ПОДОБНЫЕ ПИЛИ НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ**

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

**Цель** исследования состояла в идентификации гомологов генов *msh*-кластера в геномах нетоксигенных холерных вибрионов, биоинформационном анализе их продуктов и изучении адгезивных свойств штаммов, содержащих измененные гены. **Материалы и методы.** В работе использовано 17 клинических штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 и 2 штамма O1 серогруппы, выделенные из водоемов. Гены *msh*-кластера идентифицировали в полных геномах с помощью программ BLASTN 2.2.29 и BioEdit 7.2.5; трансляцию генов, сравнительный анализ их нуклеотидных, аминокислотных последовательностей продуктов трансляции осуществляли с использованием пакета программ Vector NTI Advance 11 (Invitrogen). **Результаты и обсуждение.** В геномах 18 из 19 исследуемых штаммов идентифицированы кластеры генов, ответственных за продукцию пилей адгезии (*mshH-Q*), представленные разными аллелями, большинство из которых отличались по нуклеотидному составу от прототипных генов *msh*-кластера, однако имели такую же локализацию и порядок расположения. Лишь у одного штамма кластер был близок таковому у прототипа. Биоинформационный анализ продуктов их трансляции показал, что аминокислотная последовательность мажорной субъединицы пилей MshA лишь в небольшом N-концевом участке (1–41) гомологична таковой прототипа, тогда как остальная часть не имеет с ней ничего общего. Этот белок, сходный с описанным Н. Kuroki *et al.* (2001) VcfA и обозначенный нами как MshA-like, тем не менее сохранил потенциальный домен пилина. Аналогичная картина наблюдалась и в минорных субъединицах, обозначенных как MshC-like. Другие минорные субъединицы также сохранили характерные для них домены. Все штаммы агглютинировали эритроциты человека I группы крови и куриные эритроциты, причем у содержащих измененные гены *mshA-like* и *mshC-like* реакция не ингибировалась маннозой. Поскольку большинство изученных штаммов выделено от госпитализированных клинических больных, не исключено, что у нетоксигенных холерных вибрионов, лишенных острова патогенности VPI, MSHA-подобные пили могут служить фактором колонизации кишечника человека, в отличие от VPI-позитивных. Полученные данные создают основу для экспериментальной проверки этого предположения.

**Ключевые слова:** *Vibrio cholerae*, пили MSHA, биоинформационный анализ, адгезия, геммагглютинация.

Корреспондирующий автор: Монахова Елена Владимировна, e-mail: monakhova\_ev@antiplague.ru.  
Для цитирования: Монахова Е.В., Архангельская И.В., Титова С.В., Писанов Р.В. [MSHA-подобные пили нетоксигенных штаммов холерных вибрионов]. Проблемы особо опасных инфекций. 2019; 3:75–80. (Англ. яз.). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-75-80

Оригинал статьи на русском языке размещен на сайте журнала (вып. 3, 2019).

Mannose-sensitive haemagglutinin (MSHA) pili are mainly associated with the persistence of *V. cholerae* in water bodies due to the formation of biofilms on abiotic and biotic surfaces and providing resistance towards grazing by aquatic invertebrate predators [1–3]. The role of MSHA pili in human intestinal colonisation is considered insignificant [4–6], although contradicting opinions were expressed [7, 8]. The *msh*-cluster includes 17 genes organised in two operons: *mshHIJKLMNIJ* encoding secretory proteins and *mshBACDOPQ* responsible for production of the structural components (subunits) of MSHA pili [9].

It is known that the expression of adhesion pili by toxigenic strains depends on their habitats. In the intestine the production of toxin-coregulated pili (TCP) increases, and the synthesis of MSHA is repressed; whereas the opposite process is observed in water [10]. However, the fact that most of the non-toxigenic strains lack TCP and Cep (pilin encoded by a gene of CTX or preCTX prophages) suggests that other factors – possibly, including MSHA – are responsible for their adhesive properties. As far back as in 1990s, a group of Japanese researchers [11–13] studied and described pili produced by three strains of non-O1/non-O139 *V. cholerae* serogroups (NAGs), which are similar, although not identical, to MSHA. These pili not only agglutinated chicken, human and rabbit erythrocytes but also adhered to rabbit intestinal cells. The sequences of N-terminal amino acid residues (aa) in the pilins of two strains were found to be identical and one was very similar to that of MshA. Nevertheless, all three proteins differed in molecular weights. Later on, H. Kuroki *et al.* [14] sequenced the genes of two of these three strains and designated them as *vcfA* (*V. cholerae* flexible pili). Their products consisted of 161 and 162 aa, of which only the N-terminal aa (1–41) were homologous to those of MshA. The genes themselves were flanked by homologues of *mshB* and *mshC*, as in the *msh*-cluster of O1/O139 *V. cholerae* serogroups. The PCR revealed a wide distribution of *vcfA* among NAGs. Subsequently, the authors sequenced several more structural genes flanking *vcfA* (*mshB*, *mshCDOP*) in the genome of one of these strains and found that they were 78–89 % homologous to prototypes [15]. The *mshQ* (*vcfQ*) gene was 651 bp longer than the prototype, its product (necessary for the assembly of pili) was highly homologous to the prototype protein with the exception of 270 N-terminal aa [16]. However, the entire sequence of the *msh*-cluster was not determined, only fragments of *mshBACDOPQ* operon (AB049152, AB050252, AB064660) are presented in the NCBI.

Earlier we reported the identification of *mshA*- and *mshC*-like genes in two strains of the O1 serogroup isolated from water bodies, which exhibited a high rate of biofilm formation on abiotic surfaces under experimental conditions [17]. VPI-negative clinical NAG strains which

caused diseases in humans are also of great interest. In most of them PCR revealed no *mshA* genes [18]. It remains unknown due to what factors both groups can exhibit adhesive properties in different ecological niches.

In this study, we set out to identify the homologues of genes from the *msh*-cluster in the genomes of non-toxigenic *V. cholerae*, to perform the bioinformatics analysis of their products, as well as to study the adhesive properties of strains containing altered genes.

## Materials and methods

In this study we analysed 17 clinical NAG strains and 2 strains of the O1 serogroup isolated from water bodies. Their origin is shown in Figure 1 in the Results and Discussion section.

Using the BLASTN 2.2.29 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) and BioEdit 7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit>) programs, the genes of the *msh*-cluster were identified in the whole genomes sequenced by us on the MiSeq platform (Illumina) in accordance with the attached protocol. Gene translation, comparative analysis of their nucleotide sequences and amino acid sequences of deduced products were carried out by means of the Vector NTI Advance 11 (Invitrogen). The corresponding sequences of the reference *V. cholerae* strain N16061 (AE004128) served as prototypes. In order to determine the presence and localization of active domains in proteins, as well as to identify their homologues in strains from other world regions, we performed Blastp analysis (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). The analysis also included products of the above-mentioned *vcfA* genes found in the NCBI [15, 16].

The haemagglutination test was carried out as described in [11]. The cells of *V. cholerae* precipitated by centrifugation from one-day-old cultures grown in Martin's broth (pH 7.2) were washed three times with saline and diluted to an initial concentration of 10<sup>9</sup> microbial cells per millilitre. The suspensions were titrated in a 96-well microplates in a volume of 25 µl, followed by the addition of 1 % suspension of human (blood group O) or chicken erythrocytes in the same volume. Preliminary results were accounted after one-hour incubation at room temperature. The final results were considered after 2 hours at 4 °C. Reaction inhibition was studied by adding D-mannose at a final concentration of 1 %.

## Results and discussion

As noted above, the results for 18 out of the 19 strains selected for the PCR study using primers for detection of the prototype gene for the major pilus subunit *mshA*, were negative [17, 18]. However, in their whole-genome sequences genes were revealed with 5'-terminal regions (1–122 bp) highly homologous to the prototype

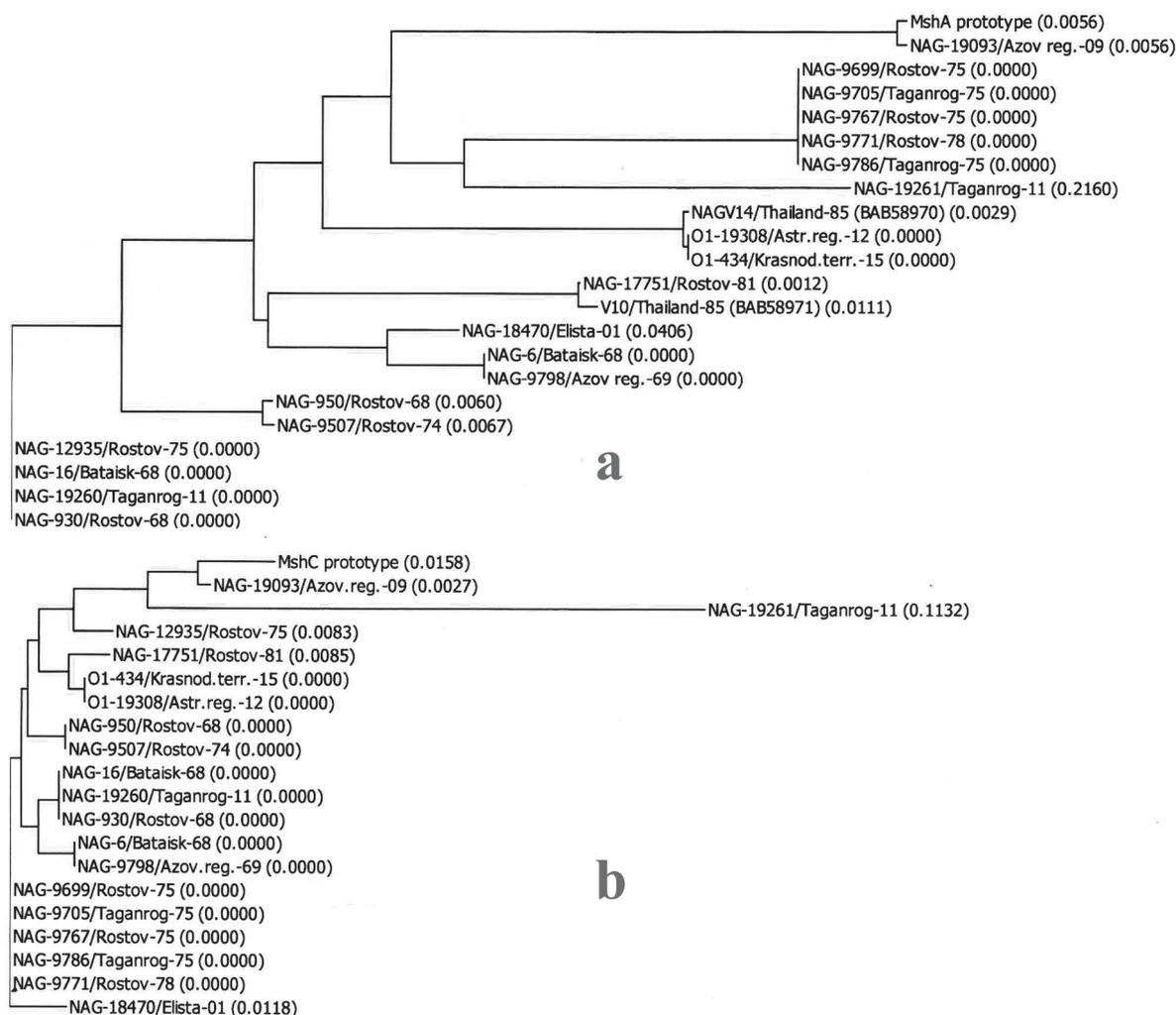


Fig. 1. Dendrograms constructed by definition of the AlignX analysis of MshA-like (a) and MshC-like (b) proteins of non-toxicogenic *V. cholerae* strains

(96–100 %). The remaining sequences shared no similarities with the prototype, and the genes varied in length (from 447 to 489 bp). Only in strain 19093 (PCR positive), the *mshA* gene had 99 % identity to the prototype and the same length (537 bp). Other genes from *msh*-clusters, encoding minor pilus subunits (*mshB*, *C*, *D*, *O*, *P*) and the protein necessary for their assembly (*mshQ*), also largely differed in length and nucleotide composition. The *mshC* genes, designated as *mshC-like*, showed the most pronounced difference from the prototype (strain 19261 – 498 bp; the rest – 513 bp), with only the gene in strain 19093 having a standard length of 489 bp. However, the transcription of genes by means of Vector NTI revealed that many nucleotide substitutions were silent mutations; therefore, the amino acid sequences of their products were used for further analysis.

According to the AlignX analysis, which also included two of the above-mentioned VcfA proteins, the products of *mshA*-like genes ranging in length from 148 to 162 aa were represented by 11 variants. One of the variants (strain NAG-17751) was close to the VcfA of strain V10 (BAB58971), while another (two strains of the O1 serogroup) was similar to the VcfA of NAGV14

[14], with both being significantly different from the rest (Fig. 1, a). N-termini (41 aa) were completely homologous to each other, the prototype and MshA of the strain 19093, which is consistent with the data presented by the above-mentioned authors. The MshC-like (Fig. 1, b), MshB and MshO proteins exhibited a lower degree of variability as compared to MshD, MshP and MshQ, which manifested itself in smaller distances between dendrogram branches. The Table shows protein variants – the products of different alleles of genes belonging to operon *mshBACDOPQ* in the studied strains. Even such a restricted set of strains provides insight into the mosaic structure of this cluster. For example, in strains 6 and 9798, MshB is identical to the proteins of 16, 930, 10260, 9507, 17751, 18470, 19093, 19308 and 434; and their MshD and MshO are identical to those of 12935. Strain 12935 has the same MshA as in strains 16, 930 and 19260; whereas in strain 19093, MshO is identical to those of strains 9767, 9699, 9786 and 9705. In addition, for some of the variants presented in the Table (in particular MshB, MshA-like, MshC-like), full homologues belonging to strains from other world regions were found in the NCBI.

Variants of deduced products of *mshBACDOPQ* operon genes of *Vibrio cholerae* strains

Strains	Structural units of Msh							Truncated biogenesis genes	HA titre
	B	A	C	D	O	P	Q		
O1 prototype	196	178	162	203	256	143	1252		1/32
NAG 6		148	170			141	1250	<i>mshL</i>	1/64
NAG 9798		148	170			141	1250		1/32
NAG 16		156	170	202				<i>mshF</i>	1/64
NAG 930		156	170	202					1/128
NAG 19260		156	170	202					1/128
NAG 19261		161	165			141	1245		1/32
NAG 950		157	170			141	1218	<i>mshH</i>	1/64
NAG 9507		157	170		259	nd	nd	<i>mshH</i>	1/64
NAG 12935		156	170			141	nd	<i>mshI</i>	1/32
NAG 17751		162	170			141	1240		1/32
NAG 9767		162	170			140	1332		1/128
NAG 9699		162	170			140	1332		1/128
NAG 9786		162	170			140	1332		1/128
NAG 9705		162	170			140	1332		1/128
NAG 9771		162	170			140	1328		1/32
NAG 18470		148	170	202		141		<i>mshN</i>	1.32
NAG 19093						140	1328		1/64
O1 434 (18787)		161	170	202					1/64
O 19308		161	170	202					1/64
NAGV14	nd	161	nd	202		140	1328*		nd

Notes:

Protein variants in each column are marked in different colours, with identical variants sharing the same colours and non-identical variants being marked by different ones. Numerals indicate the numbers of aa in proteins differing in length from the prototypes. In the first column, the strains-representatives of different clonal complexes are highlighted [17, 18]. HA – hemagglutination, nd – not determined.

\*Deduced product of the ORF revealed by us in the partial sequence of *vcfQ* (AB064660).

The same putative pilin domain as in the prototype and in exactly the same localization (4–45) was identified in all MshA-like proteins by the Blastp program, which is not surprising as it is located in the N-terminal part of the molecule. A similar situation was observed in MshC-like proteins, some of which contained the same domain PRK10574 (12–33 or 10–44), while the other part contained PRK10557 (12–97), as opposed to the prototype (6–89). Furthermore, the same domains as those of prototypes were identified in MshD and MshP, while MshB and MshO (similar to prototypes) revealed no potential domains (however, as well as in prototypes). A lectin\_VcfQ domain was found in MshQ.

T. Miyazato *et al.* [16] previously reported that the *vcfQ* gene in strain NAGV14 (4410 bp) exceeds *mshQ* in length by 651 bp, with an extra fragment extending from the 5'-terminus. This fragment was characterised by a reduced GC content, which might indicate its foreign origin. However, the authors deposited an incomplete nucleotide sequence of this gene (266–4410 bp, AB064660) in the NCBI in which we found two open reading frames (ORFs) – 3660 and 3990 bp in length. The latter was similar in size to the *mshQ* of strain 19093 (3887 bp). We included the deduced product of this ORF into the AlignX analysis, which revealed 99.1 % similarity and 98.7 % identity to these proteins. They also shared the lectin\_VcfQ domain.

The presence of putative domains in structural subunits does not necessarily mean that the pili assembled of them exhibit sufficient adhesive properties; earlier they were confirmed only for three strains [11–14]. Therefore, we determined the ability of the 19 studied cultures to

agglutinate human (blood group O) and chicken erythrocytes. The cells of all strains agglutinated erythrocytes of both species in dilutions of up to 1/32 – 1/128 ( $3.12 \cdot 10^8$ – $7.8 \cdot 10^7$  microbial cells per millilitre). Additionally, the reaction was inhibited by mannose only in strain 19093 possessing genes *mshA* and *mshC*, which are close to the prototypes, with no inhibition occurring in the other strains having altered *mshA*-like and *mshC*-like genes. This is consistent with data presented by N. Nakasone *et al.* [11], who demonstrated that the pili of NAG strains were not sensitive to mannose. Figure 2 shows chicken erythrocyte agglutination by several strains.

The above-mentioned authors [11, 14–16] characterised the genes of operon *mshBACDOPQ* for one NAG strain and proposed to designate this locus as VCF. We succeeded to assemble complete sequences of *msh*-clusters for most of the studied strains, including operon *mshHIJKLMNIJ* responsible for the secretion of structural components and the assembly of pili. It was established that these clusters are localized between the same genes as in the prototype (VC0397 and VC0415) and include all their genes (*mshH-Q*), although for the most part they differ significantly from the standard ones in length and nucleotide composition. Taking into account the common structure and localization of these clusters, we considered the designation proposed by the aforementioned authors (locus VCF) to be irrational. In order to avoid confusion in the course of analysis, we propose to keep the name “*msh*-cluster” for them.

When analysing *mshHIJKLMNIJ* operons, we noticed that one of the genes in some strains was truncated – *mshH*, *mshI*, *mshL*, *mshN* or *mshF* (see Table), which did

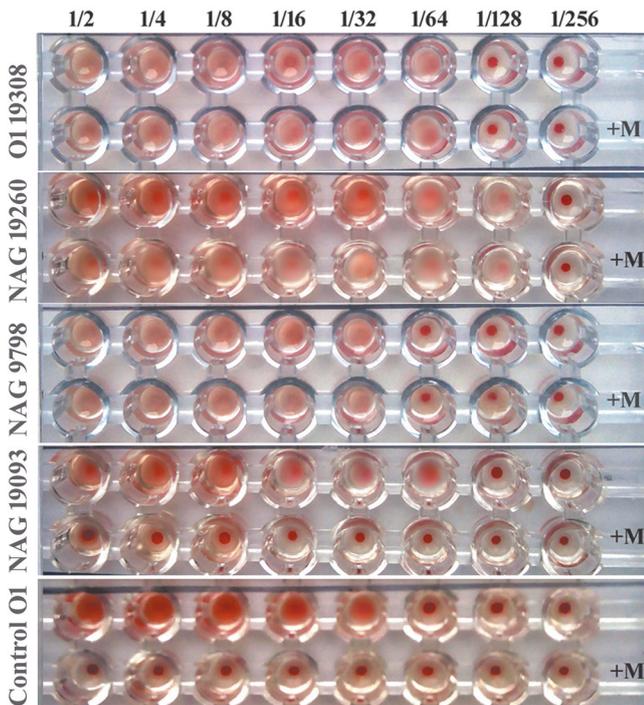


Fig. 2. Agglutination of chicken erythrocytes by the cells of *V. cholerae*. The initial concentration – 10 billion microbial cells per millilitre, + M – reaction with the addition of mannose

not affect significantly their haemagglutinating activity, although occasionally resulting in a slight decrease in titres (see Table). MshH is known not to be involved in the pilus biogenesis; however, its gene contains the promoter of the entire operon [9, 19]. We additionally studied the *mshI* promoter region against that of the reference strain [9]. In all strains, including those containing truncated *mshH*, the *mshI* promoter was 100 % homologous to the prototype. In the experiments of J.W. Marsh *et al.* [20], the disruption of the *mshL* gene resulted in the loss of the haemagglutinating activity of the mutant. However, the truncated MshL protein of strain 6 retained active domains of secretin. The role of other proteins in the pilus biogenesis remains almost unknown. No active domains were found in MshF, thus making it impossible to assess the significance of gene truncation in strain 16. The truncated MshI in strain 12935 lost its sole domain PilN found in proteins responsible for the pilus assembly, whereas the truncated MshN in strain 18470 lost the prototype domains and acquired new ones, including TadD, which is also associated with pilus assembly. Nevertheless, the above-mentioned strains agglutinated erythrocytes to a various degree. These issues require further research that was not conducted since 2009. At the moment, we can only speculate that the products of 10 genes from the biogenesis operon are probably interchangeable so that damage to one of them can be compensated by the activity of others, which allows to maintain the ability of MSHA production.

It is known that the expression of *msh*-operon occurs constitutively in water; however, it becomes repressed upon entering the intestines. The ToxT regulator capable of binding to three promoters within the locus

(*mshH*, *mshI*, *mshB*) plays a key role in this process. Concurrently it activates the expression of *tcp* genes [19, 21]. Besides the repression at the transcriptional level, MSHA production is repressed at the post-translational level due to the enzymatic activity of the prepilin peptidase TcpJ which degrades the primary structural pilin of MSHA. [10]. The genes of both proteins, *toxT* and *tcpJ*, are part of the VPI. All the experimental data were obtained using VPI-positive strains, with only *tcpA* deletion mutants being constructed which preserved all the other genes of the island [4, 6]. This suggests that the initially VPI-negative strains can constitutively express MSHA also *in vivo*.

On the other hand, the repression of MSHA *in vivo* implies that these pili interact with the secretory immunoglobulin S-IgA of the host, which prevents both the penetration of vibrios through the intestinal mucus and adhesion to epithelial cells [21]. That's why these pili were referred to as 'an anticolonisation factor' [19]. S-IgA is a glycoprotein containing mannose residues that bind to MSHA; this reaction is mannose-sensitive [21]. Thus, these pili are most likely to be produced in VPI-negative strains containing the prototype *msh*-cluster; however, being bound to S-IgA, they cannot promote adherence to the intestinal mucosa. Conversely, MSHA-like pili are not sensitive to mannose, which suggests that the acquisition and preservation of their determinants in the genome may be considered as one of the ways to 'trick' the non-specific immunity of a macroorganism and ensure the pathogen adhesion. Clearly, this hypothesis requires experimental verification. Interestingly, one of our strains (17751) has a preCTX prophage and a significantly altered *tcpA* gene. We failed to find the *toxT* gene in its whole-genome sequence; however, a 94 % homologue of *tcpJ* was found. *In vitro* the strain produced MSHA-like pili, but their production or activity is probably blocked *in vivo*, with TCP or Cep (encoded by a gene of preCTX) serving as an adhesion factor. Concerning strains lacking *tcp* and *cep* genes, further studies will show whether their MSHA-like pili can serve as a colonisation factor of the human intestine.

The nucleotide sequences of *msh*-clusters from the studied strains were entered in the NCBI GenBank database under the accession numbers MN172245-MN172261, MG551945 and 551946.

### References

1. Chiavelli D.A., Marsh J.W., Taylor R.K. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67(7):3220–5.
2. Wang J., Yan M., Gao H., Lu X., Kan B. *Vibrio cholerae* colonization of soft-shelled turtles. *Appl. Environ. Microbiol.* 2017; 83(14):e00713-17. DOI: 10.1128/AEM.00713-17.
3. List C., Grutsch A., Radler C., Cakar F., Zingl F.G., Schild-Prüfert K., Schild S. Genes activated by *Vibrio cholerae* upon exposure to *Caenorhabditis elegans* reveal the mannose-sensitive hemagglutinin to be essential for colonization. *mSphere* 2018; 3(3):e00238-18. DOI: 10.1128/mSphereDirect.00238-18.
4. Attridge S.R., Manning P.A., Holmgren J., Jonson G. Relative significance of mannose-sensitive hemagglutinin and toxin-coregulated pili in colonization of infant mice by *Vibrio cholerae* El Tor. *Infect. Immun.* 1996; 64(8):3369–73.
5. Thelin K.H., Taylor R.K. Toxin-coregulated pilus, but not mannose-sensitive hemagglutinin, is required for colonization by

- Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype and O139 strains. *Infect. Immun.* 1996; 64(7):2853–6.
6. Tacket C.O., Taylor R.K., Losonsky G., Lim Y., Nataro J.P., Kaper J.B., Levine M.M. Investigation of the roles of toxin-coregulated pili and mannose-sensitive hemagglutinin pili in the pathogenesis of *Vibrio cholerae* O139 infection. *Infect. Immun.* 1998; 66(2):692–5.
  7. Dalsgaard A., Albert M.J., Taylor D.N., Shimada T., Meza R., Serichantalergs O., Echeverria P. Characterization of *Vibrio cholerae* non-O1 serogroups obtained from an outbreak of diarrhea in Lima, Peru. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33(10):2715–22.
  8. Eroshenko G.A., Osin A.V., Shchelkanova E.Yu., Smirnova N.I. [A comparative analysis of genomes of virulent and avirulent strains of *Vibrio cholerae* O139]. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology.* 2004; (2):11–6.
  9. Marsh J.W., Taylor R.K. Genetic and transcriptional analyses of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin type 4 pilus gene locus. *J. Bacteriol.* 1999; 18(4):1110–7.
  10. Hsiao A., Toscano K., Zhu J. Post-transcriptional cross-talk between pro- and anti-colonization pili biosynthesis systems in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 2008; 67(4):849–60. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.06091.x
  11. Nakasone N., Iwanaga M. Pili of *Vibrio cholerae* non-O1. *Infect. Immun.* 1990; 58(6):1640–6.
  12. Yamashiro T., Nakasone N., Iwanaga M. Purification and characterization of pili of a *Vibrio cholerae* non-O1 strain. *Infect. Immun.* 1993; 61(12):5398–400.
  13. Yamashiro T., Iwanaga M. Purification and characterization of a pilus of a *Vibrio cholerae* strain: a possible colonization factor. *Infect. Immun.* 1996; 64(12):5233–8.
  14. Kuroki H., Toma C., Nakasone N., Yamashiro T., Iwanaga M. Gene analysis of *Vibrio cholerae* NAGV14 pilus and its distribution. *Microbiol. Immunol.* 2001; 45(6):417–24. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2001.tb02640.x
  15. Toma C., Kuroki H., Nakasone N., Ehara M., Iwanaga M. Minor pilin subunits are conserved in *Vibrio cholerae* type IV pili. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2002; 33(1):35–40.
  16. Miyazato T., Toma C., Nakasone N., Yamamoto K., Iwanaga M. Molecular analysis of VcfQ protein involved in *Vibrio cholerae* type IV pilus biogenesis. *J. Med. Microbiol.* 2003; 52(Pt 4):283–8. DOI: 10.1099/jmm.0.04967-0.
  17. Titova S.V., Monakhova E.V., Alekseeva L.P., Pisanov R.V. [Molecular genetic basis of biofilm formation as a component of *Vibrio cholerae* persistence in the water reservoirs of Russian Federation]. *Ecological Genetics* 2018; 16(4):23–32. DOI: 10.17816/ecogen16423-32.
  18. Arkhangel'skaya I.V., Nepomnyaschaya N.B., Monakhova E.V., Vodopyanov A.S., Vodopyanov S.O., Kruglikov V.D. [Genetic diversity of the population of *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 circulating in Rostov region]. *Public Health and Life Environment* 2015; 3(264):25–8.
  19. Hsiao A., Xu X., Kan B., Kulkarni R. V., Zhu J. Direct regulation by the *Vibrio cholerae* regulator ToxT to modulate colonization and anticolonization pilus expression. *Infect. Immun.* 2009; 77(4):1383–8. DOI: 10.1128/iai.01156-08.
  20. Marsh J.W., Sun D., Taylor R.K. Physical linkage of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin secretory and structural subunit gene loci: identification of the *mshG* coding sequence. *Infect. Immun.* 1996; 64(2):460–5.
  21. Hsiao A., Liu Z., Joelsson A., Zhu J. *Vibrio cholerae* virulence regulator-coordinated evasion of host immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006(39); 103:14542–7. DOI: 10.1073/pnas.0604650103.

**Authors:**

Monakhova E.V., Arkhangel'skaya I.V., Titova S.V., Pisanov R.V. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aanet.ru.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-81-86

УДК 616.98:578.833.25

А.Г. Полтавченко, В.А. Терновой, А.В. Ерш, П.В. Филатов, Р.Б. Баяндин, А.О. Семенцова,  
Л.И. Еремеева, В.Б. Локтев, А.П. Агафонов

## ВЫЯВЛЕНИЕ МАРКЕРОВ ЛИХОРАДКИ ДЕНГЕ МЕТОДОМ ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗА

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

**Цель.** Разработка диагностического набора для выявления маркеров лихорадки денге на всех стадиях заболевания. **Материалы и методы.** В сыворотках крови от пациентов с подозрением на лихорадку денге проводили выявление антигена NS1 и специфических IgM и IgG методом иммуно-хроматографии, методом дот-иммуноанализа, иммуноферментного анализа, с использованием коммерческих тест-систем, а также экспериментальным набором «Денге-спектр». **Результаты и обсуждение.** Разработан диагностический набор для выявления маркеров лихорадки денге, основанный на механизме одновременного дифференциального выявления белка NS1 возбудителя и антител класса IgM и класса IgG с образованием специфических комплексов между маркерами из исследуемого образца и известными иммунореагентами захвата, в определенном порядке дискретно зафиксированными на плотной подложке. Установлено, что эффективное выявление специфических IgG и IgM к вирусу денге может быть осуществлено по схеме, при которой захват IgG производится на суммарном антигене вируса с детекцией с помощью меченных антител против IgG человека, а выявление IgM осуществляется захватом на антителах против IgM человека с детекцией меченым суммарным вирусным антигеном. Выявление белка NS1 вируса денге может быть выполнено с использованием подложки с иммобилизованными моноклональными антителами к NS1 и иммунозола золота, связанного с антителами к NS1. При такой постановке дот-анализа лимит определения рекомбинантного аналога белка NS1 составил 100 нг/мл. Сравнительные испытания набора на панели клинических образцов показали хорошее совпадение результатов с данными, полученными с использованием импортных коммерческих тестов. Разработанный набор может найти применение для скрининга клинических образцов, как в лабораторных, так и в полевых условиях.

**Ключевые слова:** вирус денге, дот-иммуноанализ, иммуноферментный анализ.

*Корреспондирующий автор:* Терновой Владимир Александрович, e-mail: tern@vector.nsc.ru.

*Для цитирования:* Полтавченко А.Г., Терновой В.А., Ерш А.В., Филатов П.В., Баяндин Р.Б., Семенцова А.О., Еремеева Л.И., Локтев В.Б., Агафонов А.П. Выявление маркеров лихорадки денге методом ДОТ-иммуноанализа. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 3:81–86. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-81-86

A.G. Poltavchenko, V.A. Ternovoi, A.V. Eorsh, P.V. Filatov, R.B. Bayandin, A.O. Sementsova,  
L.I. Eremeeva, V.B. Loktev, A.P. Agafonov

## Identification of Dengue Fever Markers by Dot Immunoassay

State Scientific Centre of Virology and Biotechnology "Vector", Kol'tsovo, Russian Federation

**Abstract. The aim.** Development of diagnostic kit for identifying markers of dengue fever at all stages of the disease. **Materials and methods.** In blood serum from patients with suspected dengue fever, NS1 antigen and specific IgM and IgG were detected by immune chromatography, dot immunoassay, enzyme-linked immunosorbent assay, using commercial test systems, as well as the "Dengue Spectrum" experimental kit. **Results and discussion.** A diagnostic kit has been developed for the detection of dengue fever markers, based on the mechanism of simultaneous differential detection of the agent NS1 protein and IgM and IgG class antibodies with the formation of specific complexes between markers from the test sample and known capture immune reagents, in a certain order, discretely fixed on a dense substrate. It was found that the effective detection of specific IgG and IgM to dengue virus can be carried out according to the scheme in which IgG is captured on the total antigen of the virus with detection using labeled anti-human IgG antibodies, and IgM is detected by capture on anti-human IgM antibodies with detection using total viral antigen. Detection of dengue virus NS1 protein can be performed using a substrate with immobilized monoclonal antibodies to NS1 and a gold immune sol bound to antibodies against NS1. This protocol of the dot analysis provides the limit for determining the recombinant analogue of the NS1 protein equal to 100 ng/ml. Comparative testing of the kit against the panel of clinical samples showed a good agreement between the results and the data obtained using imported commercial tests. The developed kit can be used for screening clinical samples, both in laboratory and in the field.

**Key words:** dengue virus, dot immunoassay, enzyme-linked immunosorbent assay.

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

*Corresponding author:* Vladimir A. Ternovoi, e-mail: tern@vector.nsc.ru.

*Citation:* Poltavchenko A.G., Ternovoi V.A., Eorsh A.V., Filatov P.V., Bayandin R.B., Sementsova A.O., Eremeeva L.I., Loktev V.B., Agafonov A.P. Identification of Dengue Fever Markers by Dot Immunoassay. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 3:81–86. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-81-86

*Received* 17.09.19. *Revised* 20.09.19. *Accepted* 23.09.19.

Ternovoi V.A., <http://orcid.org/0000-0003-1275-171X>

Bayandin R.B., <https://orcid.org/0000-0002-6460-0828>

Sementsova A.O., <https://orcid.org/0000-0002-7188-5948>

Eremeeva L.I., <http://orcid.org/0000-0003-1675-1397>

Loktev V.B., <http://orcid.org/0000-0002-0229-321X>

Agafonov A.P., <https://orcid.org/0000-0003-2577-0434>

В настоящее время, в связи с ростом объема международного туризма и участвовавшими посещениями гражданами России стран, расположенных в тропических и субтропических поясах земного шара, все чаще встречаются завозные случаи заболеваний, эндемичных для этих регионов. Одно из первых мест среди наиболее часто регистрируемых завозных заболеваний занимает лихорадка денге (ЛД) – острое вирусное заболевание, возбудителем которого является вирус семейства *Togaviridae* рода *Flavivirus*.

Денге является наиболее быстро распространяющимся переносимым комарами вирусным заболеванием в мире. За последние 50 лет заболеваемость увеличилась в 30 раз с ростом географической экспансии в новые страны, а в настоящее десятилетие – из городских биотопов в сельские [1, 2]. Ежегодно регистрируется более 50 млн случаев заражения лихорадкой денге, 2,5 млрд человек живут в эндемичных по денге странах [3]. Особое значение имеет резолюция WHA58.3 Всемирной ассамблеи здравоохранения о пересмотре Международных медико-санитарных правил, в которых предусмотрено включение лихорадки денге в перечень заболеваний, способных вызвать чрезвычайные ситуации международного значения с последствиями для безопасности здоровья населения [4].

Источником инфекции служат больной человек, обезьяны и, возможно, летучие мыши, а человеку инфекция передается комарами *Aedes aegypti* [5]. Лихорадка денге распространена в тропических и субтропических районах и встречается в странах Южной и Юго-Восточной Азии, Океании, Африки и бассейна Карибского моря. Рост числа российских граждан, посещающих эти страны, увеличивает риск появления завозных случаев заболевания лихорадкой денге на территории Российской Федерации [6–10]. Более того, комары *A. aegypti*, *A. albopictus* и *A. koreicus*, являющиеся основными векторами для вируса денге, встречаются в регионах России, примыкающих к Черному морю [6]. Наличие комаров-переносчиков может способствовать формированию локальных природных очагов лихорадки денге в южных регионах РФ.

Вирус денге (Dengue virus – DENV) содержит геномную РНК положительной полярности, размером 11 тыс. пар нуклеотидов (п.н.), которая кодирует один полипротеин, расщепляющийся посттрансляционно на три структурных белка (NP, гликопротеин и рgM) и семь неструктурных (NS) белков (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B и NS5) [11, 12]. Структурные белки определяют вирусные серотипы и обеспечивают прикрепление и проникновение вируса в клетку [11]. Неструктурные белки необходимы для репликации вируса DENV. DENV заражают иммунные и дендритные клетки, а также эндотелиальные клетки человека [13–15].

Заболевание протекает с общими для многих инфекционных заболеваний симптомами, поэтому для постановки диагноза необходимы лабораторные

исследования. Серологическая диагностика, основанная на выявлении антигенов и специфических иммуноглобулинов (маркеров) в сыворотке крови больных позволяет наиболее оперативно установить диагноз и дифференцировать первичную и повторную инфекцию. Для ЛД, как и для многих других инфекционных заболеваний, характерны периоды в течение которых серологические маркеры заболевания сменяют друг друга. И если белки NS1 и IgM указывают на острое заболевание, то наличие IgG свидетельствует о поздней стадии заболевания, повторном заражении или о ранее перенесенной инфекции.

В России зарегистрированы иммуноферментные системы зарубежного производства: «Anti-Dengue virus ELISA (IgM)», «Anti-Dengue virus ELISA (IgG)» фирмы Euroimmun (Германия) [16] и «Dengue ELISA G/IgM» производства Vircell Microbiologists (Испания) для ИФА одиночных маркеров ЛД. Иммунохроматографические (lateral-flow immunoassay) системы «Dengue NS1Ag + Ab Combo system» и «Dengue NS1», «Dengue IgM», «Dengue IgG» (Республика Корея), ProDetect™ Dengue IgG/IgM Rapid Test, Medical Innovation Ventures Sdn. Bhd (Малайзия) рассчитанные на выявление всех трех маркеров ЛД, а также наборы с визуальным учетом результатов «ImmunoComb® II Dengue IgM&IgG BiSpot» (Израиль), позволяющие одновременно определять наличие IgM и IgG к ЛД методом дот-иммуноанализа. Зарегистрированных отечественных тест-систем для иммуноферментной экспресс-диагностики денге нет.

**Целью** работы явилась разработка диагностического набора для выявления маркеров лихорадки денге на всех стадиях заболевания. В статье описан экспериментальный набор для дот-иммуноанализа денге, позволяющий в одном образце одновременно выявлять антиген NS1 и антитела IgM и IgG к денге и пригодный для применения как в лабораторных, так и в полевых условиях.

## Материалы и методы

**Образцы сывороток крови человека.** Сыворотки крови от пациентов, заболевших во время возвращения из стран Юго-Восточной и Центральной Азии, Африки, Карибских островов и Ближнего Востока, госпитализированных с подозрением на лихорадку денге, поступили в период с июня 2012 г. по июнь 2018 г.

**Иммунореагенты:** Anti-Dengue NS1 monoclonal antibody (BRJNS1S101 (a/NS101), BRCNS1S103 (a/NS103), BRCNS1S104 (a/NS104) и BRCNS1S105 (a/NS105)); Dengue NS1 control (GRNDEN201J (NS1)); Anti-Human IgM monoclonal antibody (BECIGMC101 (a/IgM<sub>1</sub>), BECIGMC102J (a/IgM<sub>2</sub>)); Anti-Human IgG monoclonal antibody (BRJGGI102J (a/IgG<sub>1</sub>)); IgM native antigen (BBNIGMN101J (IgM)) и IgG Human native antigen (BBNIGGN102J (IgG)) фирмы Fapen (Китай); Monoclonal Anti-Human IgG<sub>2</sub> (Fc specific)

antibody produced in mouse, Clone 6001 (a/IgG<sub>2</sub>) фирмы Sigma-Aldrich (США).

**Рекомбинантные белки вируса денге типов I-IV** (AgD1, AgD2, AgD3, AgD4) получали с использованием иммунодоминантной области третьего домена гликопротеина E. Размер гликопротеина E для генотипов вируса Денге 1,2,4 составил 1485 п.н. (495 аминокислотных остатков (а.а.)), для генотипа 3 – 1479 п.н. (493 а.а.). Данная область включала в себя третий домен вируса с 883 по 1182 п.н. Рекомбинантный белок NS1 составил 389 а.а. Все E-белки и NS1 содержали на N-конце полигистидиновый тракт.

**Тесты сравнения.** В сыворотках крови пациентов проводили выявление антигена NS1, специфических IgM и IgG методом иммунохроматографии (ИХА) с применением набора «Dengue NS1Ag + Ab Combo system» (Республика Корея); методом дот-анализа с использованием набора «ImmunoComb® II Dengue IgM/IgG Bispot» (Израиль); а также методом иммуноферментного анализа (ИФА) при помощи тест-системы «Dengue ELISA IgG/IgM» (Испания).

**Соблюдение этических норм.** Участие пациентов в исследовании проводилось в соответствии с их информированными согласиями, оформленными в медицинских учреждениях. При проведении лабораторных исследований, все пробы подвергались кодированию. Исследования выполнялись в соответствии с приказами № 88 от 17.03.2008 г. и № 1116 от 01.12.2017 г. Роспотребнадзора.

**Экспериментальный набор «Денге-спектр»** (Российская Федерация) для дот-иммуноанализа маркеров лихорадки денге включал в себя 4 блока белковых матриц, 4 аналитические ванны (Патенты RUS 2517035 от 13.02.2013 г. и RUS 2495434 от 09.12.2011 г.), флаконы с бидистиллированной водой и с жидким компонентом проявляющей системы (рисунок, А). Иммунореагенты захвата, разведенные в 0,005 М боратном буферном растворе (рН 6,0) до концентрации 10–20 мкг/мл, наносили на лицевую сторону [17] каждой матрицы отдельными пятнами

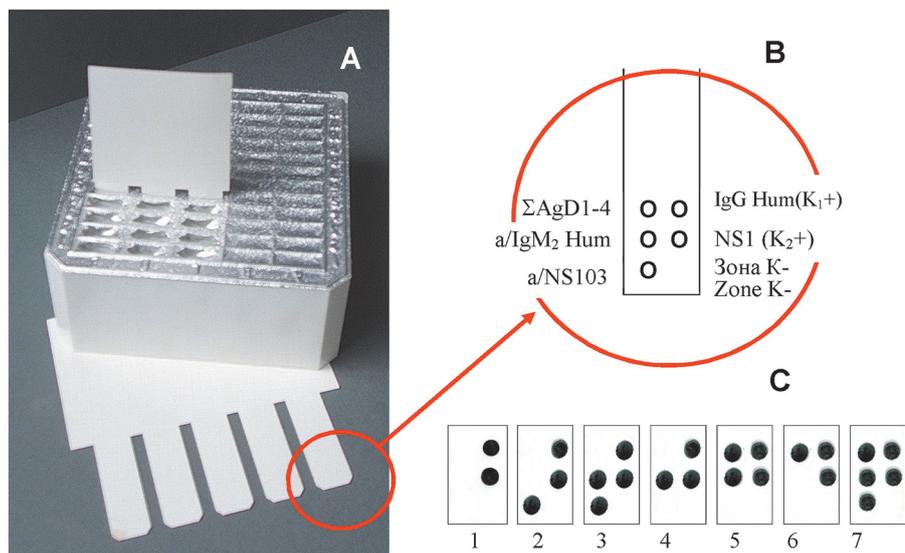
2,5 мм в диаметре по схеме, приведенной на рисунке В. Получение золей золота (15–20 нм) проводили, как описано ранее [18].

**Дот-иммуноанализ** выполняли при температуре 20–25 °С в аналитических ваннах с объемом рабочих растворов в ячейках 0,3–0,4 мл. Иммуночипы погружали в первый ряд ячеек и инкубировали 25 мин, а затем последовательно перемещали по следующим рядам с периодами инкубации: ряды 2, 3, 5 и 6 – по 2 мин; ряды 7, 8, 10, 11 и 12 – по 1 мин; ряд 4 – 20 мин и ряд 9 – 7 мин. Непосредственно перед внесением матриц в ячейки ряда 9 в них добавляли по 200 мкл жидкого компонента физического проявителя. После выемки из последней ячейки иммуночипы подсушивали на воздухе и визуально учитывали результаты анализа по наличию или отсутствию темных пятен в местах нанесения соответствующих антигенов (рисунок, В).

### Результаты и обсуждение

Механизм одновременного дифференциального выявления в исследуемых образцах специфических иммунологических маркеров ЛД – белка NS1 возбудителя и антител класса IgM и класса IgG, заключается в образовании специфических комплексов между маркерами из исследуемого образца и известными иммунореагентами захвата, в определенном порядке дискретно зафиксированными на плотной подложке. Образовавшиеся комплексы затем обнаруживаются с помощью иммунореагентов детекции, связанных с легко выявляемой меткой – каталитически активными золями золота.

Известны системы дот-иммуноанализа, позволяющие по одному образцу одновременно определять наличие IgM и IgG к ЛД. Например, в наборе «ImmunoComb® II Dengue IgM&IgG BiSpot» (Израиль) [9] в качестве реагентов захвата используются антитела против IgM и IgG человека, которые отдельными пятнами нанесены на пластмассовую подложку и позволяют выделять весь пул соответ-



Основные элементы диагностического набора «Денге-спектр» (А), схема нанесения реагентов захвата на подложку белковой матрицы (В) и возможные варианты результатов анализа (С): 1 – отрицательный, 2 – положительный по NS1, 3 – положительный по NS1 и IgM, 4 – положительный по IgM, 5 – положительный по IgM и IgG, 6 – положительный по IgG, 7 – положительный по всем маркерам ЛД. ΣAgD1-4 – смесь из равных концентраций антигенов вируса денге типов I–IV

The main elements of the «Dengue Spectrum» diagnostic kit (A), the scheme of application of capture reagents on the protein matrix underlay (B) and possible options for the analysis results (C): 1 – negative, 2 – positive for NS1, 3 – positive for NS1 and IgM, 4 – positive for IgM, 5 – positive for IgM and IgG, 6 – positive for IgG, 7 – positive for all dengue fever markers. ΣAgD1-4 – a mixture of equal concentrations of dengue virus antigens of types I–IV

ствующих антител из образца. Но если выявление специфических IgM при таком подходе может быть эффективным, поскольку в общем спектре IgM в образце антитела к текущей острой инфекции будут преобладать или составлять значительную долю, то в противоположность этому, специфические IgG составляют ничтожную долю на общем фоне суммарных IgG, приобретенных в результате перенесенных заболеваний или вакцинации. Поэтому в наборе используются последовательные длительные операции обработки подложки биотинилированными антигенами вируса денге, а затем конъюгатом авидина с щелочной фосфатазой, увеличивающих время анализа до 2 ч. При использовании в качестве реагента захвата вирусных антигенов теряется возможность дифференциации IgG и IgM на одной подложке.

Более рациональным вариантом одновременно раздельного выявления специфических IgG и IgM представляется схема, при которой захват IgG производится на суммарном антигене вируса денге с их детекцией с помощью меченных антител против IgG человека, а выявление IgM осуществляется захватом на антителах против IgM человека с детекцией меченым суммарным вирусным антигеном (рисунок, B).

Для выбора пары антител наиболее эффективно выявляющих белок NS1 подложки с иммобилизованными моноклональными антителами a/NS101, a/NS103, a/NS104 и a/NS105 обрабатывали иммунозолями Au- NS101, Au- NS103, Au- NS104, Au- NS105 в течение 30 мин и проявляли. При такой постановке дот-анализа лимит определения рекомбинантного аналога белка NS1 составил 100 нг/мл.

Установлено, что использованные в качестве реагента захвата антитела a/IgM<sub>1</sub> провоцируют мощные оптические сигналы при прямом взаимодействии со всеми используемыми конъюгатами, а Au-a/IgG<sub>1</sub> напрямую реагирует с антителами a/NS103 и суммарным антигеном ΣAgD1-3<sub>1</sub> на подложке. Применение альтернативных вариантов реагента захвата на подложке (a/IgM<sub>2</sub> и реагента детекции в конъюгате a/IgG<sub>2</sub>) устраняет перекрестные реакции и обеспечивает эффективное выявление всех маркеров ЛД в исследуемом образце.

Наиболее эффективное дифференциальное выявление специфических IgG и IgM осуществлено

по схеме, при которой захват IgG производился на суммарном антигене вируса денге с детекцией с помощью меченных антител a/IgG<sub>2</sub> человека, а выявление IgM осуществлялось захватом на антителах a/IgM<sub>2</sub> человека с детекцией меченым суммарным вирусным антигеном. Выявление белка NS1 вируса денге выполнено с использованием подложки с иммобилизованными моноклональными антителами a/NS103 и иммунозоля золота, связанного с антителами a/NS101.

Таким образом, создан экспериментальный набор, включающий белковые матрицы с иммобилизованными по схеме (рисунок, B) реагентами захвата: суммарным антигеном вирусов денге всех типов – ΣAgD1-4, антителами против иммуноглобулинов M человека – a/IgM<sub>2</sub> Hum, антителами против белка NS1 – a/NS103, а также двумя контролями работоспособности теста – IgG человека и белком NS1 вируса денге; а также сложный конъюгат, представленный смесью равных концентраций иммунозоль: Au-AgD1, Au-AgD2, Au-AgD3, Au-AgD4, Au-a/NS101 и Au-a/IgG<sub>2</sub>.

**Испытания экспериментального набора.** Образцы сывороток от пациентов [1], заболевших во время или сразу после возвращения из эндемичных по ЛД регионов, на разных сроках заболевания, исследовали с использованием разработанного экспериментального набора «Денге-спектр» и доступных коммерческих тестов. Результаты сравнительных испытаний приведены в таблице. Используя критерий Мак-Немара для анализа связанных измерений с помощью дихотомической переменной, были рассчитаны значения Хи-квадрат для полученных данных измерения положительных и отрицательных образцов для маркеров NS1, IgM и IgG.

Поскольку рассчитанные значения критерия в сравнительных испытаниях различных тест-систем (для NS1  $p=0,8148$ ,  $p_y=0,9214$  и  $p=0,7526$ ,  $p_y=0,8550$ , для IgM  $p=0,1566$ ,  $p_y=0,1955$  и  $p=0,2411$ ,  $p_y=0,2928$ , для IgG  $p=0,6838$ ,  $p_y=0,7986$  и  $p=0,7948$ ,  $p_y=0,9199$ ) оказались больше чем 0,05, мы не можем отвергнуть нулевую гипотезу об отсутствии различий между ними на выбранном уровне значимости.

Лихорадка денге является наиболее распространенным арбовирусом в мире и, не смотря на то, что

**Результаты сравнительного исследования клинических образцов с использованием разработанного экспериментального набора и коммерческих тестов**

**The results of a comparative study of clinical samples using the developed experimental set and commercial tests**

Тест-система	NS1			IgM			IgG			Отр.
	+/%	-/%	n	+/%	-/%	n	+/%	-/%	n	
«Денге-спектр» («ФБУН ГНЦ ВБ Вектор», Российская Федерация) «Dengue Spectrum» manufactured by the «Vector», Russian Federation	35/33	71/67	106	57/54	41/52	106	26/17	130/83	156	43
«Dengue NS1Ag + Ab Combo system» («Standard Diagnostics, Inc», Республика Корея / Korea)	38/35	70/65	108	41/37	67/63	108	24/15	139/85	163	46
«Dengue ELISA IgG/IgM» («Vircell Microbiologists», Испания / Spain)	42/36	75/64	117	45/41	66/59	111	21/18	95/82	116	40

*Примечание:* n – количество положительных и отрицательных (+/-) значений из выборки. Отр. – количество отрицательных контрольных образцов взятых в испытание.

*Note:* (+/-) n – the number of positive and negative values from the panel. Neg. – the number of negative control samples taken in the testing.

DENV-2 реплицируется быстрее и является более патогенным, чем остальные генотипы, все четыре серотипа являются инфекционными и патогенными [19]. Нами разработан набор дот-иммуноанализа для всех генотипов и стадий лихорадки денге. Установлено, что эффективное дифференциальное выявление специфических антител IgG и IgM может осуществляться по схеме, при которой захват IgG производится на суммарном антигене вируса денге, с детекцией с помощью меченных антител против IgG человека, а выявление IgM осуществляется захватом на антителах против IgM человека с детекцией меченым суммарным вирусным антигеном. Выявление белка NS1 вируса денге может выполняться с использованием подложки с иммобилизованными моноклональными антителами к NS1 и иммунозоля золота, связанного с антителами к NS1. При такой постановке дот-анализа лимит определения рекомбинантного аналога белка NS1 составил 100 нг/мл. Сравнительные испытания набора на панели клинических образцов показали хорошее совпадение результатов с данными полученными с использованием импортных коммерческих тестов. Разработанный набор, после проведения процедуры регистрации, может найти применение для скрининга клинических образцов как в стационарных лабораториях, так и в полевых условиях, непосредственно у постели больного.

**Финансирование.** Исследование проводилось в рамках выполнения государственного задания Федеральной службы в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

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

### Список литературы

- Guzman M.G., Harris E. Dengue. *Lancet*. 2015; 385(9966):453–65. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60572-9.
- Monteiro D.C.S., Souza N.V., Amaral J.C., Lima K.B., Araújo F.M.C., Ramalho I.L.C., Martins V.E.P., Colares J.K.B., Cavalcanti L.P.G., Lima D.M. Dengue: 30 years of cases in an endemic area. *Clinics (Sao Paulo)*. 2019; 74:e675. DOI: 10.6061/clinics/2019/e675.
- Guo C., Zhou Z., Wen Z., Liu Y., Zeng C., Xiao D., Ou M., Han Y., Huang S., Liu D., Ye X., Zou X., Wu J., Wang H., Zeng E.Y., Jing C., Yang G. Global Epidemiology of Dengue Outbreaks in 1990–2015: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017; 7:317. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00317.
- Резолюция Всемирной ассамблеи здравоохранения WHA58.3 Пересмотр Международных медико-санитарных правил. [Электронный ресурс]. URL: [http://apps.who.int/gb/archive/e/e\\_wha58.html](http://apps.who.int/gb/archive/e/e_wha58.html) (дата обращения 13.09.2019).
- Sergeeva E.I., Ternovoi V.A., Chausov E.V., Berillo S.A., Demina O.K., Shikov A.N., Plasunova I.V., Kartashov M.J., Agafonov A.P. Imported cases of dengue fever in Russia during 2010–2013. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2015; 8(2):90–3. DOI: 10.1016/S1995-7645(14)60194-2.
- Ganushkina L.A., Patraman I.V., Rezza G., Migliorini L., Litvinov S.K., Sergiev V.P. Detection of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Aedes koreicus* in the Area of Sochi, Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2016; 16(1):58–60. DOI: 10.1089/vbz.2014.1761.
- Ларичев В.Ф., Сайфуллин М.А., Акиншина Ю.А., Хуторецкая Н.В., Бутенко А.М. Завозные случаи арбовирусных инфекций в Российской Федерации. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2012; (1):35–8.
- Slon Campos J.L., Poggianella M., Marchese S., Mossenta M., Rana J., Arnoldi F., Bestagno M., Burrone O.R. DNA-immunisation with dengue virus E protein domains I/II, but not domain III, enhances Zika, West Nile and Yellow Fever virus infection. *PLoS One*. 2017; 12(7):e0181734. DOI: 10.1371/journal.pone.0181734.
- Бахметьева С.В., Пуховская Н.М., Здановская Н.И.,

Иванов Л.И., Белозерова Н.Б., Уткина О.М., Журавлев Я.А., Ларичев В.Ф. Этиологическая расшифровка завозных случаев тропических лихорадок в дальневосточном регионе. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2014; 25:91–3.

10. Keasey S.L., Pugh C.L., Jensen S.M.R., Smith J.L., Hontz R.D., Durbin A.P., Dudley, D.M., O'Connor D.H., Ulrich R.G. Antibody Responses to Zika Virus Infections in Environments of Flavivirus Endemicity. *Clin. Vaccine Immunol.* 2017; 24(4):pii: e00036-17. DOI: 10.1128/0014-8177.2017.00036-17.

11. Lindenbach B.D., Murray C.L., Thiel H.-J., Rice C.M. Flaviviridae. In: Knipe D.M., Howley P.M., editors. *Fields virology*. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2013. P. 712–46.

12. Kuhn R.J., Zhang W., Rossmann M.G., Pletnev S.V., Corver J., Lenches E., Jones C.T., Mukhopadhyay S., Chipman P.R., Strauss E.G., Baker T.S., Strauss J.H. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 2002; 108(5):717–25. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00660-8.

13. Balsitis S.J., Williams K.L., Lachica R., Flores D., Kyle J.L., Mehlhop E., Johnson S., Diamond M.S., Beatty P.R., Harris E. Lethal antibody enhancement of dengue disease in mice is prevented by Fc modification. *PLoS Pathog.* 2010; 6(2):e100070. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000790.

14. Ho L.J., Wang J.J., Shaio M.F., Kao C.L., Chang D.M., Han S.W., Lai J.H. Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. *J. Immunol.* 2001; 166(3):1499–506. DOI: 10.4049/jimmunol.166.3.1499.

15. Zellweger R.M., Prestwood T.R., Shresta S. Enhanced infection of liver sinusoidal endothelial cells in a mouse model of antibody-induced severe dengue disease. *Cell Host Microbe*. 2010; 7(2):128–39. DOI: 10.1016/j.chom.2010.01.004.

16. Акиншина Ю.А., Ларичев В.Ф., Сайфуллин М.А., Марданлы С.Г., Бутенко А.М. Сравнительное применение экспериментальной ИФА-тест-системы НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского «ИФА-IGM-ДЕНГЕ» (Россия) и фирмы Euroimmun ANTI-DENGUE VIRUS ELISA IGM (Германия) для серодиагностики лихорадки денге. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2017; 22(1):4–8. DOI: 10.18821/1560-9529-2017-22-1-4-8.

17. Poltavchenko A.G., Zaitsev B.N., Ersh A.V., Korneev D.V., Taranov O.S., Filatov P.V., Nechitaylo O.V. The selection and optimization of the detection system for self-contained multiplexed dot-immunoassay. *J. Immunoassay Immunochem.* 2016; 37(5):540–554. DOI: 10.1080/15321819.2016.1174134.

18. Poltavchenko A.G., Zaitsev B.N., Ersh A.V., Taranov O.S., Korneev D.V., Nikonov A.M. Selection of Substrate Material for Protein Matrices. *Prot. Met. Phys. Chem. Surf.* 2016; 52(2):301–7. DOI: 10.1134/S2070205116020234.

19. Niu C., Huang Y., Wang M., Huang D., Li J., Huang S., Yang F., Wan C., Zhang R. Differences in the Transmission of Dengue Fever by Different Serotypes of Dengue Virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2019. DOI: 10.1089/vbz.2019.2477.

### References

- Guzman M.G., Harris E. Dengue. *Lancet*. 2015; 385(9966):453–65. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60572-9.
- Monteiro D.C.S., Souza N.V., Amaral J.C., Lima K.B., Araújo F.M.C., Ramalho I.L.C., Martins V.E.P., Colares J.K.B., Cavalcanti L.P.G., Lima D.M. Dengue: 30 years of cases in an endemic area. *Clinics (Sao Paulo)*. 2019; 74:e675. DOI: 10.6061/clinics/2019/e675.
- Guo C., Zhou Z., Wen Z., Liu Y., Zeng C., Xiao D., Ou M., Han Y., Huang S., Liu D., Ye X., Zou X., Wu J., Wang H., Zeng E.Y., Jing C., Yang G. Global Epidemiology of Dengue Outbreaks in 1990–2015: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2017; 7:317. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00317.
- World Health Assembly resolution WHA58.3 Revision of the International Health Regulations. (Cited 13 Sept 2019) [Internet]. Available from: [http://apps.who.int/gb/archive/e/e\\_wha58.html](http://apps.who.int/gb/archive/e/e_wha58.html).
- Sergeeva E.I., Ternovoi V.A., Chausov E.V., Berillo S.A., Demina O.K., Shikov A.N., Plasunova I.V., Kartashov M.J., Agafonov A.P. Imported cases of dengue fever in Russia during 2010–2013. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2015; 8(2):90–3. DOI: 10.1016/S1995-7645(14)60194-2.
- Ganushkina L.A., Patraman I.V., Rezza G., Migliorini L., Litvinov S.K., Sergiev V.P. Detection of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Aedes koreicus* in the Area of Sochi, Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2016; 16(1):58–60. DOI: 10.1089/vbz.2014.1761.
- Larichev V.F., Sayfullin M.A., Akinshina Yu.A., Khutoretskaya N.V., Butenko A.M. Imported cases of arbovirus infections in the Russian Federation. *Epidemiologiia i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2012; (1):35–8.
- Slon Campos J.L., Poggianella M., Marchese S., Mossenta M., Rana J., Arnoldi F., Bestagno M., Burrone O.R. DNA-immunisation with dengue virus E protein domains I/II, but not domain III, enhances Zika, West Nile and Yellow Fever virus infection. *PLoS One*. 2017; 12(7):e0181734. DOI: 10.1371/journal.pone.0181734.
- Bakhmeteva S.V., Pukhovskaya N.M., Zdanovskaya N.I.,

Ivanov L.I., Belozerova N.B., Utkina O.M., Zhuravlev Y.A., Larichev V.F. Etiological decoding of imported cases of tropical fevers in the Far Eastern Region. [*Far Eastern Journal of Infectious Pathology*]. 2014; 25:91–3.

10. Keasey S.L., Pugh C.L., Jensen S.M.R., Smith J.L., Hontz R.D., Durbin A.P., Dudley, D.M., O'Connor D.H., Ulrich R.G. Antibody Responses to Zika Virus Infections in Environments of Flavivirus Endemicity. *Clin. Vaccine Immunol.* 2017; 24(4):pii: e00036-17. DOI: 10.1128/00141801.2017.00036-17.

11. Lindenbach B.D., Murray C.L., Thiel H.-J., Rice C.M. Flaviviridae. In: Knipe D.M., Howley P.M., editors. *Fields virology*. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2013. P. 712–46.

12. Kuhn R.J., Zhang W., Rossmann M.G., Pletnev S.V., Corver J., Lenches E., Jones C.T., Mukhopadhyay S., Chipman P.R., Strauss E.G., Baker T.S., Strauss J.H. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 2002; 108(5):717–25. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00660-8.

13. Balsitis S.J., Williams K.L., Lachica R., Flores D., Kyle J.L., Mehlhop E., Johnson S., Diamond M.S., Beatty P.R., Harris E. Lethal antibody enhancement of dengue disease in mice is prevented by Fc modification. *PLoS Pathog.* 2010; 6(2):e100070. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000790.

14. Ho L.J., Wang J.J., Shaio M.F., Kao C.L., Chang D.M., Han S.W., Lai J.H. Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. *J. Immunol.* 2001; 166(3):1499–506. DOI: 10.4049/jimmunol.166.3.1499.

15. Zellweger R.M., Prestwood T.R., Shresta S. Enhanced infection of liver sinusoidal endothelial cells in a mouse model of antibody-induced severe dengue disease. *Cell Host Microbe*. 2010; 7(2):128–39. DOI: 10.1016/j.chom.2010.01.004.

16. Akinshina Yu.A., Larichev V.F., Sayfullin M.A., Mardanly S.G., Butenko A.M. Comparative use of the experimental ELISA test system of DI. Ivanovsky Research Institute of Virology “IFA-IGM-DENGUE” (Russia) and the company Euroimmun ANTI-DENGUE VIRUS ELISA IGM (Germany) for serological diagnostics of dengue fever. *Epidemiologiya i Infekcionnye Bolezni [Epidemiology and*

*Infectious Diseases]*. 2017; 22(1):4–8. DOI: 10.18821/1560-9529-2017-22-1-4-8.

17. Poltavchenko A.G., Zaytzev B.N., Ersh A.V., Korneev D.V., Taranov O.S., Filatov P.V., Nechitaylo O.V. The selection and optimization of the detection system for self-contained multiplexed dot-immunoassay. *J. Immunoassay Immunochem.* 2016; 37(5):540–554. DOI: 10.1080/15321819.2016.1174134.

18. Poltavchenko A.G., Zaitsev B.N., Ersh A.V., Taranov O.S., Korneev D.V., Nikonov A.M. Selection of Substrate Material for Protein Matrices. *Prot. Met. Phys. Chem. Surf.* 2016; 52(2):301–7. DOI: 10.1134/S2070205116020234.

19. Niu C., Huang Y., Wang M., Huang D., Li J., Huang S., Yang F., Wan C., Zhang R. Differences in the Transmission of Dengue Fever by Different Serotypes of Dengue Virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2019. DOI: 10.1089/vbz.2019.2477.

#### Authors:

*Poltavchenko A.G., Ternovoi V.A., Ersh A.V., Filatov P.V., Bayandin R.B., Sementsova A.O., Ereemeeva L.I., Loktev V.B., Agafonov A.P.* State Scientific Centre of Virology and Biotechnology “Vector”. Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

#### Об авторах:

*Полтавченко А.Г., Терновой В.А., Ерш А.В., Филатов П.В., Баяндин Р.Б., Семенцова А.О., Еремеева Л.И., Локтев В.Б., Агафонов А.П.* Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

Поступила 17.09.19.

Отправлена на доработку 20.09.19.

Принята к публ. 23.09.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-87-93

УДК 615.371

С.М. Суханова, Л.В. Саяпина, З.Е. Бердникова, А.С. Тихонова, В.И. Климов

**ПРОБЛЕМЫ ОЦЕНКИ «СТЕРИЛЬНОСТИ» ЖИВЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВАКЦИН***ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация*

**Цель** исследований – анализ нормативных показателей и методик, используемых при определении наличия посторонних микроорганизмов в живых бактериальных вакцинах. **Материалы и методы.** В работе использованы материалы Государственной фармакопеи СССР IX–XI изданий, Государственной фармакопеи Российской Федерации XII–XIV изданий, а также НД/ФСП на девять наименований живых вакцин. **Результаты и обсуждение.** Учитывая специфику живых вакцин, процесс их производства и контроля качества должен направляться на исключение возможности контаминации микроорганизмами, отличающимися от производственных штаммов. Установлено, что в настоящее время в Российской Федерации отсутствуют единая терминология для обозначения показателя и четкие критерии интерпретации результатов испытания оценки качества живых бактериальных вакцин при определении стерильности/контаминации посторонними бактериями и грибами. В соответствии с требованиями действующих изданий фармакопеи РФ выявление контаминации в живых вакцинах для парентерального введения рекомендовано проводить по различным методикам и критериям оценки (ОФС «Стерильность» и ОФС «Микробиологическая чистота»). Проведенные исследования определили необходимость совершенствования нормативной базы в части требований к выявлению контаминации посторонними бактериями и грибами. Рекомендовано в нормативных документах использовать единое наименование показателя «Отсутствие посторонних бактерий и грибов». Даны рекомендации по совершенствованию методик и требований к оценке контаминации бактериями и грибами живых бактериальных вакцин. Разработанные предложения по гармонизации требований к оценке качества вакцин, содержащих другие живые микроорганизмы, могут использоваться при подготовке соответствующих нормативно-правовых документов (ОФС, ФС, НД и др.).

**Ключевые слова:** живые вакцины, оценка качества, контаминация, отсутствие посторонней микрофлоры, стерильность, безопасность.

*Корреспондирующий автор:* Суханова Светлана Михайловна, e-mail: SuhanovaSM@expmed.ru.

*Для цитирования:* Суханова С.М., Саяпина Л.В., Бердникова З.Е., Тихонова А.С., Климов В.И. Проблемы оценки «стерильности» живых бактериальных вакцин. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 3:87–93. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-87-93

S.M. Sukhanova, L.V. Sayapina, Z.E. Berdnikova, A.S. Tikhonova, V.I. Klimov

**Problems of Assessment of Live Bacterial Vaccine Sterility***Scientific Center on Expertise of Medical Application Products, Moscow, Russian Federation*

**Abstract. Objective** of the study – analysis of standard indicators and methods, utilized for determination of presence of contaminating microorganisms in live bacterial vaccines. **Materials and methods.** We used the data from the State Pharmacopeia of the USSR, 9<sup>th</sup>–11<sup>th</sup> editions; State Pharmacopeia of the Russian Federation, 12<sup>th</sup>–14<sup>th</sup> editions; as well as regulatory documentation/manufacturer’s pharmacopoeial monographs for 9 items of live vaccines. **Results and discussion.** Taking into account the specificity of live vaccines, the process of their manufacturing and quality control must target elimination of the possibility of contamination with microorganisms that differ from production strains. It is established that currently there is no unified terminology for determining the indicator in the Russian Federation, as well as clear-cut criteria for interpretation of test results for quality assessment of live bacterial vaccines when testing sterility/contamination with foreign bacteria and fungi. In compliance with the requirements of the current RF Pharmacopeia editions, detection of contamination in live vaccines for parenteral administration should be carried out using various methods and assessment criteria (General Pharmacopeia Monograph (GPM) “Sterility” and GPM “Microbiological purity”). Performed investigations have revealed the necessity to enhance the regulatory framework in regard to detection of contamination with foreign bacteria and fungi. It is advised to use unified nomination of the indicator, specifically, “Absence of foreign bacteria and fungi” in the normative documents. Given are the recommendations on improvement of methods and requirements to the assessment of live bacterial vaccine contamination. Developed proposals on harmonization of the quality assessment requirements of vaccines containing other live microorganisms can be used for drawing up corresponding normative-regulatory documents (GPM, Pharmacopeia monograph, regulatory documentation *et al.*).

**Key words:** live vaccines, quality assessment, contamination, absence of foreign micro-flora, sterility, safety.

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

*Corresponding author:* Svetlana M. Sukhanova, e-mail: SuhanovaSM@expmed.ru.

*Citation:* Sukhanova S.M., Sayapina L.V., Berdnikova Z.E., Tikhonova A.S., Klimov V.I. Problems of Assessment of Live Bacterial Vaccine Sterility. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2019; 3:87–93. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-87-93

*Received* 29.03.19. *Accepted* 18.04.19.

Svetlana M. Sukhanova, ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6621-4384>

Lidia V. Sayapina, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1958-7342>

Zinaida E. Berdnikova, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9865-4250>

Vladimir I. Klimov, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1444-6591>

Неотъемлемой составляющей безопасности иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП), к которым относятся вакцины, анатоксины, токсины, сыворотки, иммуноглобулины и аллергены, является отсутствие микробной контаминации [1, 2]. Наличие посторонней микрофлоры может не только привести к снижению эффективности препаратов, но и вызывать нежелательные реакции у пациентов [3, 4]. Характер производства, контроля и применения ИЛП не только для больных, но и для здоровых людей (включая детей первых дней жизни) требует особых мер безопасности [5–8]. Гарантией выпуска продукции, исключающей контаминацию чужеродными агентами, является строгое соблюдение правил надлежащей производственной практики, включающей использование адекватных методов контроля [9–11].

Особую группу ИЛП составляют вакцины, представляющие собой живую культуру аттенуированного штамма соответствующего патогенного микроорганизма (вирусы, бактерии, риккетсии) [3, 12, 13]. В настоящее время в Российской Федерации (РФ) зарегистрированы живые вакцины для иммунопрофилактики и иммунотерапии 13 инфекций, вызываемых бактериями, вирусами и риккетсиями. Живые бактериальные вакцины предназначены для профилактики таких опасных заболеваний, как чума, сибирская язва, бруцеллез, туляремия, туберкулез, а также для лечения рака мочевого пузыря. Вакцины применяются для предупреждения инфекционных заболеваний в рамках Национального календаря прививок, согласно которому, в частности, вакцинация новорожденных против туберкулеза проводится на 3–7 день жизни и по эпидемическим показаниям [3].

Процесс изготовления живых вакцин связан с повышенным риском контаминации при культивировании производственных штаммов, обусловленным вспомогательными материалами и питательными средами, а также сложностью ее выявления в готовом препарате. Учитывая специфику живых вакцин, процесс их производства, в первую очередь, должен быть направлен на исключение возможности контаминации микроорганизмами, отличающимися от производственных штаммов. При этом важным элементом системы обеспечения качества при производстве является валидация, т.е. документированное подтверждение соответствия технологического процесса, качества полупродуктов и готового лекарственного препарата установленным нормативным требованиям [5].

Принимая во внимание значимость и сложность оценки контаминации, невозможность определения стерильности бактериальных вакцин, представляющих собой живые микроорганизмы производственных штаммов, а также отсутствие публикаций по данной проблеме, проведение анализа действующих нормативных стандартов по данной проблеме является актуальным.

**Целью** работы явился анализ нормативных показателей и методик, используемых при определении

наличия посторонних микроорганизмов в живых бактериальных вакцинах.

В ходе работы требовалось решить следующие задачи:

- провести анализ отечественных фармакопейных требований и нормативной документации (НД) к проведению испытания и критериям оценки качества живых бактериальных вакцин при определении наличия посторонних бактерий и грибов;
- обосновать выбор единого наименования показателя, характеризующего микробиологическую безопасность живых вакцин в отношении контаминации посторонними бактериями и грибами;
- разработать предложения по совершенствованию методики и требований к оценке отсутствия посторонних бактерий и грибов в живых бактериальных вакцинах.

### Материалы и методы

В работе использовали следующие нормативные документы:

- Государственная фармакопея СССР, IX изд., 1961 г.;
- Государственная фармакопея СССР, X изд., 1968 г.;
- Государственная фармакопея СССР, XI изд., вып. 2, 1989 г.;
- Государственная фармакопея Российской Федерации, XII изд., ч. 1, 2015 г.;
- Государственная фармакопея (ГФ) Российской Федерации XIII издания: общая фармакопейная статья (ОФС).1.8.1.0002.15 «Имунобиологические препараты»; ОФС.1.7.1.0004.15 Вакцины и анатоксины; фармакопейная статья (ФС).3.3.1.0011.15 Вакцина бруцеллезная живая; ФС.3.3.1.0016.15 Вакцина сибиреязвенная живая; ФС.3.3.1.0018.15 Вакцина туберкулезная БЦЖ живая; ФС.3.3.1.0019.15 Вакцина туляремиальная живая; ФС.3.3.1.0022.15 Вакцина чумная живая;
- ГФ РФ XIV издания: ОФС.1.7.1.0010.18 Биологические лекарственные препараты; ФС.3.3.1.0052.18 Вакцина Ку-лихорадки М-44 живая; ФС.3.3.1.0053.18 Вакцина БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря живая; ФС.3.3.1.0054.18 Вакцина Е сыпнотифозная комбинированная живая; НД/ФСР Р N001273/01-230911 Вакцина сибиреязвенная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и накожного скарификационного нанесения; ФСР Р N001969/01-310308 Вакцина туберкулезная (БЦЖ), лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения; ФСР Р N001972/01-310308 Вакцина туберкулезная для щадящей первичной иммунизации (БЦЖ-М), лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного; ФСР Р N002348/01-010212 Вакцина туляремиальная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для внутрикожного введения и накожного скарификационного нанесения; ФСР Р N003612/01-

010212 Вакцина бруцеллезная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения и кожного скарификационного нанесения; ФСП ЛСР-005759/08-220708 Вакцина чумная живая, лиофилизат для приготовления суспензии для инъекций, кожного скарификационного нанесения и ингаляций; НД Р N001970/01 Имурон-вак (Вакцина БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря, лиофилизат для приготовления суспензии для внутривезикулярного введения); ФСП ЛС-002153-180512 Вакцина Ку-лихорадки М-44 живая (Вакцина Ку-лихорадки М-44) лиофилизат для приготовления суспензии для кожного скарификационного нанесения.

### Результаты и обсуждение

Впервые общие требования к проведению испытаний вакцин вошли в Государственную фармакопею СССР IX издания. Отсутствие контаминации в вакцинах независимо от их природы оценивали в испытании на стерильность. При этом детальное описание методики и указания по учету результатов оценки качества живых вакцин отсутствовали. В период действия ГФ СССР X, XI и ГФ РФ XII изданий требования к живым вакцинам включали в Фармакопейные статьи предприятий (ФСП) или в нормативную документацию, в соответствии с которыми отсутствие контаминации в одних определяли по показателю «Стерильность», в других регламентирующих документах – по показателю «Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов». Требования к качеству живых бактериальных вакцин с перечнем необходимых показателей и методов контроля были внесены в ГФ РФ XIII издания и дополнены в утвержденной ГФ РФ XIV издания в соответствующих общих фармакопейных статьях и фармакопейных статьях

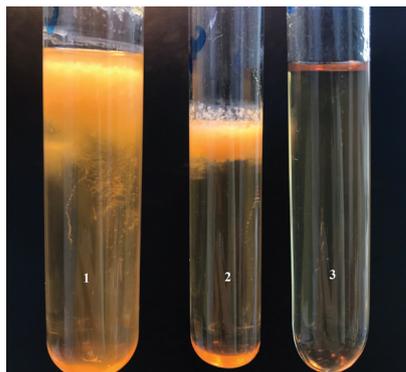


Рис. 1. Результаты инкубации (14 сут. при 35 °С) образцов вакцины бруцеллезной живой, лиофилизата для приготовления суспензии для подкожного введения и кожного скарификационного нанесения:

1 – первичный посев препарата в питательную (тиогликолевую) среду в соотношении 1:20; 2 – пересев, на 7-е сутки; 3 – контрольный образец питательной (тиогликолевой) среды

Fig. 1. Results of incubation at 35 °C (14 days) of Live brucellosis vaccine, lyophilizate for preparation of suspension for subcutaneous injection and skin scarification application:

1 – primary seeding into nutrient (thioglycolate) medium, at the ratio of 1:20; 2 – subculture, on day 7; 3 – control sample of the nutrient (thioglycolate) medium

(Приказ Минздрава РФ от 31.10.2018 г. № 749). Однако обозначение микробиологического показателя их качества в данных документах не приведено, а в примечании к ОФС.1.2.4.0003.18 «Стерильность» указано, что испытания осуществляют в соответствии с требованиями НД.

Большинство выпускаемых в Российской Федерации живых бактериальных вакцин применяют для парентерального подкожного, внутривезикулярного введения и кожного скарификационного нанесения. В соответствии с ОФС 1.4.1.0007.15 препараты, предназначенные для парентерального применения, должны выдерживать испытание на стерильность. Необходимо отметить, что стерильность образца и соответствие требованию испытания на «Стерильность» не являются тождественными понятиями. Стерильность трактуется, как отсутствие в образцах способных к размножению микроорганизмов, для выявления которых в настоящее время используют различные испытания, в том числе на отсутствие бактерий и грибов, вирусов и риккетсий, а также микоплазм. Оценка качества готовых препаратов живых бактериальных вакцин в отношении наличия в них вирусов и микоплазм требованиями действующих нормативных документов не предусмотрена. Поскольку испытание в соответствии с требованиями ОФС «Стерильность» проводится с помощью питательных сред, обладающих ростовыми свойствами в отношении тест-штаммов аэробных и анаэробных бактерий и грибов, то удовлетворительный результат будет свидетельствовать лишь о том, что в образце не обнаружены бактерии и/или грибы. Результаты испытания образцов препаратов живых бактериальных вакцин, представленные на рис. 1 и 2,

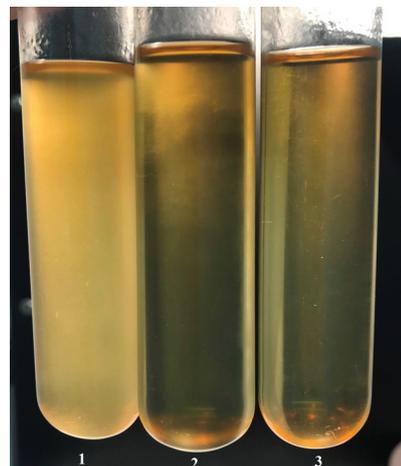


Рис. 2. Результаты инкубации (14 сут. при 35 °С) образцов вакцины БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря, лиофилизата для приготовления суспензии для внутривезикулярного введения:

1 – первичный посев препарата в питательную (тиогликолевую) среду в соотношении 1:20; 2 – пересев, на 7-е сутки; 3 – контрольный образец питательной (тиогликолевой) среды

Fig. 2. Results of incubation at 35 °C (14 days) of BCG vaccine samples for immune therapy of bladder cancer, lyophilizate for preparation of suspension for intravesical administration:

1 – primary seeding into nutrient (thioglycolate) medium, at the ratio of 1:20; 2 – subculture, on day 7; 3 – control sample of the nutrient (thioglycolate) medium

свидетельствуют о том, что живая культура вакцинного штамма, используемого при изготовлении той или иной вакцины, в процессе инкубации вызывает специфический рост, сопровождающийся появлением мутности, осадка, хлопьев и других изменений жидкой питательной среды, а также указывает на несоответствие качества образца установленным критериям испытания по показателю «Стерильность». Учитывая вышеизложенное, живые вакцины не могут быть стерильными в полном смысле этого термина, а испытание по показателю «Стерильность» для подтверждения отсутствия в них посторонних бактерий и грибов не представляется корректным, поскольку критерием соответствия является отсутствие роста микроорганизмов. Всемирная организация здравоохранения под стерильностью препаратов, представляющих собой живые микроорганизмы, рекомендует понимать отсутствие контаминации другими микроорганизмами [13].

Таким образом, для подтверждения отсутствия в живых бактериальных вакцинах контаминации, обусловленной бактериями и грибами, необходимо применять иные критерии оценки качества, требования к порядку учета и интерпретации результатов, позволяющие дифференцировать рост микроорганизмов-контаминантов от изменений питательной среды, вызванных ростом вакцинного штамма, а для наименования показателя качества использовать терминологию, отражающую суть проводимого испытания.

В ходе анализа нормативных документов установлено, что в настоящее время в Российской Федерации отсутствует единая терминология для обозначения показателя оценки качества живых бактериальных вакцин при определении стерильности – контаминации бактериями и грибами. Для этих целей используются различные варианты редакции наименования показателя, испытание по которым предполагает возможность выявления не только посторонних бактерий и/или грибов, но и других микроорганизмов.

В частности, согласно ОФС.1.7.1.0004.15 «Вакцины и анатоксины», оценку качества живых бактериальных вакцин предусмотрено проводить по показателю «Отсутствие посторонних микроорганизмов», согласно ОФС.1.7.1.0010.18 «Биологические лекарственные препараты» и ОФС.1.8.1.0002.15 «Иммунобиологические препараты» по показателю «Отсутствие посторонней микрофлоры». В фармакопейных статьях и нормативной документации производителей на живые бактериальные вакцины, наименование показателя представлено в иной интерпретации: «Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов», однако порядок проведения испытаний по таким показателям в отечественной фармакопее отсутствует. В таблице приведены различия в наименованиях показателя и в требованиях к отсутствию контаминации бактериями и грибами в нормативных документах на вакцины, содержащие живую культуру производственных штаммов бактерий и риккетсий.

Разночтения в наименовании показателя и отсутствие описания процедуры проведения испытания в Государственной фармакопее Российской Федерации вызывают терминологическую путаницу и приводят к затруднениям при оценке микробиологического качества живых бактериальных вакцин. Кроме того, выявление контаминации бактериями и грибами в живых вакцинах для парентерального введения, согласно ОФС.1.8.1.0002.15 «Иммунобиологические препараты», ОФС.1.7.1.0010.18 «Биологические лекарственные препараты» и ОФС.1.7.1.0004.15 «Вакцины и анатоксины», рекомендовано проводить по различным методикам и критериям оценки, по ОФС «Стерильность» и ОФС «Микробиологическая чистота» соответственно. При этом требование ОФС «Микробиологическая чистота» (содержание общего числа аэробных микроорганизмов, дрожжевых и плесневых грибов до 50 КОЕ/мл) к препаратам группы 5.1.Б (живые вакцины для внутрикожного введения и накожного скарификационного нанесения) не согласуется с требованием ФС и НД к вакцинам, зарегистрированным в РФ, согласно которым они не должны содержать контаминантов. Использование некорректного наименования показателя качества приводит к неадекватной или неопределенной формулировке требований и размытым критериям оценки результатов исследования.

На наш взгляд, микробиологическим показателем качества живых бактериальных вакцин, подтверждающим отсутствие контаминации бактериями и грибами, может служить наименование, доказывающее не что иное, как отсутствие посторонних бактерий и грибов. Аналогичным образом данный показатель качества живых вакцин трактуется и Европейской фармакопеей – «Bacterial and fungal contamination» [14, 15]. Наиболее точная формулировка наименования показателя, согласующаяся с требованиями Европейской фармакопеей, представлена в ФС на вакцину туберкулезную БЦЖ – «Отсутствие посторонних бактерий и грибов» (таблица).

Проведенный анализ требований действующих изданий ГФ РФ к методикам и критериям оценки качества живых бактериальных вакцин при определении наличия посторонних бактерий и грибов показал, что в настоящее время испытание традиционно проводят методом прямого посева согласно ОФС «Стерильность» [16]. Однако детальное описание методики и процедура учета результатов, как правило, отсутствует. Например, испытание живой вакцины БЦЖ согласно ФС.3.3.1.0018.15 проводят в соответствии с ОФС «Стерильность» с нормативным требованием наличия в образце микобактерий БЦЖ, при этом порядок учета результатов испытания и процедуры дифференциации/идентификации микобактерий БЦЖ от посторонних бактерий и грибов не описаны.

Методики испытания на «Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов» туляремийной, чумной, сибиреязвенной и бруцеллезной вакцин

**Требования к оценке наличия посторонних бактерий и грибов в живых бактериальных вакцинах**  
**Requirements to the assessment of presence of extraneous bacteria and fungi in live bacterial vaccines**

Препараты Preparations	Нормативная документация Normative documentation	Наименование показателя Indicator description	Требования Requirements
Вакцина туберкулезная БЦЖ живая Live tuberculosis vaccine BCG	ФС.3.3.1.0018.15 Pharmacopeia monograph (PM).3.3.1.0018.15	Отсутствие посторонних бактерий и грибов Absence of foreign bacteria and fungi	Посторонняя микрофлора (бактерии, грибы) должна отсутствовать, за исключением микобактерий БЦЖ Foreign micro-flora (bacteria, fungi) must be absent, with the exception of mycobacteria BCG
	ФСП Р N001969/01-310308 Manufacturer's pharmacopoeial monograph (MPM) Registered ® N001969/01-310308	Отсутствие посторонней микрофлоры Absence of foreign micro-flora	Не должна содержать посторонней микрофлоры Must be clear of any foreign micro-flora
Вакцина туберкулезная БЦЖ-М живая Live tuberculosis vaccine BCG-M	ФСП Р N001972/01-310308 MPM R N001972/01-310308	Нет No	Нет No
	ФС (отсутствует) PM (not available)		
Вакцина БЦЖ для иммунотерапии рака мочевого пузыря живая Live BCG vaccine for immune therapy of bladder cancer	ФС.3.3.1.0053.18 PM.3.3.1.0053.18	Отсутствие посторонних бактерий и грибов Absence of foreign bacteria and fungi	Посторонняя микрофлора (бактерии, грибы) должна отсутствовать, за исключением микобактерий БЦЖ Foreign micro-flora (bacteria, fungi) must be absent, with the exception of mycobacteria BCG
	НД Р N001970/01 ND R N001970/01		
Вакцина туляремиальная живая Live tularemia vaccine	ФС.3.3.1.0019.15 PM.3.3.1.0019.15		
	ФСП Р N002348/01-010212 MPM R N002348/01-010212		
Вакцина чумная живая Live plague vaccine	ФС.3.3.1.0022.15 PM.3.3.1.0022.15	Отсутствие посторонних микроорганизмов и грибов Absence of foreign microorganisms and fungi	Не должна содержать посторонних микроорганизмов и грибов Must be clear of any foreign microorganisms and fungi
	ФСП ЛСР-005759/08-220708 MPM on medicinal drug R 005759/08-220708		
Вакцина бруцеллезная живая Live brucellosis vaccine	ФС.3.3.1.0011.15 PM.3.3.1.0011.15		
	ФСП Р N003612/01-010212 MPM R N003612/01-010212		
Вакцина сибиреязвенная живая Live anthrax vaccine	ФС.3.3.1.0016.15 PM.3.3.1.0016.15		
	ФСП Р N001273/01-230911 MPM R N001273/01-230911		
Вакцина Е сыпнотифозная комбинированная живая Combined live typhus vaccine E	ФС.3.3.1.0054.18 PM.3.3.1.0054.18	Стерильность Sterility	Должен быть стерильным Must be sterile
Вакцина Ку-лихорадки М-44 живая Live Q fever vaccine M-44	ФС.3.3.1.0052.18 PM.3.3.1.0052.18	Стерильность Sterility	Не должна быть контаминирована посторонней микрофлорой Must not be contaminated by foreign micro-flora
	ФСП ЛС-002153-180512 MPM on medicinal drug 002153-180512		Должна быть стерильна Must be sterile

изложены более подробно и включают указания не только на метод посева, но и на необходимость соблюдения соотношения объема исследуемого образца и питательной среды (1:20), а также пересева на 5–7 сут инкубирования и последующий через 14 сут просмотр мазков посевов, окрашенных по Граму. Для интерпретации полученных результатов испытания туляремиальной, бруцеллезной и чумной

вакцин дополнительно при выявлении в мазках грамотрицательных палочек, отличающихся по морфологии от соответствующих вакцинных штаммов, предусмотрено исследование мазков, обработанных флуоресцентными диагностическими иммуноглобулинами, но в то же время описание морфологии искомым туляремиальным бактериям, бруцеллам и чумного микроба не приводится. Помимо этого выявлено не-

соответствие с требованиями ОФС «Стерильность» по рекомендуемой температуре 35–37 °С инкубации посевов образцов сибиреязвенной вакцины.

Сравнительный анализ фармакопейных требований ОФС и ФС ГФ РФ XIII и XIV изданий и НД производителей позволил выявить существенные методические недоработки и расхождения, затрудняющие проведение достоверной оценки и объективного представления результатов определения микробиологического загрязнения живых вакцин. Установленные проблемы, главным образом, относятся к разночтениям в наименовании показателя, полноте изложения методики и критериям оценки результатов испытания. В НД встречаются ссылки на утратившие свое действие документы – МУК 4.1/2.588-96 и ГФ РФ XII издания. На наш взгляд, наиболее остро стоит вопрос интерпретации результатов испытания, требующий детальной проработки процедур, позволяющих дифференцировать изменения среды, обусловленные ростом соответствующего вакцинного штамма от изменений, вызванных ростом контаминанта или тест-штамма микроорганизма при исследовании антимикробного действия живых вакцин. В рамках лабораторной экспертизы при отсутствии подробного изложения методики анализа и четких критериев соответствия не представляется возможным оценить ее воспроизводимость, а также качество испытуемых образцов.

Учитывая вышеизложенное, можно сделать вывод, что практически вся нормативная база в части методики выявления контаминации посторонними бактериями и грибами в живых бактериальных вакцинах нуждается в актуализации и совершенствовании с учетом специфики частных НД.

Для совершенствования требований при разработке новых нормативно-правовых документов целесообразно использовать единое наименование показателя «Отсутствие посторонних бактерий и грибов»; испытание проводить методом прямого посева на тиогликолевую среду в условиях инкубации при температурах (32,5±2,5) и (22,5±2,5) °С, так как метод мембранной фильтрации (диаметр пор 0,45 мкм мембран) для испытания живых бактериальных вакцин не применим из-за их состава; определять пригодность каждой партии тиогликолевой среды, в том числе и в отношении загрязнений, мешающих достоверному установлению контаминации в окрашенных по Граму мазках [8]. Следует оценить пригодность методики, учитывающей особенности живых вакцин, включая определение наличия/отсутствия антимикробного действия и способа его устранения, а также необходимости пробоподготовки и пересева на 5–7 сут; разработать порядок учета, интерпретации результатов и критериев оценки, в том числе характера типичного роста вакцинного штамма и способов его дифференциации от контаминантов в тиогликолевой среде, в мазках, окрашенных по Граму и специфическими флуоресцирующими диагностическими иммуноглобулинами [17].

Разработанные предложения могут также использоваться для совершенствования методик оценки качества по исследуемому показателю, способствовать снижению производственных рисков и повышению безопасности других живых вакцин для парентерального введения. В частности, это актуально для оценки качества вакцины Ку-лихорадки М-44 живой и вакцины Е сыпнотифозной комбинированной живой, содержащих взвесь живой культуры кокциелл Бернета и риккетсий Провачека соответственно, которые согласно требованиям фармакопейных статей Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания «должны быть стерильными».

Таким образом, проведенные исследования позволили определить необходимость совершенствования нормативной базы в части требований к проведению испытания живых бактериальных вакцин по выявлению контаминации посторонними бактериями и грибами. Для оценки наличия в живых бактериальных вакцинах посторонних бактерий и грибов целесообразно использовать единое наименование показателя – «Отсутствие посторонних бактерий и грибов». Разработанные предложения по гармонизации требований к оценке качества аналогичных препаратов, могут быть использованы при подготовке соответствующих нормативно-правовых документов (ОФС, ФС, НД и др.).

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590046-9).

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

#### Список литературы

1. Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ (ред. от 06.06.2019 г.) «Об обращении лекарственных средств».
2. WHO, Vaccine Standardization. 2019. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.whogis.com/biologicals/vaccines/en/> (дата обращения 18.03.2019).
3. Медуницын Н.В. Вакцинология. М.: Триада-Х, 2010. 512 с.
4. Вельц Н.Ю., Букатина Т.М., Пастернак Е.Ю., Николаева Т.Н., Романова С.В. Правила надлежащей лабораторной практики: анализ изменений законодательства. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2017; 5(1):27–31.
5. Приказ Минпромторга РФ от 14.06.2013 № 916 «Об утверждении правил организации производства и контроля качества лекарственных средств».
6. Серия технических докладов ВОЗ. 25-й доклад. ВОЗ; 1975. № 530. URL: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/41053/WHO\\_TRS\\_530\\_rus.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/41053/WHO_TRS_530_rus.pdf?sequence=2&isAllowed=y) (дата обращения 18.03.2019).
7. Lolas A. The role of microbiology in the design and development of pharmaceutical manufacturing processes. *Pharm. Bioprocess*. 2014; 2(2):125–8.
8. Gupta R.K. Role of Environmental Monitoring and Microbiological Testing During Manufacture of Sterile Drugs and Biologics. *American Pharmaceutical Review*. 2014; 17(6)46–55. URL: <https://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/169384-Role-of-Environmental-Monitoring-and-Microbiological-Testing-During-Manufacture-of-Sterile-Drugs-and-Biologics/> (дата обращения 18.03.2019).
9. Государственная фармакопея Российской Федерации, XIII издание. Москва; 2015. Т. 1–3.
10. Государственная фармакопея Российской Федерации

XIV издание. Москва; 2018. Т. 1–4.  
 11. Nunnally B.K., Turula V.E., Sitrin R.D., editors. Vaccine Analyses: Strategies, Principles, and Control. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2015. 665 p. DOI: 10.1007/978-3-662-45024-6.  
 12. Саяпина Л.В., Бондарев В.П., Олефир Ю.В. Современное состояние вакцинопрофилактики особо опасных инфекций. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; 2:107–10. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-107-110.  
 13. WHO, Environmental Monitoring of Clean Rooms in Vaccine Manufacturing Facilities, Points to consider for manufacturers of human vaccines, November, 2012. [Электронный ресурс]. URL: [http://www.who.int/immunization\\_standards/vaccine\\_quality/env\\_monitoring\\_cleanrooms\\_final.pdf](http://www.who.int/immunization_standards/vaccine_quality/env_monitoring_cleanrooms_final.pdf) (дата обращения 18.03.2019).  
 14. BCG for immunotherapy. European pharmacopoeia. 9.0.01/2011:1929.  
 15. BCG vaccine, freeze-dried European pharmacopoeia 9.0.01/2012:0163.  
 16. Суханова С.М., Захарова Н.Е. «Микробиологическая чистота» сухих питательных сред, используемых для оценки стерильности иммунобиологических лекарственных препаратов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018; 18(3):191–7. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-3-191-197.  
 17. Касина И.В., Алексеева С.А., Бердникова З.Е., Немировская Т.И., Алехина А.С. Перспективы совершенствования экспертизы качества вакцины туляремийной живой. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017; 17(4):240–7.

**References**

1. Federal Law of the Russian Federation dated April 12, 2010 No 61-FL (edit. dated June 06, 2019) «On drug circulation».  
 2. WHO, Vaccine Standardization. 2019. (Cited 18 Mar 2019). [Internet]. Available from: <http://www.whogis.com/biologicals/vaccines/en/>.  
 3. Medunitsyn N.V. [Vaccinology]. M.: “Triada-X”, 2010. 512 p.  
 4. Vel'ts N.Yu., Bukatina T.M., Pasternak E.Yu., Nikolaeva T.N., Romanova S.V. [Guidelines on good laboratory practice: analysis of the changes in legislation]. *Biobezopasnost' i Risk Farmakoterapii. [Biosafety and Risk of Pharmacotherapy]*. 2017; 5(1):27–31.  
 5. Order of the Ministry of Industry and Trade of the Russian Federation dated June 14, 2013 No 916 “On approval of the rules for organization of production and quality control of drugs”  
 6. Technical Report Series WHO. 25-th Report. WHO; 1975. No 530. [Internet] (Cited 18 Mar 2019) Available from: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/41053/WHO\\_TRS\\_530\\_rus.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/41053/WHO_TRS_530_rus.pdf?sequence=2&isAllowed=y).  
 7. Lolas A. The role of microbiology in the design and development of pharmaceutical manufacturing processes. *Pharm. Bioprocess*. 2014; 2(2):125–8.  
 8. Gupta R.K.. Role of Environmental Monitoring and

Microbiological Testing During Manufacture of Sterile Drugs and Biologics. *American Pharmaceutical Review*. 2014; 17(6)46–55. (Cited 18 Mar 2019). Available from: <https://www.american-pharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/169384-Role-of-Environmental-Monitoring-and-Microbiological-Testing-During-Manufacture-of-Sterile-Drugs-and-Biologics/>.  
 9. State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIII edition. Moscow; 2015. Vol. 1–3.  
 10. State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV edition. Moscow; 2018. Vol. 1–4.  
 11. Nunnally B.K., Turula V.E., Sitrin R.D., editors. Vaccine Analyses: Strategies, Principles, and Control. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2015. 665 p. DOI: 10.1007/978-3-662-45024-6.  
 12. Sayapina L.V., Bondarev V.P., Olefir Yu.V. [Current State of the Vaccine Prophylaxis of Particularly Dangerous Infections]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 2:107–10. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-107-110.  
 13. WHO, Environmental Monitoring of Clean Rooms in Vaccine Manufacturing Facilities, Points to consider for manufacturers of human vaccines, November, 2012. (Cited 18 Mar 2019) [Internet]. Available from: [http://www.who.int/immunization\\_standards/vaccine\\_quality/env\\_monitoring\\_cleanrooms\\_final.pdf](http://www.who.int/immunization_standards/vaccine_quality/env_monitoring_cleanrooms_final.pdf).  
 14. BCG for immunotherapy. European pharmacopoeia. 9.0.01/2011:1929.  
 15. BCG vaccine, freeze-dried European pharmacopoeia 9.0.01/2012:0163.  
 16. Sukhanova S.M., Zakharova N.E. [Microbial Quality of Dehydrated Media Used in the Sterility Testing of Immunobiological Medicinal Products]. *Biopreparaty. Profilaktika, Diagnostika, Lechenie [BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]*. 2018; 18(3):191–7. DOI: 10.30895/2221-996X-2018-18-3-191-197.  
 17. Kasina I.V., Alekseeva S.A., Berdnikova Z.E., Nemirovskaya T.I., Alekhina A.S. [Prospects for improving evaluation of live tularemia vaccine quality]. *Biopreparaty. Profilaktika, Diagnostika, Lechenie. [BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment]* 2017; 17(4):240–7.

**Authors:**

Sukhanova S.M., Sayapina L.V., Berdnikova Z.E., Tikhonova A.S., Klimov V.I. Scientific Center on Expertise of Medical Application Products. 8, Petrovsky Bulvar, Moscow, 127051, Russian Federation. E-mail: SuhanovaSM@expmed.ru.

**Об авторах:**

Суханова С.М., Саяпина Л.В., Бердникова З.Е., Тихонова А.С., Климов В.И. Научный центр экспертизы средств медицинского применения. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2. E-mail: SuhanovaSM@expmed.ru.

Поступила 29.03.19.

Принята к публ. 18.04.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-94-99

УДК 615.371:616.988

А.И. Терентьев<sup>1</sup>, В.А. Жуков<sup>1</sup>, Ар.А. Сергеев<sup>2</sup>, С.Б. Пастушенко<sup>1</sup>, С.В. Рогожкина<sup>1</sup>, С.В. Борисевич<sup>1</sup>,  
В.А. Максимов<sup>1</sup>, Ал.А. Сергеев<sup>2</sup>, К.А. Титова<sup>2</sup>, Д.О. Галахова<sup>2</sup>

### ОПЫТ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНОЙ ТАБЛЕТИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ «РЕВАКС ВЗТ»

<sup>1</sup>ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад, Российская Федерация; <sup>2</sup>ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово, Российская Федерация

**Целью** работы явилось получение таблетированной формы рекомбинантной вакцины «Ревакс ВЗТ» против гепатита В и патогенных для человека ортопоксвирусов для проведения клинических исследований. **Материалы и методы.** В качестве активного материала использовали рекомбинантный вирус вакцины, штамм b7.5S2-S, в ген тимидинкиназы которого встроен фрагмент ДНК вируса гепатита В. В работе использовали микробиологические, вирусологические, физические, физико-химические и биотехнологические методы исследований качества препарата и технологических процессов. **Результаты и обсуждение.** Результаты технологического контроля получения полуфабрикатов и готовой продукции вакцины «Ревакс ВЗТ» подтвердили возможность использования аттестованной аппаратно-технологической линии «ТЭОВак» для ее производства. Аналогичная технология может также использоваться при производстве других живых эмбриональных таблетированных оспенных вакцин. Для получения вакцинного препарата «Ревакс ВЗТ» со специфической активностью не менее  $1,0 \cdot 10^7$  ООЕ/табл. необходим сухой вирусосодержащий материал с активностью не менее  $2,0 \cdot 10^8$  ООЕ/г при сублимационном высушивании жидкого вирусосодержащего материала с активностью не менее  $1,0 \cdot 10^8$  ООЕ/г и преимущественном использовании хорионаллантоисной оболочки куриных эмбрионов в качестве субстрата накопления вирусной биомассы.

**Ключевые слова:** рекомбинантный штамм вируса вакцины, гепатит В, патогенные для человека ортопоксвирусы, таблетированная оспенная вакцина, технология, аппаратно-технологическая линия.

Корреспондирующий автор: Терентьев Александр Иванович, e-mail: 48cnii@mail.ru.

Для цитирования: Терентьев А.И., Жуков В.А., Сергеев Ар.А., Пастушенко С.Б., Рогожкина С.В., Борисевич С.В., Максимов В.А., Сергеев Ал.А., Титова К.А., Галахова Д.О. Опыт получения рекомбинантной таблетированной вакцины «Ревакс ВЗТ». *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 3:94–99. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-94-99

A.I. Terent'ev<sup>1</sup>, V.A. Zhukov<sup>1</sup>, Ar.A. Sergeev<sup>2</sup>, S.B. Pastushenko<sup>1</sup>, S.V. Rogozhkina<sup>1</sup>, S.V. Borisevich<sup>1</sup>,  
V.A. Maksimov<sup>1</sup>, Al.A. Sergeev<sup>2</sup>, K.A. Titova<sup>2</sup>, D.O. Galakhova<sup>2</sup>

### Experience in the Design and Production of Recombinant Oral Vaccine «Revax VZT»

<sup>1</sup>48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Sergiev Possad, Russian Federation;  
<sup>2</sup>State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector», Kol'tsovo, Russian Federation

**Abstract. Objective** of the work was the production of recombinant vaccine «RevaxVZT» in tablet dosage form against hepatitis B and pathogenic for humans orthopoxviruses for further clinical trials. **Materials and methods.** Recombinant strain b7.5S2-S of vaccinia virus carrying a DNA fragment of hepatitis B virus inserted into thymidinekinase gene was used as an active component of the vaccine. Microbiological, virological, physical, physical and chemical, and biotechnological methods were used for studying the quality of the drug and technological processes. **Results and discussion.** Results of technological control for semi-finished products and final products of the vaccine “Revax VZT” showed the possibility of using certified hardware-processing line of “TEOVac” for its manufacturing. Same technology can be potentially used with other live tableted embryo smallpox vaccines too. For the development of the vaccine “Revax VZT” with the specific activity of not less than  $1.0 \cdot 10^7$  PFU/tablet, it is necessary to use a dry virus-containing material with activity not less than  $2.0 \cdot 10^8$  PFU/g which is produced by freeze-drying of liquid virus-containing preparation with the activity of not less than  $1.0 \cdot 10^8$  PFU/g, preferentially propagated from chorionic allantoic membranes of chicken embryos as a substrate for viral biomass accumulation.

**Key words:** recombinant strain of vaccinia virus, hepatitis B, orthopoxviruses pathogenic for humans, smallpox vaccine in tablets, technology, hardware-processing line.

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

Corresponding author: Alexander I. Terent'ev, e-mail: 48cnii@mail.ru.

Citation: Terent'ev A.I., Zhukov V.A., Sergeev Ar.A., Pastushenko S.B., Rogozhkina S.V., Borisevich S.V., Maksimov V.A., Sergeev Al.A., Titova K.A., Galakhova D.O. Experience in the Design and Production of Recombinant Oral Vaccine «Revax VZT». *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 3:94–99. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-94-99  
Received 19.07.19. Revised 13.08.19. Accepted 23.09.19.

Разработка средств медицинской защиты от опасных и особо опасных инфекционных заболеваний, а также создание их производств представляет собой одно из приоритетных направлений био-

логической безопасности населения Российской Федерации [1].

Повсеместное распространение вируса гепатита В делает эту инфекцию значительной проблемой

для здравоохранения России и показывает недостаточную защищенность населения, особенно в эндемичных регионах, что требует отечественного недорогого и эффективного профилактического препарата и тактики его применения.

Другой немаловажной проблемой является иммунопрофилактика ортопоксвирусных инфекций. Однако в условиях отмены оспопрививания и постоянно снижающегося противооспенного популяционного иммунитета следует ожидать большого количества поствакцинальных осложнений при проведении такого рода мероприятий. Кроме того, использование парентеральных как оспенных, так и гепатитных вакцин существенно увеличивает риск заражения прививаемых [2].

Одним из способов оптимизации прививочной кампании, снижения частоты поствакцинальных осложнений и удешевления стоимости вакцинных препаратов является использование поливалентных рекомбинантных вакцин [3, 4]. Успехи в биотехнологии и генной инженерии позволили получать рекомбинантные вакцинные штаммы, в ДНК которых встроены гены протективных белков различных возбудителей. Иммунизация этими рекомбинантами приводит к формированию иммунитета как к вектору, так и к экспрессируемым чужеродным антигенам [5–7]. Одним из наиболее изученных является использование вируса осповакцины (далее по тексту – вируса вакцины) в качестве вектора для экспрессии протективных белков вируса гепатита В [8, 9].

В ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», сконструирован рекомбинантный штамм «Ревакс В» на основе вируса вакцины, штамм Л-ИВП, в ген которого встроены фрагмент ДНК вируса гепатита В [10]. В ходе исследований специалистами ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России выявлена контаминация «Ревакс В» исходным штаммом Л-ИВП. В дальнейшем штамм «Ревакс В» реклонирован с целью освобождения его от популяции родительского штамма Л-ИВП. В результате отбора нескольких клонов, не содержащих ген тимидинкиназы (ТК) вируса вакцины и экспрессирующих НВsAg, получен генетически однородный ТК-минус штамм. По результатам репродуктивной активности отобран клон 3 этого штамма (вакцинный штамм b7,5S2-S, условно получивший название «Ревакс В3»). Данные исследования подтверждены рестрикционным анализом, а также методами ИФА и ПЦР. На основе этого штамма разработана живая рекомбинантная вакцина для профилактики гепатита В и натуральной оспы, лиофилизат для накожного применения [11].

При конструировании экспериментальной таблетированной формы вакцины на основе штамма «Ревакс В3», адаптированного к куриным эмбрионам (КЭ) пассажами на хорионаллантоисной оболочке (ХАО), обоснована принципиальная возможность пероральной иммунизации против гепатита В и патогенных для человека ортопоксвирусов [12, 13].

**Целью** работы явилось получение таблетированной формы рекомбинантной вакцины «Ревакс В3Т» против гепатита В и патогенных для человека ортопоксвирусов для проведения клинических исследований.

## Материалы и методы

Исследования проводили с использованием рекомбинантного вируса вакцины (штамм b7,5S2-S), в ген тимидинкиназы которого встроены фрагмент ДНК вируса гепатита В, кодирующий синтез белков НВsAg и pre-S2-Ag. В качестве основного продуцента биологического активного материала для производства использовали КЭ 12-суточного возраста (куры породы «Радонеж»).

Для определения чувствительности КЭ к вирусу вакцины параллельно с определением специфической активности испытуемого образца на той же партии КЭ проводили титрование отраслевого стандартного образца ОСО 42-28-113-07П, полученного из Центра экспертизы и контроля МИБП ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития РФ (паспорт серии № 130406).

Для оценки качества полупродуктов и готовой продукции использовали утвержденные нормативными документами вирусологические, микробиологические и физико-химические методы контроля.

Наработку препарата рекомбинантной таблетированной вакцины «Ревакс В3Т» проводили на лицензированной производственной базе ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России по технологии, основанной на получении таблетированной эмбриональной живой оспенной вакцины «ТЭОВак» и практически ей идентичной (промышленный регламент ПР 08534994-01-08) [14].

## Результаты и обсуждение

Исследования в области пероральной иммунизации свидетельствуют о том, что введение различных штаммов вируса вакцины (Л-ИВП, Б-51 и др.) в дозе от  $1,0 \cdot 10^6$  до  $1,0 \cdot 10^7$  оспинообразующих единиц (ОЕ) приводит к формированию полноценного иммунного ответа у людей, а также у чувствительных к вирусу вакцины лабораторных животных [4]. Однако результаты изучения свойств рекомбинантных штаммов вируса вакцины, «ущербных» по ТК-минус гену, свидетельствуют о более низкой, по сравнению с ТК-плюс родительскими штаммами, реактогенности, нейровирулентности, и, как правило, более высокой дозе вируса, необходимой для индукции полноценного вакцинального процесса [15, 16]. Согласно этим данным, иммунизирующая доза для рекомбинантов вируса вакцины возрастает в среднем в 10–100 раз, в зависимости от методики вакцинации. Следовательно, для производства эффективной таблетированной вакцины необходимо получение биоматериала с повышенной концентрацией вируса.

Таблица 1 / Table 1

Результаты технологического контроля оценки качества жидкого вирусосодержащего материала  
The results of technological control of liquid virus-containing material quality assessment

Наименование показателя, ед. измерения Name of indicator, measuring units	Требования НД Normative requirements	Результаты анализа* партий Results of analysis* of batches		
		№ 10	№ 11	№ 12
Инфицирующая доза, ООЕ в 0,2 мл Infectious Dose, PFU in 0.2 ml	$1,0 \cdot 10^4 - 1,0 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^4$	$3,6 \cdot 10^4$	$4,5 \cdot 10^4$
Специфическая активность жидкого вирусосодержащего материала, ООЕ/г Specific activity of liquid virus-containing material, PFU/g	$\geq 3,0 \cdot 10^7$	$2,8 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^7$	$2,8 \cdot 10^8$
Микробиологическая чистота: Microbiological purity:				
- содержание аэробных непатогенных бактерий, КОЕ/г the content of aerobic non-pathogenic bacteria, CFU/g	$\leq 1000$	810	850	575
- содержание дрожжевых и плесневых грибов (суммарно), КОЕ/г the content of yeast and mould content (total), CFU/g	$\leq 100$	<10	<10	<10
- содержание <i>Enterobacteriaceae: Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus</i> the content of <i>Enterobacteriaceae: Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus</i>	Отсутствие Absence	Отсутствие Absence	Отсутствие Absence	Отсутствие Absence

Примечание: \*средние данные трех измерений.

Note: \*average of three measurements.

Технологическая схема получения вакцины «Ревакс ВЗТ» состояла из следующих стадий: получение жидкого вирусосодержащего материала, получение сухого вирусосодержащего материала, приготовление таблеточной массы, приготовление готового препарата (таблеток жевательных), упаковка и маркировка готовой продукции.

Для достижения сравнительных величин показателя специфической активности таблеток по количеству оспинообразующих единиц при вскрытии кондиционных инфицированных КЭ в асептических условиях использовали всю ХАО (партия 10), ХАО и плодики КЭ (партия 11) и часть ХАО (зону с максимальной интенсивностью воспаления и площадью поражения – партия 12). Анализ результатов технологического контроля оценки качества жидкого вирусосодержащего материала, представленных в табл. 1, свидетельствует о том, что при одинаковой заражающей дозе штамма «Ревакс ВЗ» активность гомогената ХАО на порядок выше, по сравнению с гомогенатом ХАО и плодиков (партия 11), что может указывать на избирательность репродукции рекомбинантного вируса вакцины в тканях и органах КЭ в пользу ХАО.

По полученным данным, для производства вакцины «Ревакс ВЗТ» целесообразно проводить отбор только ХАО, учитывая факт более сниженной репродуктивной способности и иммуногенности у рекомбинантного штамма, чем у родительского. Поэтому наработка серий вакцины с активностью более  $3,0 \cdot 10^6$  ООЕ/табл., при активности жидкого вирусосодержащего материала не выше  $1,5 \cdot 10^7$  ООЕ/г и даже максимальном содержании сухого вирусосодержащего материала в таблеточной массе (30 %), потребует формирования таблеток массой более 1 г и диаметром 15 мм и выше. Это не отвечает требованиям нормативной документации (диаметр таблеток до 12 мм).

С учетом степени инаktivации вируса при сублимационном высушивании жидкого биопрепарата за счет изменения фазового состояния материала, активность сухого вирусосодержащего материала  $1,0 \cdot 10^8$  ООЕ/г и более, достигается при активности жидкого вирусосодержащего материала не менее  $1,0 \cdot 10^8$  ООЕ/г. Последнее возможно лишь при условии выделения из зараженных КЭ только ХАО, желательнее даже тех ее участков, где наблюдается максимальная интенсивность скопления оспин. Показатели качества партий 10 и 12 жидкого вирусосодержащего материала не выходят за пределы установленных нормативной документацией требований.

Сухой вирусосодержащий материал получали на сублимационной сушильной установке модели FD5518 фирмы «Skadi® Europe» (Нидерланды). Анализ результатов технологического контроля оценки качества полученных партий сухого вирусосодержащего материала, приведенных в табл. 2, иллюстрирует то, что специфическая активность партий сухого вирусосодержащего материала варьировала в пределах  $(3,2 \pm 0,1) \cdot 10^8$  ООЕ/г, что определяло возможность их использования по данному показателю для приготовления серий таблеток с требуемой активностью.

Согласно прописи, в состав таблетированного препарата «Ревакс ВЗТ» входят сухой вирусосодержащий материал до 30 % и ингредиенты наполнителя от 70 %.

Расчет приготовления таблеточной массы для наработки серий вакцины с требуемой активностью и параметров таблеток при прессовании производили согласно регламенту ПР 08534994-01-08. Приготовление таблеточной массы, прессование таблеток, их обеспыливание проводили на оборудовании, входящем в состав аппаратно-технологической линии.

Результаты операционного контроля процесса

Таблица 2 / Table 2

**Результаты технологического контроля оценки качества сухого вирусосодержащего материала**  
**The results of the technological control of dry virus-containing material quality assessment**

Наименование показателя, ед. измерения Name of indicator, measuring units	Требования НД Normative requirements	Результаты анализа* партий Results of analysis* of batches	
		№ 10	№ 12
Выход материала после сушки (по массе), процент The yield after drying (by weight), percent	≥20,0	24,5	23,9
Потеря в массе при высушивании, процент Mass loss on drying, percent	≤3,0	2,8	2,6
Специфическая активность сухого вирусосодержащего материала, ООЕ/г The specific activity of the dry virus-containing material, PFU/g	≥3,0·10 <sup>7</sup>	3,1·10 <sup>8</sup>	3,3·10 <sup>8</sup>
Выход материала после сушки (по суммарной активности), процент The yield after drying (total activity), percent	≥20,0	27,4	28,1

Примечание: \*средние данные трех измерений.  
 Note: \*average of three measurements.

приготовления таблеток и анализа проб (выборки), представленные в табл. 3, свидетельствуют о том, что качество наработанных серий препарата по всем показателям соответствует требованиям норматив-

ной документации.

Таким образом, на основании проведенных исследований установлено, что технологический контроль за процессом получения полуфабрикатов и го-

Таблица 3 / Table 3

**Показатели качества серий таблеток вакцины «Ревакс ВЗТ»**  
**Quality indicators of series of “Revax VZT” vaccine tablets**

Наименование показателя, ед. измерения Name of indicator, measuring units	Требования НД Normative requirements	Результаты анализа* серии Results of analysis* of series	
		№ 10	№ 12
Средняя масса, г Average weight, g	0,1000–1,0000	0,6366	0,3972
Диаметр (D <sub>т</sub> ), мм Diameter (D <sub>t</sub> ), Mm	6–12	12	10
Отклонение от средней массы, % Deviation from the average weight,% - среднее (для таблеток массой 0,3 г и более) average (for tablets weighing 0.3 g or more) - макс. превышение max. excess	±5,0	2,6 Max <sup>+</sup> = 5,0	3,8 Max <sup>+</sup> = 4,7
Потеря в массе при высушивании, % Mass loss on drying, %	≥3,0	1,8	2,0
Прочность на истирание, % Abrasion resistance, %	≥97,0	98,7	99,8
Распадаемость, мин Disintegration, min	30,0	25,0	22,0
Микробиологическая чистота: Microbiological purity: - содержание аэробных непатогенных бактерий, КОЕ/табл. the content of aerobic non-pathogenic bacteria, CFU/tablet - содержание дрожжевых и плесневых грибов (суммарно), КОЕ/табл. the content of yeast and mould content (total), CFU/tablet - содержание <i>Enterobacteriaceae: Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus</i> the content of <i>Enterobacteriaceae: Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus</i>	≥1000 ≥100 Отсутствие Absence	566 < 10 Отсутствие Absence	200 <10 Отсутствие Absence
Подлинность (содержание на ХАО КЭ однотипных оспин диаметром от 0,5 до 3,0 мм), % Authenticity ( presence of one type pock, 0,5–3,0 in diameter), %	100	100	100
Специфическая активность выборки, ООЕ/табл. Specific activity of the panel, PFU/tablet	1,0·10 <sup>6</sup> – 4,0·10 <sup>7</sup>	2,7·10 <sup>7</sup>	2,4·10 <sup>7</sup>

Примечание: \*средние данные трех измерений.  
 Note: \*average of three measurements.

товой продукции «Ревакс ВЗТ» продемонстрировал возможность использования имеющейся аттестованной аппаратно-технологической линии производства «ТЭОВак» для наработки живых эмбриональных таблетированных оспенных вакцин по аналогичной технологии.

Сниженная репродуктивная способность рекомбинантного вируса вакцины (штамм «Ревакс ВЗ»), культивируемого в куриных эмбрионах обуславливает целесообразность преимущественного использования хорионаллантоисной оболочки в качестве субстрата накопления вирусной биомассы даже при получении вакцины с более низкой активностью.

Для получения препарата «Ревакс ВЗТ» со специфической активностью не менее  $1,0 \cdot 10^7$  ООЕ/табл. необходим сухой вирусодержащий материал с активностью не менее  $2,0 \cdot 10^8$  ООЕ/г при сублимационном высушивании жидкого вирусодержащего материала с активностью не менее  $1,0 \cdot 10^8$  ООЕ/г.

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

#### Список литературы

1. Основы государственной политики Российской Федерации в области обеспечения химической и биологической безопасности на период до 2025 года и дальнейшую перспективу: указ Президента Российской Федерации от 11.03.2019 г. № 97 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/72092478/> (дата обращения 11.03.2019).
2. Buonaguro F.M., Tornesello M.L., Buonaguro L. The XIX century smallpox prevention in Naples and the risk of transmission of human blood related pathogens. *J. Transl. Med.* 2015; 13:33. DOI: 10.1186/s12967-015-0400-9.
3. Okoli A., Okeke M.I., Tryland M., Moens U. CRISPR/Cas9 – advancing orthopoxvirus genome editing for vaccine and vector development. *Viruses.* 2018; 10(1). pii: E50. DOI: 10.3390/v10010050.
4. Подкуйко В.Н., Воробьев А.А., Краснянский В.П., Патрикеев Г.Т., Михайлов В.В., Дорохина Т.В., Махлай А.А., Дыканов Г.А. Пероральная иммунизация – способ повышения безопасности рекомбинантного вектора (вируса вакцины). *Вестник Российской академии медицинских наук.* 1993; 2:39–45.
5. Pavot V., Sebastian S., Turner A.V., Matthews J., Gilbert S.C. Generation and production of modified vaccinia virus Ankara (MVA) as a vaccine vector. *Methods Mol. Biol.* 2017; 1581:97–119. DOI: 10.1007/978-1-4939-6869-5\_6.
6. Omura N., Yoshikawa T., Fujii H., Shibamura M., Inagaki T., Kato H., Egawa K., Harada S., Yamada S., Takeyama H., Saijo M. A novel system for constructing a recombinant highly-attenuated vaccinia virus strain (LC16m8) expressing foreign genes and its application for the generation of LC16m8-based vaccines against Herpes Simplex virus 2. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2018; 71(3):229–33. DOI: 10.7883/yoken.JIID.2017.458.
7. Li Y., Chen S., Fang J., Zhu Y., Bai B., Li W., Yin X., Wang J., Liu X., Han J., Li X., Sun L., Jin N. Construction of an attenuated Tian Tan vaccinia virus strain by deletion of TA35R and TJ2R genes. *Virus Res.* 2018; 256:192–200. DOI: 10.1016/j.virusres.2018.06.017.
8. Cavanaugh J.S., Awi D., Mendy M., Hill A.V., Whittle H., McConkey S.J. Partially randomized, non-blinded trial of DNA and MVA therapeutic vaccines based on hepatitis B virus surface protein for chronic HBV infection. *PLoS One.* 2011; 6(2):e14626. DOI: 10.1371/journal.pone.0014626.
9. Backes S., Jäger C., Dembek C.J., Kosinska A.D., Bauer T., Stephan A.S., Dislers A., Mutwiri G., Busch D.H., Babiuk L.A., Gasteiger G., Protzer U. Protein-prime/modified vaccinia virus Ankara vector-boost vaccination overcomes tolerance in high-antigenic HBV-transgenic mice. *Vaccine.* 2016; 34(7):923–32. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.12.060.
10. Муратов П.Ю., Беляев А.С., Дмитриев И.П., Нетесов С.В., Рукавишников М.Ю. Живая рекомбинантная вакцина для профилактики гепатита В и натуральной оспы для кожного применения и способ ее получения. Патент РФ на изобретение № 2073524(13) от 13.05.1999 г.
11. Павлова Л.И., Горбунов М.А., Борисова В.Н., Красильников И.В., Носкова А.В., Лыцарь Б.Н., Скворцов С.В.,

Беляева Е.А., Яковлева И.М., Коровин Ю.П., Бельченко А.В., Титов И.А., Буданов М.В. Отечественная рекомбинантная вакцина против гепатита В (результаты контролируемых испытаний). *Вопросы вирусологии.* 1996; 41(4):170–2.

12. Ведерников Б.Ф., Генералов В.М., Евтин Н.К., Кочнева Г.В., Михеев М.В., Нетесов С.В., Петриченко В.А., Пьянков О.В., Сандахчиев Л.С., Сафатов А.С., Сергеев А.А., Сергеев А.Н., Шишкин А.В., Шишкина Л.Н. Таблетированная живая рекомбинантная бивакцина «Ревакс ВКТ» против натуральной оспы и гепатита В и способ ее получения. Патент РФ № 2242246 от 15.02.2002 г.

13. Плясунов И.В., Сергеев А.А., Сергеев Ал.А., Петриченко В.А., Шишкина Л.Н., Генералов В.В., Сафатов А.С., Сандахчиев Л.С., Удут В.В., Мельников С.А., Подкуйко В.Н. Клинические исследования рекомбинантной бивакцины против оспы и гепатита В для орального применения в условиях двукратной вакцинации. *Вопросы вирусологии.* 2006; 51(2):31–5.

14. Бондарев В.П., Терентьев А.И., Мельников С.А., Бондарева Т.А. Внедрение таблетированной оспенной вакцины ТЭОВак в серийное производство для обеспечения биологической безопасности населения Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2010; 2:66–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-2(104)-66-68.

15. Чернов В.И., Челяпов Н.В., Антонова Т.П., Ралихина Л.Е., Унанов С.С., Альштейн А.Д., Захарова Л.Г., Фодор И.И., Бендукидзе К.А., Комаров Ф.И., Бельшев Б.П., Дмитриев А.В., Анджапаридзе О.Г. Проверка безопасности, прививаемости, реактогенности и антигенных свойств живой рекомбинантной оспенно-гепатитной В-вакцины в опыте на добровольцах. *Вопросы вирусологии.* 1990; 35(2):132–5.

16. Graham B.S., Belshe R.B., Clements M.L., Dolin R., Corey L., Wright P.F., Gorse G.J., Midthun K., Keefer M.C., Roberts N.J., Schwartz D.H., Agosti J.M., Fernie B.F., Stablein D.M., Montefiori D.C., Lambert J.S., Hu S.-L., Esterlitz J.R., Lawrence D.N., Koff W.C. Vaccination of vaccinia-naïve adults with human immunodeficiency virus type 1 gp160 recombinant vaccinia virus in a blinded, controlled, randomized clinical trial. *J. Infect. Diseases.* 1992; 166(2):244–52. DOI: 10.1093/infdis/166.2.244.

#### References

1. Fundamentals of the state policy of the Russian Federation in the field of ensuring chemical and biological safety for the period up to 2025 and beyond: Decree of the President of the Russian Federation of March 11, 2019 No. 97. (Cited 11 Mar 2019). [Internet]. Available from: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/72092478/>.
2. Buonaguro F.M., Tornesello M.L., Buonaguro L. The XIX century smallpox prevention in Naples and the risk of transmission of human blood related pathogens. *J. Transl. Med.* 2015; 13:33. DOI: 10.1186/s12967-015-0400-9.
3. Okoli A., Okeke M.I., Tryland M., Moens U. CRISPR/Cas9 – advancing orthopoxvirus genome editing for vaccine and vector development. *Viruses.* 2018; 10(1). pii: E50. DOI: 10.3390/v10010050.
4. Podkuyko V.N., Vorobyov A.A., Krasnyansky V.P., Patrikeev G.T., Mikhailov V.V., Dorokhina T.V., Makhlay A.A., Dykanov G.A. Oral immunization is a way to increase the safety of a recombinant vector (vaccine virus). [*Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*]. 1993; 2:39–45.
5. Pavot V., Sebastian S., Turner A.V., Matthews J., Gilbert S.C. Generation and production of modified vaccinia virus Ankara (MVA) as a vaccine vector. *Methods Mol. Biol.* 2017; 1581:97–119. DOI: 10.1007/978-1-4939-6869-5\_6.
6. Omura N., Yoshikawa T., Fujii H., Shibamura M., Inagaki T., Kato H., Egawa K., Harada S., Yamada S., Takeyama H., Saijo M. A novel system for constructing a recombinant highly-attenuated vaccinia virus strain (LC16m8) expressing foreign genes and its application for the generation of LC16m8-based vaccines against Herpes Simplex virus 2. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2018; 71(3):229–33. DOI: 10.7883/yoken.JIID.2017.458.
7. Li Y., Chen S., Fang J., Zhu Y., Bai B., Li W., Yin X., Wang J., Liu X., Han J., Li X., Sun L., Jin N. Construction of an attenuated Tian Tan vaccinia virus strain by deletion of TA35R and TJ2R genes. *Virus Res.* 2018; 256:192–200. DOI: 10.1016/j.virusres.2018.06.017.
8. Cavanaugh J.S., Awi D., Mendy M., Hill A.V., Whittle H., McConkey S.J. Partially randomized, non-blinded trial of DNA and MVA therapeutic vaccines based on hepatitis B virus surface protein for chronic HBV infection. *PLoS One.* 2011; 6(2):e14626. DOI: 10.1371/journal.pone.0014626.
9. Backes S., Jäger C., Dembek C.J., Kosinska A.D., Bauer T., Stephan A.S., Dislers A., Mutwiri G., Busch D.H., Babiuk L.A., Gasteiger G., Protzer U. Protein-prime/modified vaccinia virus Ankara vector-boost vaccination overcomes tolerance in high-antigenic HBV-transgenic mice. *Vaccine.* 2016; 34(7):923–32. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.12.060.
10. Muratov P.Yu., Belyaev A.S., Dmitriev I.P., Netesov S.V., Rukavishnikov M.Yu. Live recombinant vaccine for the preven-

tion of hepatitis B and smallpox for cutaneous use and method for its preparation. RF patent for the invention No. 2073524(13) dated 13.05.1999.

11. Pavlova L.I., Gorbunov M.A., Borisova V.N., Krasilnikov I.V., Noskova A.V., Lytsar B.N., Skvortsov S.V., Belyakova E.A., Yakovleva I. M., Korovin Yu.P., Belchenko A.V., Titov I.A., Budanov M.V. Domestic recombinant hepatitis B vaccine (results of controlled trials). *Voprosy virusologii [Problems of virology]*. 1996; 41(4):170–2.

12. Vedernikov B.F., Generalov V.M., Evtin N.K., Kochneva G.V., Mikheev M.V., Netesov S.V., Petrishchenko V.A., Pyankov O.V., Sandakhchiev L. S., Safatov A.S., Sergeev A.A., Sergeev A.N., Shishkin A.V., Shishkina L.N. Tableted live recombinant bivalent vaccine “Revax VKT” against smallpox and hepatitis B and the method for its preparation. RF patent No. 2242246 of 15.02.2002.

13. Plyasunov I.V., Sergeev A.A., Sergeev A.I., Petrishchenko V.A., Shishkina L.N., Generalov V.V., Safatov A.S., Sandakhchiev L.S., Udut V. V., Melnikov S.A., Podkuyko V.N. Clinical studies of recombinant bi-vaccine against smallpox and hepatitis B for oral administration in conditions of double vaccination. *Voprosy virusologii [Problems of virology]*. 2006; 51(2):31–5.

14. Bondarev V.P., Terentyev A.I., Melnikov S.A., Bondareva T.A. The introduction of TEOVac smallpox vaccine into serial production to ensure the biological safety of the population of the Russian Federation. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2010; 2:66–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-2(104)-66-68.

15. Chernos V.I., Chelyapov N.V., Antonova T.P., Ralikhina L.E., Unanov S.S., Altstein A.D., Zakharova L.G., Fodor I.I., Bendukidze K. A., Komarov F.I., Belyshev B.P., Dmitriev A.V., Andzhaparidze O.G. Testing the safety, vaccination, reactogenicity and antigenic properties of a live recombinant smallpox and hepatitis B vaccine in a volunteer experiment. *Voprosy virusologii [Problems of virology]*. 1990; 35(2):132–5.

16. Graham B.S., Belshe R.B., Clements M.L., Dolin R., Corey L., Wright P.F., Gorse G.J., Midthun K., Keefer M.C., Roberts N.J.,

Schwartz D.H., Agosti J.M., Fernie B.F., Stablein D.M., Montefiori D.C., Lambert J.S., Hu S.-L., Esterlitz J.R., Lawrence D.N., Koff W.C. Vaccination of vaccinia-naïve adults with human immunodeficiency virus type 1 gp160 recombinant vaccinia virus in a blinded, controlled, randomized clinical trial. *J. Infect. Diseases*. 1992; 166(2):244–52. DOI: 10.1093/infdis/166.2.244.

#### Authors:

*Terent'ev A.I., Zhukov V.A., Pastushenko S.B., Rogozhkina S.V., Borisevich S.V., Maksimov V.A.* 48th Central Research Institute of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Sergiev Possad, Russian Federation. E-mail: 48cnii@mil.ru.

*Sergeev A.A., Sergeev A.I., Titova K.A., Galakhova D.O.* State Scientific Centre of Virology and Biotechnology “Vector”. Kol'tsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russian Federation. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

#### Об авторах:

*Терентьев А.И., Жуков В.А., Пастушенко С.Б., Рогожкина С.В., Борисевич С.В., Максимов В.А.* 48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации. Российская Федерация, 141306, Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, д. 11. E-mail: 48cnii@mil.ru.

*Сергеев А.А., Сергеев А.И., Титова К.А., Галахова Д.О.* Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор». Российская Федерация, 630559, Новосибирская обл., п. Кольцово. E-mail: vector@vector.nsc.ru.

Поступила 19.07.19.

Отправлена на доработку 13.08.19.

Принята к публ. 23.09.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-100-105

УДК 616.932(665.2)

Д.В. Уткин<sup>1</sup>, Е.В. Найденова<sup>1</sup>, К.А. Никифоров<sup>1</sup>, А.В. Бойко<sup>1</sup>, Д.А. Агафонов<sup>1</sup>, М.Н. Ляпин<sup>1</sup>,  
А.А. Лопатин<sup>2</sup>, I. Bangoura<sup>3</sup>, T.D. Camara<sup>3</sup>, S. Boumbaly<sup>3</sup>, M.Y. Boiro<sup>3</sup>**ИЗУЧЕНИЕ ИММУННОЙ ПРОСЛОЙКИ К ВОЗБУДИТЕЛЮ ХОЛЕРЫ У ЛИЦ, ПРОЖИВАЮЩИХ  
НА ТЕРРИТОРИИ ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ**<sup>1</sup>ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация;<sup>2</sup>ФКУЗ «Противочумный центр», Москва, Российская Федерация;<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи, Киндия, Гвинейская Республика

Для достоверной оценки наличия иммунной прослойки к возбудителю холеры необходимым является определение уровня специфических антител в сыворотке крови людей. Для выявления специфических противохолерных антител применяют серологические методы, направленные на выявление агглютинирующих, вибриоцидных и токсиннейтрализующих антител. В то же время указанные методы имеют ряд существенных недостатков, которые могут быть устранены при использовании биологических микрочипов, направленных на выявление специфических антител. **Цель работы** – оценка уровня формирования иммунной прослойки к возбудителю холеры у лиц, проживающих на территории Гвинейской Республики, с использованием биологического микрочипа. **Материалы и методы.** Исследовано 190 образцов сывороток крови людей, проживающих на территории трех провинций Гвинейской Республики. Образцы собраны в период с мая по октябрь 2016 г. Выявление специфических антител к антигенам *V. cholerae* осуществляли с использованием иммуночипа в непрямом анализе. В качестве специфических антигенов для сенсibilизации поверхности иммуночипа использовали O-антигены *V. cholerae* и холерный токсин. **Результаты и обсуждение.** В результате анализа с применением иммуночипа специфические антитела к O1 и O139 антигенам холерных вибрионов ни в одном из случаев не выявлены. В то же время в 66 исследованных пробах (34,7 %) обнаружены антитела к холерному токсину, из них в 59 образцах – в титре 1:100, в одном – в титре 1:400, в двух – в титре 1:800, в четырех образцах – в титре 1:1600. Отмечено отсутствие статистически значимых различий в зависимости от половой принадлежности обследованных и территории их проживания. Полученные результаты можно объяснить тем, что антитела к холерному токсину циркулируют в сыворотке крови человека более длительное время, чем антитела, специфичные к O1 и O139 антигенам холерного вибриона. Проведенные исследования продемонстрировали наличие в сыворотках антител класса IgG, комплементарных к холерному токсину, что может свидетельствовать как о контакте населения с возбудителем холеры, так и о формировании поствакцинального иммунитета.

**Ключевые слова:** иммунная прослойка, холера, серологическая диагностика, антитела, иммуночип, Гвинейская Республика.

Корреспондирующий автор: Уткин Денис Валерьевич, e-mail: rusrap1@microbe.ru.

Для цитирования: Уткин Д.В., Найденова Е.В., Никифоров К.А., Бойко А.В., Агафонов Д.А., Ляпин М.Н., Лопатин А.А., Bangoura I., Camara T.D., Boumbaly S., Boiro M.Y. Изучение иммунной прослойки к возбудителю холеры у лиц, проживающих на территории Гвинейской Республики. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; 3:100–105. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-100-105

D.V. Utkin<sup>1</sup>, E.V. Naidenova<sup>1</sup>, K.A. Nikiforov<sup>1</sup>, A.V. Boiko<sup>1</sup>, D.A. Agafonov<sup>1</sup>, M.N. Lyapin<sup>1</sup>,  
A.A. Lopatin<sup>2</sup>, I. Bangoura<sup>3</sup>, T.D. Camara<sup>3</sup>, S. Boumbaly<sup>3</sup>, M.Y. Boiro<sup>3</sup>**The Study of the Immune Layer to the Cholera Agent in Individuals Living in the Republic of Guinea**<sup>1</sup>Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russian Federation; <sup>2</sup>«Plague Control Center», Moscow, Russian Federation; <sup>3</sup>Research Institute of Applied Biology of Guinea, Kindia, Republic of Guinea

**Abstract.** For a reliable assessment of the presense of the immune layer to cholera agent, it is necessary to determine the level of specific antibodies in human blood serum. To detect specific anti-cholera antibodies serological methods are used, aimed to identify agglutinating, vibriocidal and toxin neutralizing antibodies. At the same time, the stated methods have several drawbacks which can be eliminated when using biological microarrays to detect specific antibodies. **Object of work.** Assessment of the level of the immune layer to cholera agent in individuals residing in the territory of the Republic of Guinea, using a biological microchip. **Materials and methods.** 190 blood serum samples of people living on the territory of three provinces of the Republic of Guinea, collected over the period of May–October 2016 were studied. The detection of specific antibodies to antigens of *V. cholerae* was performed using the immunochip for serodiagnosis in the indirect analysis. *V. cholerae* O-antigens and cholera toxin were used as specific antigens for sensibilization of the immunochip surface. **Results and discussion.** As a result of the analysis, using immunochip, specific antibodies to O1 and O139-antigens of *V. cholerae* at the titer of 1:100 were not detected in any of the cases. At the same time, antibodies to cholera toxin were found in 66 samples (34.7 %); titers varied from 1:100 to 1:1600, being 1:100 in 59 samples, 1:400 – in 1 sample, 1:800 – in 2 samples, 1:1600 – in 4 samples. The absence of statistically significant differences depending on the gender of the examined people and the territory of their residence was noted. The obtained results can be explained by the fact that antibodies to cholera toxin are more resistant and circulate longer in human serum than antibodies to O-antigens. Studies have demonstrated the presence of IgG antibodies complementary to cholera toxin in sera, which may indicate both the contact of the population with the cholera pathogen and the formation of post-vaccinal immunity.

**Keywords:** immune layer, cholera, serological diagnostics, antibodies, immunochip, Republic of Guinea.

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

**Corresponding author:** Denis V. Utkin, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

**Citation:** Utkin D.V., Naidenova E.V., Nikiforov K.A., Boiko A.V., Agafonov D.A., Lyapin M.N., Lopatin A.A., Bangoura I., Camara T.D., Boubaly S., Boiro M.Y. The Study of the Immune Layer to the Cholera Agent in Individuals Living in the Republic of Guinea. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*, 2019; 3:100–105. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-100-105

Received 01.08.19. Revised 26.08.19. Accepted 02.09.19.

В настоящее время сохраняется напряженная обстановка по холере. Ежегодно в мире заболевает в среднем 100–300 тыс. человек [1]. В 2017–2018 гг. наблюдались серьезные эпидемии холеры в Йемене, Сомали, Демократической Республике Конго, Нигерии, Южном Судане [1, 2]. Холера является эндемичным заболеванием для многих стран Западной Африки (Нигерия, Бенин, Того, Гана, Либерия, Гвинея), где регистрируются как крупные вспышки данной инфекции, так и спорадические случаи заболевания людей. В 2012 г. в Гвинейской Республике зарегистрирована крупная вспышка холеры – 7350 случаев, в том числе 133 летальных, в 2013 г. в стране зарегистрировано 319 случаев заболевания холерой [3]. Одним из сдерживающих факторов распространения холерной инфекции является проведение своевременных противоэпидемических и профилактических мероприятий. С целью предупреждения заболеваний холерой в стране проведена массовая вакцинация местного населения [3]. В контексте оценки уровня формирования иммунной прослойки на территории регионов, где регистрировали случаи холеры и проводилась массовая вакцинация, важно знать, какая доля людей имеет специфические антитела к возбудителю холеры. Из-за неоднократных инфекций бактериальными энтеропатогенами, вырабатывающие энтеротоксины, сходные по своей природе и структуре с холерным токсином [4], у людей, проживающих в условиях с низким уровнем санитарии, могут наблюдаться антитоксические антитела [5], что затрудняет достоверную оценку формирования иммунной прослойки.

Для выявления специфических противохолерных антител применяют серологические методы, направленные на выявление агглютинирующих, вибриоцидных и токсиннейтрализующих антител [6]. В большинстве случаев для выявления антител к возбудителю холеры в сыворотке крови человека используется развернутая реакция агглютинации (РА) со штаммами *Vibrio cholerae* O1 (серовары Огава и Инаба) и O139 серогрупп [6]. Применение регламентированного метода определения токсиннейтрализующих антител в реакции пассивной гемагглютинации в настоящее время затруднено из-за отсутствия зарегистрированных диагностических препаратов. Рекомендуемые для выявления противотоксических антител реакции двойной иммунодиффузии в геле, иммуноэлектрофореза [7] характеризуются низкой чувствительностью (5–100 мкг/мл антител) [8]. Длительность времени анализа объемной реакции агглютинации (18 ч), необходимость применения в иммунохимических реакциях штаммов холерных вибрионов, низкая чув-

ствительность агглютинационных тестов, отсутствие диагностических препаратов создают определенные трудности при проведении мониторинговых исследований и эпидемиологического анализа и обуславливают актуальность разработки иммунодиагностических препаратов, обеспечивающих высокую производительность, информативность и быстроту выполнения проводимого анализа. Таким требованиям удовлетворяют тест-системы, созданные на основе иммунологических биочипов (иммуночипов), по своей чувствительности приближенные к методу иммуноферментного анализа (10 нг/мл) [8, 9].

Ранее разработан биологический микрочип для выявления противохолерных антител в сыворотке крови человека [10]. Биологический микрочип содержит O-антигены *V. cholerae* O1 серогруппы сероваров Огава, Инаба, O139 серогруппы и термолабильный холерный токсин (ХТ). В иммунологическом анализе с использованием гомо- и гетерологичных сывороток, а также сывороток крови людей, больных холерой, установлена 100 % диагностическая чувствительность и специфичность данного иммуночипа с возможностью выявления антител классов G и M к указанным антигенам [11].

**Целью** данной работы является оценка уровня формирования иммунной прослойки к возбудителю холеры у лиц, проживающих на территории Гвинейской Республики, с использованием биологического микрочипа.

Гвинейская Республика относится к странам, где периодически регистрируются как крупные вспышки холеры (2012 г.), так и спорадические случаи заболевания людей [12, 13]. С целью предупреждения заболевания холерой в стране проведена массовая вакцинация местного населения [3]. Для оценки эффективности вакцинации населения в Институте Пастера разработан иммунохроматографический тест для выявления циркулирующих в крови антигенов – липополисахаридов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп [14]. Однако указанный тест не позволял оценить уровень образования специфических антител.

## Материалы и методы

Исследования проводили российские и гвинейские специалисты на базе Исследовательского института прикладной биологии Гвинеи (Киндия, Гвинейская Республика).

Для анализа сформирована панель из 190 сывороток крови людей, проживающих на территории трех провинций Гвинейской Республики (Kindia,

Mamou, Faranah), где ранее отмечались случаи заболевания холерой с последующей массовой вакцинацией [3, 12]. Образцы крови собраны в период с мая по октябрь 2016 г. от людей, не имеющих симптомов острых кишечных инфекций. Подготовку сывороток к работе осуществляли в соответствии с МУК 4.2.2315-08 [6]. Для выявления противохолерных антител в качестве метода сравнения использовали микрометод РА [6].

Для определения противохолерных антител применяли ранее разработанный биологический микрочип [10, 11], представляющий собой стеклянный слайд с аминотифицированной поверхностью (Corning, США), на котором иммобилизовали очищенные специфические О-антигены *V. cholerae* и ХТ, предоставленные к.м.н. О.В. Громовой и к.б.н. Т.Л. Захаровой (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»). Для исключения ложноположительных реакций с антителами к токсинам *Escherichia coli*, в панель антигенов иммуночипа включили препарат термолабильного энтеротоксина *E. coli* (Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН).

Антигены наносили на слайды в трех повторениях методом контактной печати с использованием персонального миниplotтера «ХачтMicroarrayer» (LabNEXT, США). Препараты антигенов разводили в сорбционном буфере до конечной концентрации 1 мг/мл. При печати набор антигенов группировали в виде 16 идентичных зон – эрреев (рис. 1).

Сорбцию антигенов проводили в течение 1 ч при температуре 37 °С. Свободные сайты связы-

вания поверхности стекла блокировали 0,5 % раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) в течение 30 мин при температуре 37 °С с последующей отмывкой фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ). Для проведения анализа на одном слайде нескольких образцов на слайд накладывали 16-луночную инкубационную камеру (Whatman, Великобритания), формирующую 16 лунок, соответствующих 16 эрреям биочипа. Слайд с инкубационной камерой фиксировали в рамке-держателе (Whatman, Великобритания).

Исследуемые сыворотки разводили в ФСБ 1:100 и вносили в лунки биологического микрочипа в объеме 100 мкл. Сыворотки инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С на термошейкере при скорости вращения платформы 300 об./мин. После инкубации слайды дважды отмывали ФСБ. Затем в лунки биочипа вносили по 100 мкл конъюгата антивидовых козьих антител в рабочем разведении 1:500, меченых AlexaFluor 633 и AlexaFluor 647 (Invitrogen, США), направленных против иммуноглобулинов человека классов G и M соответственно, после чего проводили инкубацию в течение 30 мин при температуре 37 °С на термошейкере при скорости вращения платформы 300 об./мин. Слайды дважды отмывали ФСБ и дистиллированной водой. Высушивание биочипа осуществляли путем центрифугирования в центрифужных пробирках объемом 50 мл в течение 1 мин при скорости вращения ротора 1000 об./мин.

Результаты тестирования сывороток регистрировали с помощью флуоресцентного сканера «GenePix 4100A» (Molecular Devices, США). Результат считали положительным при превышении уровня флуоресценции в исследуемой зоне в 2 раза выше уровня флуоресценции отрицательного контроля. В качестве отрицательного контроля использовали ФСБ. Сыворотки, в которых выявлены антитела к антигенам возбудителя холеры, в последующем титровали от 1:100 до 1:1600 с целью определения титра антител.

При статистической обработке материала рассчитывали долю серопозитивных образцов в каждой выборке с 95 % доверительными интервалами по методу Уилсона [15] с использованием онлайн-калькулятора WassarStats: Web Site for Statistical Computation [<http://vassarstats.net/prop1.html>].

## Результаты и обсуждение

По результатам анализа в РА, агглютинирующие антитела к возбудителю холеры в исследуемых сыворотках не обнаружены. В виду отсутствия регламентированных средств выявления антитоксических антител оценку их наличия проводили только с применением экспериментального иммуночипа.

В результате проведенных исследований с использованием иммуночипа антитела классов G и M к О-антигенам *V. cholerae* и к термолабильному энтеротоксину *E. coli* в исследуемых сыворотках не выявлены. В то же время в 66 образцах (34,7 % с до-

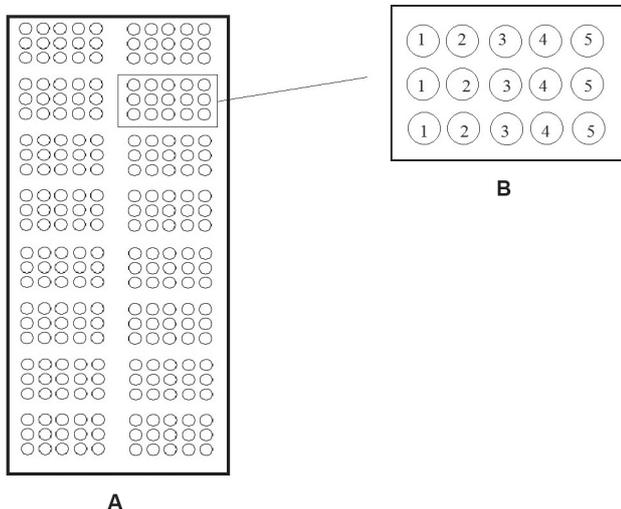


Рис. 1. Расположение антигенов на слайде (А) и в пределах одного эррея (В):

1 – О1-антиген *V. cholerae* Огава, 2 – О1-антиген *V. cholerae* Инаба, 3 – О-антиген *V. cholerae* О139, 4 – термолабильный энтеротоксин *E. coli*, 5 – холерный токсин

Fig. 1. Position of antigens in the slide (А) and within the limits of one array (В):

1 – O1-antigen of *Vibrio cholerae* serovar Ogawa, 2 – O1-antigen of *Vibrio cholerae* serovar Inaba, 3 – O-antigen of *Vibrio cholerae* O139, 4 – thermolabile enterotoxin of *E. coli*, 5 – cholera toxin

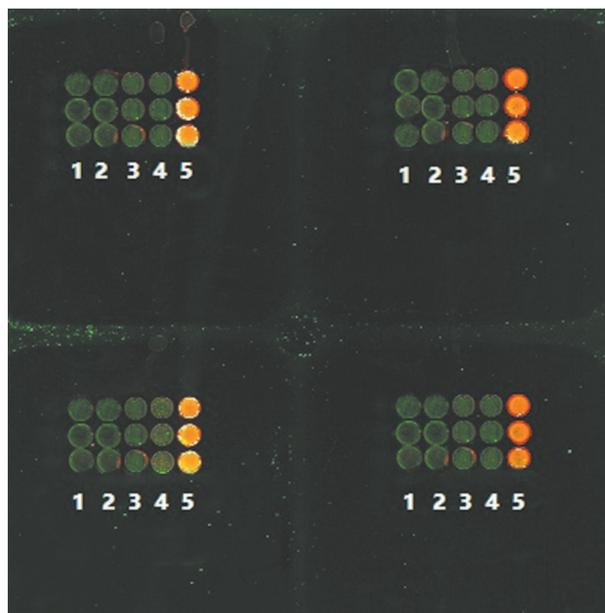


Рис. 2. Флуоресцентный профиль четырех образцов сывороток крови:

1 – O1-антиген *V. cholerae* Огава, 2 – O1-антиген *V. cholerae* Инаба, 3 – O-антиген *V. cholerae* O139, 4 – термолabile энтеротоксин *E. coli*, 5 – холерный токсин

Fig. 2. Fluorescent profile of four blood sera samples:

1 – O1-antigen of *Vibrio cholerae* serovar Ogawa, 2 – O1-antigen of *Vibrio cholerae* serovar Inaba, 3 – O-antigen of *Vibrio cholerae* O139, 4 – thermolabile enterotoxin of *E. coli*, 5 – cholera toxin

верительным интервалом 28,3–41,8 %) обнаружены антитела класса IgG, специфически реагирующие с ХТ (рис. 2).

В зависимости от района исследования доля проб, содержащих антитела к ХТ, колебалась от 29,1 до 53,3 % (таблица).

Выраженная трансгрессия доверительных интервалов свидетельствует об отсутствии статистически значимых различий доли серопозитивных образцов в различных районах сбора материала (рис. 3).

Антитела к холерному токсину встречались в сыворотках крови у женщин в 42 случаях из 115 (36,5 %, доверительный интервал 28,3–45,6 %), у мужчин в 24 случаях из 75 (32,0 %, доверительный интервал 22,5–43,2 %). Отмечено отсутствие статистически значимых различий в зависимости от половой принадлежности обследованных. Наибольшая частота встречае-

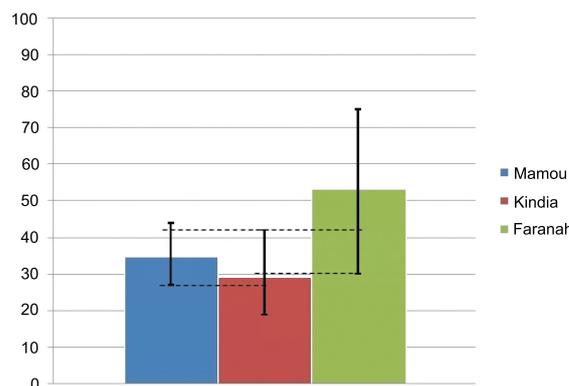


Рис. 3. Доля серопозитивных проб (%) с указанием 95 % доверительного интервала. Штриховой линией указаны границы трансгрессии

Fig. 3. The share of seropositive samples (%) with indication of 95 % confidence interval. Dashed line shows transgression edges

мости положительных проб наблюдалась в возрастной группе 25–35 лет – 34,9 % от всех положительных проб с доверительным интервалом 24,5–46,9 %.

В дальнейшем сыворотки, в которых выявлены антитела к холерному токсину, исследованы в разведениях от 1:100 до 1:1600. По результатам анализа, титр антител составил 1:100 – в 59 образцах, 1:400 – в одном, 1:800 – в двух, 1:1600 – в четырех образцах.

Полученные результаты можно объяснить тем, что антитела к холерному токсину циркулируют в сыворотке крови человека более длительное время, чем антитела специфичные к O1 и O139 антигенам холерного вибриона. Так, в опытах на добровольцах установлено, что антитоксические антитела обнаруживаются в сыворотке крови человека не менее 25 месяцев (срок наблюдения) после инфицирования [5].

Проведенная работа позволила оценить уровень формирования иммунной прослойки к возбудителю холеры. Полученные результаты продемонстрировали высокий уровень антител, комплементарных к холерному токсину в сыворотках крови людей, проживающих в провинциях Гвинейской Республики. Обнаружение антител класса IgG к холерному токсину может свидетельствовать как о контакте населения с возбудителем холеры, так и о формировании поствакцинального иммунитета.

Результаты выявления антител класса IgG к холерному токсину в сыворотках крови людей, проживающих в разных провинциях Гвинейской Республики

Detection of IgG antibodies to cholera toxin in blood sera of people living in different provinces of the Republic of Guinea

Провинция Province	Кол-во исследованных образцов The number of studies samples	Кол-во образцов с выявленными антителами к ХТ The number of samples with identified antibodies to CT	Доля серопозитивных проб, % (доверительный интервал) The share of seropositive samples, % (confidence interval)
Mamou	120	42	35,0 (27,0–43,9)
Kindia	55	16	29,1 (18,8–42,1)
Faranah	15	8	53,3 (30,1–75,2)
Итого / Total:	190	66	34,7 (28,3–41,8)

Полученные результаты говорят о необходимости предварительного определения фонового уровня противохолерных антител в сыворотке крови людей перед началом вакцинации и ревакцинации для достоверной оценки формирования поствакцинального иммунитета.

Данная работа проведена в соответствии с Распоряжением Правительства РФ от 25 июля 2015 г. № 1448-р «О российско-гвинейском научно-техническом сотрудничестве в области эпидемиологии, профилактики и мониторинга бактериальных и вирусных инфекций в Гвинейской Республике». Исследование выполнялось в рамках НИР 61-1-16 «Изучение этиологической структуры и молекулярно-генетическая характеристика возбудителей холеры и диарейных заболеваний» (2015–2017 гг.).

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

### Список литературы

1. Москвитина Э.А., Янович Е.Г., Кругликов В.Д., Титова С.В., Куриленко М.П., Пичурина Н.Л., Водопьянов А.С., Левченко Д.А., Иванова С.М., Водопьянов С.О., Олейников И.П. Прогноз по холере на 2019 г. на основании анализа эпидемиологической обстановки в мире, СНГ и России в 2009–2018 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 1:64–73. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-64-73.
2. World Health Organization. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2018, 93(38):489–500. [Электронный ресурс]. URL: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274654/WER9338.pdf?ua=1> (дата обращения 15.07.2019).
3. Grout L., Martinez-Pino I., Ciglenecki I., Keita S., Diallo A.A., Traore B., Delamou D., Toure O., Nicholas S., Rusch B., Staderini N., Serafini M., Grais R.F., Luquero F.J. Pregnancy Outcomes after a Mass Vaccination Campaign with an Oral Cholera Vaccine in Guinea: A Retrospective Cohort Study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(12):e0004274. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004274.
4. Гришин Е.В., Валякина Т.И. Получение моноклональных антител к холерному токсину и термолабильному энтеротоксину *E. coli* для разработки библиксного анализа токсинов в объектах окружающей среды. *Biotechnologia Acta*. 2013; 6(4):19–32. DOI: 10.15407/biotech6.04.019.
5. Levine M.M., Young C.R., Hughes T.P., O'Donnel S., Black R.E., Clements M.L., Robins-Browne R., Lim Y.-L. Duration of serum antitoxin response following *Vibrio cholerae* infection in North Americans: relevance for seroepidemiology. *Am. J. Epidemiol.* 1981; 114(3):348–54. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a113201.
6. Методические указания. МУК 4.2.2315-08 «Серологические методы в диагностике холеры». Дополнение к МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры». Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г.Г. Онищенко 18 января 2008 года.
7. Онищенко Г.Г., Брагина И.В., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Шеенков Н.В., Балахонов С.В., Урбанович Л.Я., Ганин В.С., Миронова Л.В., Загоскина Т.Ю., Носкова О.А., Куликалова Е.С., Басов Е.А., Токарева Л.Е., Тайкова Т.С., Долгова Т.М. Руководство к практическим занятиям по лабораторной диагностике холеры. Иркутск; 2012. 92 с.
8. Кэйти Д., редактор. Антитела. Методы. М.: Мир; 1991. Т. 1. 287 с.
9. Yuan J., Wang E., Fox B. A Immune Monitoring Technology Primer: protein microarray («seromics»). *J. Immunother. Cancer*. 2016; 4:2. DOI: 10.1186/s40425-016-0106-4.
10. Уткин Д.В., Осина Н.А., Киреев М.Н., Спицын А.Н., Щербаква С.А. Биологический микрочип для выявления и многопараметрического анализа противохолерных антител. Патент РФ № 2528099, опубл. 10.09.2014 г. Бюл. № 25.
11. Уткин Д.В., Осина Н.А., Спицын А.Н., Киреев М.Н., Громова О.В., Захарова Т.Л., Найденова Е.В., Куклев В.Е. Разработка биочипа для выявления противохолерных антител в сыворотке крови человека. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 60(2):50–3.
12. Rebaudet S., Mengel M.A., Koivogui L., Moore S.,

Mutreja A., Kande Y., Yattara O., Keita V.S., Njanpop-Lafourcade B.-M., Fournier P.-E., Garnotel E., Keita S., Piarroux R. Deciphering the Origin of the 2012 Cholera Epidemic in Guinea by Integrating Epidemiological and Molecular Analyses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(6):e2898. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002898.

13. World Health Organization. Cholera. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2014; 89(31):345–56. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.who.int/wer/2014/wer8931.pdf?ua=1> (дата обращения 15.07.2019).

14. Martinez-Pino I., Luquero F.J., Sakoba K., Sylla S., Haile M., Grais R.F., Ciglenecki I., Quilici M.-L., Page A.-L. Use of a Cholera Rapid Diagnostic Test during a Mass Vaccination Campaign in Response to an Epidemic in Guinea, 2012. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7(8):e2366. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002366.

15. Гржибовский А.М. Доверительные интервалы для частот и долей. *Экология человека*. 2008; 5:57–60.

### References

1. Moskvitina E.A., Yanovich E.G., Kругlikov V.D., Titova S.V., Kurilenko M.L., Pichurina N.L., Vodop'yanov A.S., Levchenko D.A., Ivanova S.M., Vodop'yanov S.O., Oleynikov I.P. [Cholera Forecast for the Year 2019 Based on Assessment of Epidemiological Situation Around the World, Across CIS and Russia in 2009-2018]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 1:64–73. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-1-64-73.
2. World Health Organization. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2018, 93(38):489–500. (Cited 15 July 2019). [Internet]. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274654/WER9338.pdf?ua=1>.
3. Grout L., Martinez-Pino I., Ciglenecki I., Keita S., Diallo A.A., Traore B., Delamou D., Toure O., Nicholas S., Rusch B., Staderini N., Serafini M., Grais R.F., Luquero F.J. Pregnancy Outcomes after a Mass Vaccination Campaign with an Oral Cholera Vaccine in Guinea: A Retrospective Cohort Study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(12):e0004274. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004274.
4. Grishin E.V., Valyakina T.I. [Obtaining of monoclonal antibodies against cholera toxin and heat labile enterotoxin of *E. coli* for development of the toxins duplex analysis in environmental specimens]. *Biotechnologia Acta*. 2013; 6(4):19–32. DOI: 10.15407/biotech6.04.019.
5. Levine M.M., Young C.R., Hughes T.P., O'Donnel S., Black R.E., Clements M.L., Robins-Browne R., Lim Y.-L. Duration of serum antitoxin response following *Vibrio cholerae* infection in North Americans: relevance for seroepidemiology. *Am. J. Epidemiol.* 1981; 114(3):348–54. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a113201.
6. Methodological Regulations. MR 4.2.2315-08 “Serological methods in cholera diagnosis”. Supplement to MR 4.2.2218-07 “Laboratory diagnostics of cholera”. Approved by the Head of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human welfare, Chief State Sanitary Officer of the Russian Federation, G.G. Onishchenko on January 18, 2008.
7. Onishchenko G.G., Bragina I.V., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Sheenkov N.V., Balakhonov S.V., Urbanovich L.Ya., Ganin V.S., Mironova L.V., Zagorskina T.Yu., Noskova O.A., Kulikalova E.S., Basov E.A., Tokareva L.E., Taikova T.S., Dolgova T.M. [Guidelines for practice classes on laboratory diagnosis of cholera]. Irkutsk; 2012. 92 p.
8. Katty D., editor. [Antibodies. Methods]. M.: “Mir”; 1991. Vol. 1. 287 p.
9. Yuan J., Wang E., Fox B. A Immune Monitoring Technology Primer: protein microarray («seromics»). *J. Immunother. Cancer*. 2016; 4:2. DOI: 10.1186/s40425-016-0106-4.
10. Utkin D.V., Osina N.A., Kireev M.N., Spitsyn A.N., Shcherbakova S.A. [Biological microchip for the detection and multi-parameter analysis of anti-cholera antibodies]. RF Patent No 2528099, publ. September 10, 2014. Bulletin No. 25.
11. Utkin D.V., Osina N.A., Spitsyn A.N., Kireev M.N., Gromova O.V., Zakharova T.L., Naidenova E.V., Kuklev V.E. [The development of biochip to detect anti-cholera antibodies in human blood serum]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika [Russian Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2015; 60(2):50–3.
12. Rebaudet S., Mengel M.A., Koivogui L., Moore S., Mutreja A., Kande Y., Yattara O., Keita V.S., Njanpop-Lafourcade B.-M., Fournier P.-E., Garnotel E., Keita S., Piarroux R. Deciphering the Origin of the 2012 Cholera Epidemic in Guinea by Integrating Epidemiological and Molecular Analyses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(6):e2898. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002898.
13. World Health Organization. Cholera. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2014; 89(31):345–56. (Cited 15 July 2019). [Internet]. Available from: <http://www.who.int/wer/2014/wer8931.pdf?ua=1>.
14. Martinez-Pino I., Luquero F.J., Sakoba K., Sylla S., Haile M., Grais R.F., Ciglenecki I., Quilici M.-L., Page A.-L. Use of a Cholera Rapid Diagnostic Test during a Mass Vaccination Campaign in Response to an Epidemic in Guinea, 2012. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7(8):e2366. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002366.

15. Grzhibovsky A.M. [Confidence intervals for proportions]. *Ekologiya Cheloveka [Human Ecology]*. 2008; 5:57–60.

**Authors:**

*Utkin D.V., Naidenova E.V., Nikiforov K.A., Boiko A.V., Agafonov D.A., Lyapin M.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@nlm.ru.

*Bangoura I., Camara T.D., Boumbaly S., Boiro M.Y.* Research Institute of Applied Biology of Guinea. Kindia, Republic of Guinea.

**Об авторах:**

*Уткин Д.В., Найденова Е.В., Никифоров К.А., Бойко А.В., Агафонов Д.А., Ляпин М.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@nlm.ru.

*Bangoura I., Camara T.D., Boumbaly S., Boiro M.Y.* Научно-исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи. Киндия, Гвинейская Республика.

Поступила 01.08.19.

Отправлена на доработку 26.08.19.

Принята к публ. 02.09.19

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-106-110

УДК 579.842:616-07

Д.М. Фролов, Т.В. Сенина, Т.В. Замарина, Н.П. Храпова

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕАКЦИИ ЛАТЕКС-АГГЛЮТИНАЦИИ В УСКОРЕННОМ ОПРЕДЕЛЕНИИ ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ**

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

**Цель.** Разработка препарата для идентификации *Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei*, выращенных на плотной питательной среде, на этапе экспресс-диагностики патогенных буркхольдерий. **Материалы и методы.** За основу взят метод латекс-агглютинации, в котором в качестве носителя агглютининов применяют взвеси полимеров. Агент, распознающий антиген клеток-мишеней, представлял собой моноклональные антитела, направленные к эпитопам гликопротеина капсулы возбудителя мелиоидоза. Жидкий латексный диагностикум готовили из взвеси полимерного полистирола с диаметром микросфер 0,8–1,1 мкм, поверхность которого нагружали предварительно подобранной концентрацией антител. В работе использовали типичные штаммы возбудителей мелиоидоза и сапа с полноценной антигенной структурой, а также близкородственные и гетерологичные микроорганизмы. Из бактериальных культур готовили взвеси с концентрацией  $1,0 \cdot 10^9$  м.к./мл. Реакцию проводили на подогретых до 37 °С стеклянных чашках Петри с визуальной регистрацией результатов по 4-крестовой системе. **Результаты и обсуждение.** Реакция латекс-агглютинации основана на агглютинации микробных клеток (*B. pseudomallei* и *B. mallei*) моноклональными антителами, узнающими эпитопы гликопротеина капсулы патогенных буркхольдерий. Проверено 14 моноклональных антител различных по классу и эпитопной направленности. Определяющими факторами для выбора антитела являлись специфичность их в реакции агглютинации со штаммы возбудителей мелиоидоза и сапа, а также сохранение агглютинирующей активности после иммобилизации на полимерном носителе. В итоге, в качестве агента, распознающего антиген клеток-мишеней, выбрали моноклональные антитела иммуноглобулина класса G к эпитопам гликопротеина капсулы (АГ 8) возбудителя мелиоидоза. В результате после смешивания проб с диагностикумом в образцах, содержащих бактерии *B. pseudomallei* и *B. mallei*, через 10–15 мин образовывался агглютинат, видимый невооруженным глазом. Пробы с близкородственными и гетерологичными микроорганизмами агглютината не имели и регистрировались как отрицательные. Полученный диагностикум характеризуется высокой специфичностью.

**Ключевые слова:** моноклональные антитела (МКА), латексные микрочастицы, патогенные буркхольдерии, реакция латекс-агглютинации (РЛА), чувствительность, специфичность.

Корреспондирующий автор: Фролов Дмитрий Михайлович, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.  
Для цитирования: Фролов Д.М., Сенина Т.В., Замарина Т.В., Храпова Н.П. Использование реакции латекс-агглютинации в ускоренном определении патогенных буркхольдерий. Проблемы особо опасных инфекций. 2019; 3:106–110. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-106-110

D.M. Frolov, T.V. Senina, T.V. Zamarina, N.P. Khrapova

**Application of Latex-Agglutination for Rapid Detection of Pathogenic Burkholderia**

Volgograd Anti-Plague Research Institute, Volgograd, Russian Federation

**Abstract. The aim.** Development of a drug for the identification of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* grown in solid nutrient medium at the stage of rapid diagnosis of pathogenic burkholderia. **Materials and methods.** Latex agglutination method, in which suspensions of polymers are used as a carrier of agglutinins. The agent recognizing the antigen of the target cells is a monoclonal antibody directed to the epitopes of the glycoprotein capsule of melioidosis causative agent. A liquid latex diagnosticum was prepared from a suspension of polymer polystyrene with a microsphere diameter of 0.8–1.1  $\mu\text{m}$ , the surface of which was loaded with a pre-selected concentration of antibodies. We used typical strains of melioidosis and glanders agents with a full antigenic structure, as well as closely related and heterologous microorganisms. Suspensions with a concentration of  $1.0 \cdot 10^9$  m.c./ml were prepared from bacterial cultures. The reaction was carried out on glass Petri dishes heated to 37 °C with visual recording of the results using four cross system. **Results and discussion.** The latex agglutination reaction is based on agglutination of microbial cells (*B. pseudomallei* and *B. mallei*) with monoclonal antibodies that recognize the epitopes of the glycoprotein capsule of pathogenic burkholderia. 14 monoclonal antibodies of different class and epitope orientation were checked. The determining factors for antibody selection was their specificity in agglutination reaction with strains of melioidosis and glanders agents, as well as preservation of agglutinating activity after immobilization on a polymer carrier. As a result, monoclonal antibodies of class G immunoglobulin to capsule glycoprotein epitopes (AG 8) of the melioidosis agent were selected as an agent recognizing the target cell antigen. As a result, after mixing the samples with the diagnosticum, in samples containing *B. pseudomallei* and *B. mallei* bacteria, visible agglutinate generates in 10–15 min. Samples with closely related and heterologous microorganisms lacked agglutinate and were registered as negative. The obtained diagnosticum is characterized by high specificity.

**Key words:** monoclonal antibodies (MAbs), latex microparticles, *Burkholderia*, latex agglutination test, sensitivity, specificity.

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

Corresponding author: Dmitry M. Frolov, e-mail: vari2@sprint-v.com.ru.  
Citation: Frolov D.M., Senina T.V., Zamarina T.V., Khrapova N.P. Application of Latex-Agglutination for Rapid Detection of Pathogenic Burkholderia. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 3:106–110. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-106-110  
Received 10.06.19. Revised 17.09.19. Accepted 24.09.19.

Грамотрицательные бактерии *Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei* являются этиологическими агентами мелиоидоза и сапа соответственно. Обе буркхольдерии относят к вероятным агентам биотерроризма [1]. Возбудитель мелиоидоза – это микроорганизм, входящий в состав микробиоты почвы и воды стоячих водоемов. В настоящее время эндемичными по мелиоидозу считаются страны Юго-Восточной Азии, Бразилия, Пуэрто-Рико и Северная Австралия. Заражение людей обычно происходит алиментарным путем при употреблении инфицированной воды и пищи, аэрогенным путем при вдыхании бактерий с частицами пыли и контактным путем в случае попадания контаминированного материала на поврежденные участки кожи. Особенностью мелиоидоза считается оппортунистический характер инфекции, когда болезнь не проявляет себя длительное время, а потом быстро развивается до пневмонии и септицемии с высокой степенью летальности. Сап – зоонозная инфекция, регистрируемая в странах Аравийского полуострова, Турции, Монголии, Индии, Китае, Индонезии и Филиппинах [2]. В основном случаи заражения человека связаны с профессиональной деятельностью (ветеринары, сотрудники лабораторий и др.).

В неэндемичных странах возможность инфицирования возбудителями мелиоидоза и сапа обуславливается туристическим, миграционным и торгово-экономическим факторами, что не исключает опасности завоза этих инфекций на территорию нашей страны. В России достоверного случая заболевания мелиоидозом не зафиксировано. Сап считается ликвидированной инфекцией (не учитывая случаи внутрилабораторного заражения), поэтому микробиологи различных лабораторных служб не имеют достаточного опыта в части практической работы с этими патогенами, что препятствует эффективному обнаружению возбудителей. При этом своевременная диагностика мелиоидоза и сапа снижает вероятность тяжелых последствий для здоровья заболевшего, лечение которого требует специальной схемы антибиотикотерапии [3]. Согласно зарубежной градации *B. pseudomallei* and *B. mallei* также классифицируют как «агенты выбора первого уровня» (Tier 1 select agent) в качестве биологических агентов биотерроризма, поэтому методы быстрого определения этих бактерий необходимы для обеспечения эффективного реагирования при возникновении чрезвычайной ситуации.

Лабораторное подтверждение присутствия микроорганизмов *B. pseudomallei* и *B. mallei* в пробах, поступивших на исследование, опирается на схему выявления патогенных биологических агентов II группы патогенности, которая занимает от 48 до 72 ч [4]. Успешное выполнение всех этапов регла-

ментированной схемы идентификации зависит от многих факторов, например наличия селективных сред для культивирования предполагаемого патогена, специальных лабораторных условий (боксовые помещения с ламинарными шкафами биологической безопасности III класса защиты) и подготовка персонала [5]. Коммерчески доступные системы автоматизированных методов определения микроорганизмов (API 20NE, Phoenix и VITEK) также используют в идентификации инфекционных агентов, однако для биохимического тестирования следует использовать свежеприготовленные взвеси культур, при этом важно отметить разброс точности результатов от 63 до 81 % в зависимости от региональной принадлежности исследуемых бактериальных образцов [6]. Ускоряющие получение результата методы идентификации, такие как полимеразная цепная реакция и секвенирование, используются лишь в специализированных лабораториях или референс-центрах. Современные схемы индикации и идентификации *B. pseudomallei* и *B. mallei* включают в себя как высокотехнологичные, так и относительно простые в исполнении методы. В последнее время возрастает интерес к экспресс-методам, доступным для применения как в стационарных лабораториях любой степени оснащенности, так и в полевых условиях, однако стоит помнить, что они позволяют получить лишь предварительный ответ.

Реакция латекс-агглютинации является качественным методом экспресс-диагностики изолятов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, выращенных на плотной или жидкой питательной среде. Сообщают о высокой чувствительности (до 95,1 %) и специфичности (до 99,7 %) метода при условии культивирования бактерий на кровяном агаре [7, 8].

**Целью** работы явилась Разработка препарата для идентификации *Burkholderia pseudomallei* и *Burkholderia mallei*, выращенных на плотной питательной среде, на этапе экспресс-диагностики патогенных буркхольдерий.

## Материалы и методы

В работе использовали моноклональные антитела (МКА) из коллекции лаборатории иммунодиагностики ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт». Отобраны следующие варианты МКА: к эпитопам экспонированным на Ag 8 (гликопротеин капсулы), общим для Ag 8 и Ag 6 (фрагмент липополисахарида клеточной стенки) и, взаимодействующие с эпитопом 200 kDa в составе капсулы возбудителя мелиоидоза. Накопление препаративных количеств иммуноглобулинов производили *in vivo*.

Латексный диагностикум готовили из взвеси

коммерческого полимерного полистирола с диаметром микрочастиц 0,8–1,1 мкм. Для этого 10 % суспензию латексных частиц дважды отмывали центрифугированием в 0,9 % растворе NaCl (pH 7,2±0,2) при 5000 об./мин 10 мин. Затем микрочастицы сенсибилизировали антителами в количестве 100 мкг на 500 мкл 1 % суспензии полимера в 0,9 % растворе NaCl (pH 7,2±0,2), в течение 2 ч при температуре (37±1) °С. Далее нагруженный латекс дважды отмывали 1 % раствором бычьего сывороточного альбумина (БСА) при 5000 об./мин 10 мин. До конечной 1 % концентрации препарат доводили раствором 1 % БСА и оставляли на 16 ч при (4±1) °С.

Использовали типичные штаммы возбудителей мелиоидоза и сапа с полноценной антигенной структурой из коллекции Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, а также штаммы двух близкородственных (*B. thailandensis*, *B. cepacia*) и двух гетерологичных (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*) видов микроорганизмов.

Выбраны 4 штамма возбудителя сапа, 12 штаммов возбудителя мелиоидоза, 6 – близкородственных и 4 – гетерологичных микроорганизма для контроля специфичности диагностикума. Бактериальные культуры высевали в бульон Хоттингера с 5 % глицерина, pH (7,0±0,2) и инкубировали при температуре (37±1) °С в течение 18–24 ч. Затем подросшие культуры высевали на агар Хоттингера с 5 % глицерина и инкубировали в течение 24–48 ч при температуре (37±1) °С. Опыт проводили с суточными бактериальными культурами, из которых готовили взвеси в концентрации 1–2 · 10<sup>9</sup> м.к./мл.

Реакцию латекс-агглютинации проводили на подогретых в термостате до (37±1) °С стеклянных чашках Петри. К бактериальным взвесям и контролю (0,9 % раствор NaCl (pH 7,2±0,2)), предварительно нанесенным на поверхность чашки в виде капли, добавляли экспериментальный препарат латекса в соотношении 1:1 (капля 20 мкл). Учет реакции осу-

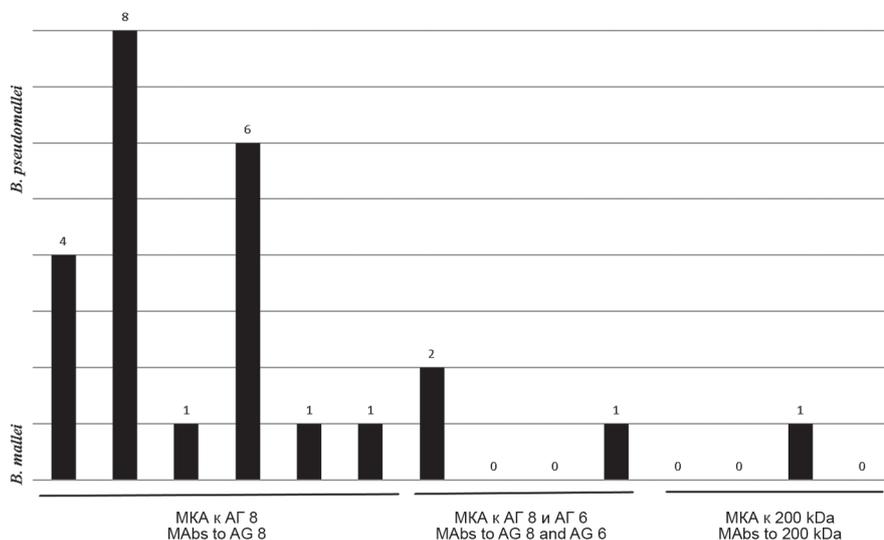
ществляли через 10–15 мин, степень агглютинации оценивали по 4-крестовой системе, положительной считали реакцию на 3 и 4 креста.

### Результаты и обсуждение

Латекс-тесты благодаря своим аналитическим характеристикам, удобству и простоте в использовании получили широкое распространение в практике лабораторной диагностики, в том числе экспресс-диагностики возбудителей инфекционных заболеваний. Они не требуют дорогостоящего оборудования и реактивов, позволяют проводить как единичные, так и серийные исследования, обладают достаточной чувствительностью и специфичностью.

На сегодняшний период времени существуют как отечественные, так и зарубежные коммерческие медицинские изделия для постановки реакции латекс-агглютинации, имеющие различные области применения, например индикация, идентификация и типирование микроорганизмов [9–11]. Латексные диагностикумы изготавливают по методам, основанным на сенсибилизации полимерных частиц антигенами или антителами, затем регистрируют формирование агглютината – продукта взаимодействия антигена с гомологичным антителом в ходе серологической реакции.

Разработку диагностикума начали с проверки агглютинационной активности МКА в отношении взвесей с концентрацией 1·10<sup>9</sup> м.к./мл, приготовленных из семи штаммов *B. pseudomallei* и одного *B. mallei*, выращенных на плотной питательной среде, обладающих типичными для этих микроорганизмов культуральными и биохимическими свойствами. Всего проверено 14 МКА в концентрации 10 мг/мл различных по классу и эпитопной направленности (рисунок). Определяющим фактором для выбора антитела являлась специфичность в реакции агглютинации со штаммами возбудителей мелиоидоза и сапа. В итоге, в качестве распознающего антиген



Агглютинация семи штаммов *B. pseudomallei* и одного штамма *B. mallei*, в концентрации 1·10<sup>9</sup> м.к./мл, моноклональными антителами, в концентрации 10 мг/мл, различными по классу и эпитопной направленности

Agglutination of 7 *B. pseudomallei* and 1 *B. mallei* strains at a concentration of 1·10<sup>9</sup> cfu/ml, by monoclonal antibodies at a concentration of 10 mg/ml, different in class and epitope orientation

клеток-мишеней агента выбрали МКА иммуноглобулина класса G к эпитомам гликопротеина капсулы (АГ 8) возбудителя мелиоидоза.

Реакция латекс-агглютинации (РЛА) основана на агглютинации микробных клеток моноклональными антителами, узнающими эпитопы гликопротеина капсулы патогенных буркхольдерий. Антитела иммобилизованы на поверхности частиц полистирольного латекса. При взаимодействии диагностикума с бактериями *B. pseudomallei* и *B. mallei* образуется агглютинат, видимый невооруженным глазом. Результаты РЛА со штаммами, исследованных в работе микроорганизмов, представлены в таблице.

По результатам исследования можно сделать вывод о целесообразности применения реакции латекс-агглютинации на основе моноклональных антител на этапе экспресс-диагностики для идентификации патогенных буркхольдерий. Экспериментальный препарат показал высокую специфичность в РЛА – все 16 опытных штамма *B. pseudomallei* и *B. mallei* агглютинировали, в отличие от гетерологичных микроорганизмов – с ними реакция была отрицательной.

Подтверждение возможности применения РЛА на основе МКА в ускоренном определении патогенных буркхольдерий открывает перспективы и в определении видовой принадлежности бактерий. Возбудители мелиоидоза и сапа являются близкородственными микроорганизмами, поэтому при их идентификации в серологических реакциях могут быть получены ложноположительные результаты.

Однако существуют методы, такие как метод флюоресцирующих антител и твердофазного иммуноферментного анализа, при постановке которых возможность перекрестных реакций сведена до минимума за счет использования МКА к специфическим эпитомам, свойственным конкретному виду микроорганизма. Применение подобных антител в РЛА делает актуальными дальнейшие разработки диагностикумов для быстрого выявления уже конкретного возбудителя. Существуют такие возможности по снижению времени проведения реакции практически в 2 раза, что обеспечивается использованием в качестве носителя полимерных латексных частиц с различными активными группами на их поверхности.

**Результаты реакции агглютинации чистых культур *B. pseudomallei*, *B. mallei*, близкородственных и гетерологичных микроорганизмов**

**Results of agglutination reaction of *B. pseudomallei*, *B. mallei* cultures, closely related and heterologous microorganisms**

Микроорганизм Microorganism	Положительный результат / общее количество штаммов Positive result / total number of strains
<i>B. pseudomallei</i>	12/12
<i>B. mallei</i>	4/4
<i>B. thailandensis</i>	0/3
<i>B. cepacia</i>	0/3
<i>P. aeruginosa</i>	0/3
<i>P. putida</i>	0/1

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

**Список литературы**

1. Gilad J., Schwartz D., Amsalem Y. Clinical features and laboratory diagnosis of infection with the potential bioterrorism agents *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Int. J. of Biomed. Sci.* 2007; 3:144–52. PMID: 23675037. PMCID: PMC3614684.
2. Van Zandt K.E., Greer M.T., Gelhaus H.C. Glanders: an overview of infection in humans. *Orphanet. J. Rare Dis.* 2013; 8:131. DOI: 10.1186/1750-1172-8-131.
3. Dance D. Treatment and prophylaxis of melioidosis. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2014; 43(4):310–18. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2014.01.005.
4. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
5. Hoffmaster A.R., AuCoin D., Baccam P., Baggett H.C. Baird R., Bhengsi S., Blaney D.D., Brett P.J., Brooks T.J., Brown K.A., Chantratita N., Cheng A.C., Dance D.A., Decuyper S., Defenbaugh D., Gee J.E., Houghton R., Jorakate P., Lertmemongkolchai G., Limmathurotsakul D., Merlin T.L., Mukhopadhyay C., Norton R., Peacock S.J., Rolim D.B., Simpson A.J., Steinmetz I., Stoddard R.A., Stokes M.M., Sue D., Tuanyok A., Whistler T., Wuthiekanun V., Walke H.T. Melioidosis diagnostic workshop, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(2). DOI: 10.3201/eid2102.141045.
6. Zakharova I.B., Lopasteyskaya Y.A., Toporkov A.V., Viktorov D.V. Influence of biochemical features of *Burkholderia pseudomallei* strains on identification reliability by Vitek 2 system. *J. Glob. Infect. Dis.* 2018; 10(1):7–10. DOI: 10.4103/jgid.jgid.39.17.
7. Hantrakun V., Thaipadungpanit J., Rongkard P., Srirohasin P., Amornchai P., Langla S., Mukaka M., Chantratita N., Wuthiekanun V., Dance D.A.B., Day N.P.J., Peacock S.J., Limmathurotsakul D. Presence of *B. thailandensis* and *B. thailandensis* expressing *B. pseudomallei*-like capsular polysaccharide in Thailand, and their associations with serological response to *B. pseudomallei*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(1):e0006193. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006193.
8. Peeters M., Chung P., Lin H., Mortelmans K., Phe C., San C., Kuijpers L.M.F., Teav S., Phe T., Jacobs J. Diagnostic accuracy of the InBioS AMD rapid diagnostic test for the detection of *Burkholderia pseudomallei* antigen in grown blood culture broth. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2018; 37(6):1169–77. DOI: 10.1007/s10096-018-3237-3.
9. Бровкина А.Н. Разработка метода и тест-системы выявления бактерий рода *Salmonella* на основе латекс-агглютинации. *Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета.* 2011; 72:516–24.
10. Волина Е.Г., Слугин И.В., Верховский О.А., Яшина Н.В., Шкарлат П.Е., Прокопов Н.И., Грицкова И.А. Способ приготовления лептоспирозного диагностикума для постановки реакции латекс-агглютинации. Патент РФ № 2177617, опубл. 27.12.2001.
11. Хлынцева А.Е., Лунева Н.М., Белова Е.В., Дятлов И.А., Шемкин И.Г. Разработка и испытания диагностикума на основе моноклональных антител для определения спор возбудителя сибирской язвы в реакции латекс-агглютинации. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2011; 4(110):71–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-4(110)-71-75.

**References**

1. Gilad J., Schwartz D., Amsalem Y. Clinical features and laboratory diagnosis of infection with the potential bioterrorism agents *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Int. J. of Biomed. Sci.* 2007; 3:144–52. PMID: 23675037. PMCID: PMC3614684.
2. Van Zandt K.E., Greer M.T., Gelhaus H.C. Glanders: an overview of infection in humans. *Orphanet. J. Rare Dis.* 2013; 8:131. DOI: 10.1186/1750-1172-8-131.
3. Dance D. Treatment and prophylaxis of melioidosis. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2014; 43(4):310–18. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2014.01.005.
4. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. Laboratory diagnostics of dangerous infectious diseases. Practical guide. M.: “Shiko”; 2013. 560 с.
5. Hoffmaster A.R., AuCoin D., Baccam P., Baggett H.C. Baird R., Bhengsi S., Blaney D.D., Brett P.J., Brooks T.J., Brown K.A., Chantratita N., Cheng A.C., Dance D.A., Decuyper S., Defenbaugh D., Gee J.E., Houghton R., Jorakate P., Lertmemongkolchai G., Limmathurotsakul D., Merlin T.L., Mukhopadhyay C., Norton R.,

Peacock S.J., Rolim D.B., Simpson A.J., Steinmetz I., Stoddard R.A., Stokes M.M., Sue D., Tuanyok A., Whistler T., Wuthiekanun V., Walke H.T. Melioidosis diagnostic workshop, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(2). DOI: 10.3201/eid2102.141045.

6. Zakharova I.B., Lopasteyskaya Y.A., Toporkov A.V., Viktorov D.V. Influence of biochemical features of *Burkholderia pseudomallei* strains on identification reliability by Vitek 2 system. *J. Glob. Infect. Dis.* 2018; 10(1):7–10. DOI: 10.4103/jgid.jgid\_39\_17.

7. Hantrakun V., Thaipadungpanit J., Rongkard P., Srirohasin P., Amornchai P., Langla S., Mukaka M., Chantratita N., Wuthiekanun V., Dance D.A.B., Day N.P.J., Peacock S.J., Limmathurotsakul D. Presence of *B. thailandensis* and *B. thailandensis* expressing *B. pseudomallei*-like capsular polysaccharide in Thailand, and their associations with serological response to *B. pseudomallei*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(1):e0006193. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006193.

8. Peeters M., Chung P., Lin H., Mortelmans K., Phe C., San C., Kuijpers L.M.F., Teav S., Phe T., Jacobs J. Diagnostic accuracy of the InBiOS AMD rapid diagnostic test for the detection of *Burkholderia pseudomallei* antigen in grown blood culture broth. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2018; 37(6):1169–77. DOI: 10.1007/s10096-018-3237-3.

9. Brovkina A.N. Development of a method and test system for detecting bacteria of the genus *Salmonella* based on latex agglutination. [*Polythematic Internet electronic scientific journal of the Kuban State Agrarian University*]. 2011; 72:516–24.

10. Volina E.G., Slugin I.V., Verkhovsky O.A., Yashina N.V.,

Shkarlat P.E., Prokopov N.I., Gritskova I.A. A method of preparing a leptospirosis diagnosticum for the formulation of the latex-agglutination reaction. RF patent No. 2177617, publ. 27.12.2001.

11. Khlyntseva A.E., Luneva N.M., Belova E.V., Dyatlov I.A., Shemyakin I.G. Development and testing of a diagnosticum based on monoclonal antibodies to determine anthrax pathogen spores in latex agglutination reaction. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2011; 4(110):71–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-4(110)-71-75.

**Authors:**

Frolov D.M., Senina T.V., Zamarina T.V., Khrapova N.P. Volgograd Research Anti-Plague Institute, 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

**Об авторах:**

Фролов Д.М., Сенина Т.В., Замарина Т.В., Храпова Н.П. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru.

Поступила 10.06.19.

Отправлена на доработку 17.09.19.

Принята к публ. 24.09.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-111-117

УДК 619.9:614.4(470.62)

Е.В. Чехвалова<sup>1</sup>, Е.А. Манин<sup>2</sup>, А.Н. Куличенко<sup>2</sup>, В.Г. Оробей<sup>3</sup>, О.Г. Швеиц<sup>4</sup>**СОВРЕМЕННАЯ ЭПИЗООТОЛОГО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ ОБСТАНОВКА ПО ПРИРОДНО-ОЧАГОВЫМ ИНФЕКЦИЯМ В ГОРОДЕ-КУРОРТЕ СОЧИ**

<sup>1</sup>Сочинский филиал ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае», Сочи, Российская Федерация;  
<sup>2</sup>ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация;  
<sup>3</sup>Территориальный отдел Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Краснодарскому краю в городе-курорте Сочи, Сочи, Российская Федерация;  
<sup>4</sup>ФКУЗ «Причерноморская противочумная станция», Новороссийск, Российская Федерация

**Цель.** Анализ эпизоотолого-эпидемиологической обстановки по природно-очаговым инфекциям в городе-курорте Сочи. **Материалы и методы.** Использованы донесения и результаты ежегодного эпизоотологического мониторинга территории города-курорта Сочи, представленные Управлением Роспотребнадзора по Краснодарскому краю, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае», ФКУЗ «Причерноморская противочумная станция», Сочинским противочумным отделением ФКУЗ «Причерноморская противочумная станция», ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт». **Результаты и обсуждение.** Представлен анализ заболеваемости людей, результаты эпизоотологического мониторинга и молекулярно-генетических исследований изолятов, выделенных на территории города-курорта Сочи с 2014 по 2018 год. Наиболее значимыми природно-очаговыми инфекциями данного региона являются геморрагическая лихорадка с почечным синдромом, болезнь Лайма, кишечный иерсиниоз, лептоспироз. В результате анализа данных эпизоотологического мониторинга установлено, что природные очаги изучаемых инфекций на территории города-курорта Сочи являются сочетанными, что повышает их эпидемическую значимость и предъявляет требования к более углубленному обследованию территорий. Таким образом, современная эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по природно-очаговым инфекциям в регионе города-курорта Сочи характеризуется сохранением активности природных очагов и указывает на необходимость их постоянного мониторинга, а также выполнения комплекса регламентированных профилактических мероприятий.

**Ключевые слова:** природно-очаговые инфекции, город-курорт Сочи, эпизоотологический мониторинг, эпидемические проявления.

Корреспондирующий автор: Чехвалова Елена Викторовна, e-mail: sochi\_fguz@mail.ru.

Для цитирования: Чехвалова Е.В., Манин Е.А., Куличенко А.Н., Оробей В.Г., Швеиц О.Г. Современная эпизоотолого-эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекциям в городе-курорте Сочи. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 3:111–117. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-111-117

E.V. Chekhvalova<sup>1</sup>, E.A. Manin<sup>2</sup>, A.N. Kulichenko<sup>2</sup>, V.G. Orobey<sup>3</sup>, O.G. Shvets<sup>4</sup>**Modern Epizootiological-Epidemiological Situation on Natural-Focal Infections in the Resort City of Sochi**

<sup>1</sup>Sochi Branch of the “Center of Hygiene and Epidemiology in the Krasnodar Territory”, Sochi, Russian Federation;  
<sup>2</sup>Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation;  
<sup>3</sup>Territorial Department of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare in the Krasnodar Territory in the resort city of Sochi, Sochi, Russian Federation;  
<sup>4</sup>Black Sea Plague Control Station of the Rospotrebnadzor, Novorossiysk, Russian Federation

**Abstract. Objective** – analysis of the epizootic-epidemiological situation on natural-focal infections in the resort city of Sochi. **Materials and methods.** We used the reports on and results of annual epizootiological monitoring of the territory of Sochi, presented by the Rospotrebnadzor Administration in the Krasnodar Territory, Center of Hygiene and Epidemiology in the Krasnodar Territory, Black Sea Plague Control Station, Sochi Anti-Plague Department of the Black Sea Plague Control Station, Stavropol Research Anti-Plague Institute. **Results and discussion.** The paper provides the analysis of the incidence among population, the results of epizootiological monitoring and molecular-genetic studies of isolates collected in the territory of the resort city of Sochi during 2014–2018. The most significant natural-focal infections in this region are: hemorrhagic fever with renal syndrome, Lyme disease, intestinal yersiniosis, leptospirosis. It was established that the natural foci of the infections studied in the territory of the resort city of Sochi are combined ones, which increases their epidemic importance and imposes requirements for a more in-depth survey of the territories. Thus, the current epizootiological-epidemiological situation on natural-focal infections in the region of the resort city of Sochi is characterized by the preservation of the activity of natural foci and indicates the need for their continuous monitoring, as well as implementation of a set of regulated preventive measures.

**Key words:** natural-focal infections, resort city of Sochi, epizootiological monitoring, epidemic manifestations.

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

Corresponding author: Elena V. Chekhvalova, e-mail: sochi\_fguz@mail.ru.

Citation: Chekhvalova E.V., Manin E.A., Kulichenko A.N., Orobey V.G., Shvets O.G. Modern Epizootiological-Epidemiological Situation on Natural-Focal Infections in the Resort City of Sochi. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 3:111–117. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-111-117

Received 28.03.19. Revised 20.04.19. Accepted 28.08.19.

Природно-очаговые инфекции (ПОИ) – особая группа инфекционных болезней, особенностью которых является паразитирование возбудителя в организме диких животных, обитающих в природе в определенных географических ландшафтах – природных очагах. Заражение восприимчивого человека сопряжено с пребыванием на территории природного очага только в период эпизоотической активности носителей и переносчиков, сельскохозяйственные (одомашненные) животные и синантропные грызуны также могут служить звеном перехода некоторых природно-очаговых инфекций из дикой природы к человеку [1–3]. Характерные особенности ПОИ, определяющие актуальность совершенствования мер борьбы с ними, – эндемичность, полная зависимость от эпизоотического процесса, полипатогенность возбудителей ПОИ для людей (характерны множественные пути проникновения в организм человека и политропность к органам и тканям), веерообразная передача возбудителей (от зараженного животного заражается несколько человек), а также возможная иррадиация инфекционных агентов из открытых природных биотопов в населенные пункты с последующим образованием природных очагов инфекционных болезней в урбанизированных ландшафтах (лептоспироз, псевдотуберкулез) [4].

Данные об энзоотических территориях, лоймопотенциале и особенностях течения эпизоотий в очагах ПОИ важны для проведения профилактических мероприятий и являются основой при решении вопросов по совершенствованию стратегии и тактики эпидемиологического надзора за данными инфекциями [5, 6].

**Цель** данной работы – охарактеризовать современную эпизоотолого-эпидемиологическую обстановку по природно-очаговым инфекциям в городском курорте Сочи.

### Материалы и методы

В работе использованы донесения и результаты ежегодного эпизоотологического мониторинга территории города-курорта Сочи, представленные Управлением Роспотребнадзора по Краснодарскому краю, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае», ФКУЗ «Причерноморская противочумная станция», Сочинским противочумным отделением ФКУЗ «Причерноморская противочумная станция» и ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт».

### Результаты и обсуждение

Комфортные природно-климатические условия и ландшафтно-географические особенности города-курорта Сочи (г.-к. Сочи), а также развитая структура рекреационно-спортивных комплексов способствуют притоку большого количества временных контингентов в данный регион. При этом создаются

условия для более тесного контакта населения с носителями и переносчиками возбудителей инфекций, что способствует активизации механизмов передачи патогенов и сказывается на эпидемиологической ситуации [7, 8].

Наиболее значимыми ПОИ в данном регионе являются: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС), клещевой боррелиоз (КБ), туляремия, лептоспирозы, Ку-лихорадка, псевдотуберкулез, кишечный иерсиниоз, бешенство и риккетсиозы [7, 9]. При этом заболеваемость ПОИ в г.-к. Сочи на протяжении последних пяти лет регистрировалась по следующим нозологическим формам: ГЛПС, КБ, кишечный иерсиниоз, лептоспироз [7].

**Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом.** Впервые в г.-к. Сочи, этиологическое подтверждение случая заболевания, сходного по клиническим проявлениям с ГЛПС, получено в 2000 г. С 2001 г. началось более углубленное изучение территории по данной инфекции. В результате молекулярно-генетических исследований установлена циркуляция нового в России патогенного для человека хантавируса *Dobrava/Belgrad*, который обуславливает в ряде случаев крайне тяжелое клиническое течение болезни. Установлена эпидемиологическая значимость кавказской лесной мыши, как основного природного хозяина этого вируса и источника заражения людей [5]. Выявление хантавирусного антигена у диких грызунов является прямым доказательством циркуляции возбудителя ГЛПС в обследуемом районе. Однако возможность обнаружения специфического антигена не является постоянной, а частота выявления положительных на присутствие этого антигена животных может значительно меняться в различные временные промежутки в пределах даже ограниченной территории одного и того же района. Это связано с особенностями эпизоотического процесса у животных, который периодически может активизироваться или затухать [10].

Н.М. Окуловой и соавт. [11] выявлена эпидемиологическая особенность данного природного очага: в отличие от большинства лесных ландшафтов России, где численность лесных грызунов возрастает от весны к осени и падает от осени к весне, в причерноморском регионе их численность возрастает от осени к началу следующего лета, а падает от лета к осени. Наиболее активная циркуляция вируса и максимальная эпидемическая опасность отмечены на территории низкогорий (Лазаревский и Адлерский районы) [10,12].

За последние пять лет с 2014 по 2018 год заболеваемость ГЛПС в г.-к. Сочи регистрировалась ежегодно – всего выявлено 19 больных ГЛПС (2014 г. – 1 больной, 2015 г. – 4, 2016 г. – 6, 2017 г. – 4, 2018 г. – 4). В результате анализа установлено, что все больные – жители г.-к. Сочи, которые связывали инфицирование возбудителем ГЛПС с работой или отдыхом в местных природных биотопах или с наличием мышевидных грызунов по месту проживания.

Активность природного очага ГЛПС в регионе подтверждается ежегодными эпизоотологическими находками. С 2014 по 2018 год мониторинг хантавирусов проводился в Адлерском, Лазаревском, Центральном и Хостинском районах г.-к. Сочи. Исследование материала проводили методами ПЦР, РНИФ, ИФА. Положительные пробы обнаружены на всех обследованных территориях, однако максимальное их количество зарегистрировано в Адлерском районе (рис. 1).

Молекулярно-генетический анализ изолятов нуклеиновых кислот хантавирусов, выявленных в трех пробах суспензий легкого грызунов в Адлерском и Хостинском районах, позволил определить нуклеотидную последовательность фрагмента L-сегмента генома вируса размером 347 п.о. При филогенетическом анализе секвенированных последовательностей генома вируса установлено, что в исследуемых образцах содержатся варианты, относящиеся к двум видам хантавирусов: «Добрава/Белград» генотипа «Сочи» (Адлерский район) и «Адлер» (Хостинский район).

Исследуемые изоляты РНК кластеризовались со штаммами подгруппы II (референсный изолят ADLEV-VIRUS\_Mm/173-11). Отличия нуклеотидной последовательности от ранее охарактеризованных изолятов подгруппы II хантавируса «Адлер» составили 3–9%. Выявленные генетические варианты хантавирусов характерны для территории г.-к. Сочи, хантавирусы «Добрава/Белград» генотипа «Сочи» определяются в регионе с 2001 г., хантавирус «Адлер» впервые идентифицирован в 2008 г., циркуляция изолятов генетической подгруппы II вируса «Адлер» ранее установлена на территории Лазаревского района [9,13]. Для хантавирусов характерна высокая степень генетической гетерогенности, нуклеотидные различия в пределах геновидов могут достигать 18% [13]. Установленные особенности нуклеотидных последовательностей, исследуемых изолятов РНК и ранее описанных штаммов, позволяют говорить о наличии на территории г.-к. Сочи микропопуляций хантавируса, в которых циркулируют генетически близкие варианты [14].

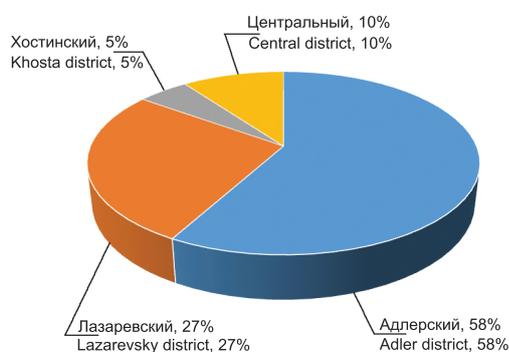


Рис. 1. Распределение положительных эпизоотологических находок ГЛПС по районам г.-к. Сочи

Fig. 1. Distribution of positive epizootiological HFRS findings by districts of the resort city of Sochi

**Клещевой боррелиоз.** По эпидемическим проявлениям одной из наиболее часто регистрируемых природно-очаговых инфекций на юге России в последние годы стал и клещевой боррелиоз (болезнь Лайма). При этом в Южном федеральном округе заболеваемость КБ преимущественно регистрируется в Краснодарском и Ставропольском краях.

В г.-к. Сочи Лайм-боррелиоз у людей диагностировали ежегодно (2014 г. – 4 случая, 2015 г. – 7, 2016 г. – 3, 2017 г. – 24, 2018 г. – 9). Пик заболеваемости пришелся на 2017 г., когда было зарегистрировано 24 больных – местные жители, 90% из которых связывали инфицирование с укусом клеща во время пребывания в природных биотопах в окрестностях города-курорта.

Циркуляция возбудителей клещевого боррелиоза установлена в горно-лесных ландшафтах причерноморской зоны. Интенсивные эпизоотологические проявления данной инфекции подтверждают активность ее природного очага. С 2014 по 2018 год доля положительных проб, обнаруженных в г.-к. Сочи, составляла в отдельные годы 71% от общего числа положительных проб, выявленных в Краснодарском крае (2017 г. – 153 положительные пробы в КК, из них 109 в г.-к. Сочи). Весь материал исследовали методом ПЦР. Основными переносчиками являлись клещи *Ixodes Ricinus*.

В результате молекулярно-генетического типирования положительных проб, установлена циркуляция *Borrelia garinii* (ST 251) и *B. lusitaniae*, выявлено три новых сиквенс-типа боррелий [9]. Идентифицированные изоляты наиболее генетически близки к европейским штаммам. Так, штаммы *B. garinii* сиквенс-типа ST251 ранее выявлены в Германии (1994 и 2008 гг.) и Латвии (2007 г.). Впервые описанные сиквенс-типы *B. garinii* и *B. lusitaniae* наиболее генетически близки сиквенс-типам 244, 262, 576, 153, 148, 218 и 630. Варианты *B. garinii* сиквенс-типа 244 ранее выявлены в Великобритании (2008 г.), Германии (1992 и 2011 гг.) и России (Екатеринбург, 2014 г.), штаммы сиквенс-типов 576 и 262 выделены в Германии в 1992 и 2009 гг. Варианты *B. lusitaniae* сиквенс-типа 148, 153 и 630 описаны в Сербии в 2010 и 2013 гг., сиквенс-типа 218 – в Латвии 2007 г. [15].

**Лептоспироз.** Антитела к лептоспирам в сыворотках крови больных, постоянно проживающих в г.-к. Сочи, впервые выявлены в 2009 г. (18 положительных проб из 500, исследованных в реакции микроагглютинации больных): 10 – к *Leptospira icterohaemorrhagiae*, 2 – к *L. pomona*, 1 – к *L. canicola*, 3 – к *L. javanica*, 2 – к *L. grippityphosa*. В 2010 г. серопозитивные на лептоспироз сыворотки крови выявлены у 10 больных (388 обследованных): у 9 обнаружены антитела к *L. icterohaemorrhagiae*, у 1 – к *L. pomona*.

В настоящее время заболеваемость лептоспирозами ежегодно регистрируется на территории г.-к. Сочи. Всего за период с 2014 по 2018 год за-

регистрировано 25 больных (2014 г. – 7, 2015 г. – 3, 2016 г. – 3, 2017 г. – 6, 2018 г. – 6). Около 50 % из них свое заболевание связывали с отдыхом у водоемов, остальные – с уходом за сельскохозяйственными животными, работой на приусадебных участках, контактом с грызунами.

Следует отметить, что в 2015 г. на базе Сочинского противочумного отделения Причерноморской ПЧС функционировала индикационная референс-лаборатория Ставропольского противочумного института, в которую из ГБУЗ «Инфекционная больница № 2» были доставлены семь проб клинического материала тяжело больных с неясной этиологией, во всех случаях поставлен лабораторный диагноз «Лептоспироз». Этот факт свидетельствует о том, что в г.к. Сочи среди работников лечебно-профилактических организаций отсутствует настороженность по данной инфекции.

Циркуляция возбудителей (активность природного очага) лептоспирозов в природных биотопах г.к. Сочи подтверждена ежегодными положительными результатами эпизоотологического мониторинга (2014 г. – 15 проб, 2015 г. – 3, 2016 г. – 4, 2017 г. – 3, 2018 г. – 2). Основными переносчиками являлись мышевидные грызуны.

**Псевдотуберкулез.** За последние 5 лет случаи заболевания людей псевдотуберкулезом не регистрировались. Хотя до 2014 г. в г.к. Сочи заболеваемость в отдельные годы достигала высокого уровня. Так, в 2009 г. интенсивный показатель заболеваемости на 100 тыс. населения составил 7,06 (29 случаев), при этом 0,61 – в Краснодарском крае и 0,79 – в целом по России, что может свидетельствовать о необходимости большего внимания к качеству диагностики и настороженности по данной инфекции медицинского персонала первичного звена. Наряду с этим необходимо уделять значительное внимание эпизоотологическому мониторингу изучаемой территории по данной инфекции для контроля активности очага и предупреждения его активизации.

**Кишечный иерсиниоз.** Заболеваемость кишечным иерсиниозом в г.к. Сочи в последние годы регистрируется ежегодно (2014 г. – 3 случая, 2015 г. – 3, 2016 г. – 10, 2017 г. – 1, 2018 г. – 5). Источники и условия инфицирования связаны с несоблюдением мер личной гигиены, а также употреблением в пищу не обработанных овощей и фруктов.

При эпизоотологическом мониторинге положительные пробы выявлялись ежегодно в реакции непрямой гемагглютинации сывороток крови мелких млекопитающих (2014 г. – 4 пробы, 2015 г. – 4, 2016 г. – 2, 2017 г. – 3, 2018 г. – 3).

**Бешенство.** Начиная с 2005 г., случаи бешенства среди людей не выявляются, однако ежегодно регистрируется значительное число лиц, обратившихся за медицинской помощью вследствие укусов и повреждений, нанесенных животными (до 2 тыс. обращений в год). По сообщениям ветеринарной службы, заболевания среди животных имеют спорадичес-

кий характер (последний случай зарегистрирован в ноябре 2018 г. в микрорайоне Мацеста Хостинского района г.к. Сочи), что не дает возможности исключить данную инфекцию из перечня актуальных ПОИ для исследуемого региона.

О значимости проблемы вышеперечисленных природно-очаговых инфекций также свидетельствуют данные эпизоотологического мониторинга (учет численности основных носителей) в г.к. Сочи в 2018 г. Имеет место незначительное увеличение численности особей мелких млекопитающих (процент попадания – 10,4 %, при среднем многолетнем показателе (за 5 лет) – 8,4 %). Доминирующим видом являлась кавказская лесная мышь (индекс доминирования (ИД) – 53,1 %), содоминант – малая кавказская лесная мышь (ИД – 36,6 %).

Постоянного внимания требуют расположенные на сопредельной территории Республики Абхазия природные очаги ряда инфекций вирусной и бактериальной этиологии. В результате совместно проводимого специалистами Ставропольского противочумного института и госсанэпидслужбы Республики Абхазия эпизоотологического обследования территории республики подтверждено наличие активных природных очагов ГЛПС, лихорадки Западного Нила, Крымской геморрагической лихорадки, клещевого энцефалита, лихорадки Тягина, Инко, Бханджа, Синдбис, Ку-лихорадки, анаплазмоза, клещевого боррелиоза, туляремии и лептоспироза [13,16]. В 2011–2012 гг. в Республике Абхазия регистрировались заболевания людей марсельской лихорадкой [17].

При анализе данных эпизоотологического мониторинга, проводимого на территории г.к. Сочи в период с 2014 по 2018 год, установлено, что в результате антропогенной трансформации природных ландшафтов, расположенных в окрестностях населенных пунктов, сформировались сочетанные природные и природно-антропоургические очаги инфекционных болезней, что повышает их эпидемическую значимость и предъявляет требования к более углубленному обследованию (рис. 2).

Нельзя также не упомянуть того факта, что в Центральном районе Сочи в 2004 г. обнаружены комары *Aedes aegypti*, а с 2016 г. – *Aedes albopictus*, являющиеся в эндемичных районах мира переносчиками желтой лихорадки, лихорадки Зика, денге и других опасных арбовирусных инфекций [18]. Обследование территории черноморского побережья Российской Федерации и Республики Абхазия, проведенное в 2017–2018 гг., показало, что в настоящее время комары *Ae. aegypti* практически не встречаются, в то время как *Ae. albopictus* активно продвигаются в западном и северо-западном направлении [19]. На сегодняшний день комары *Ae. albopictus* в причерноморской зоне г.к. Сочи встречаются на участках побережья от государственной границы с Республикой Абхазия до Анапы и от побережья до высоты Красной Поляны (538 м над уровнем моря). Учитывая их эпидемическое значение в отношении

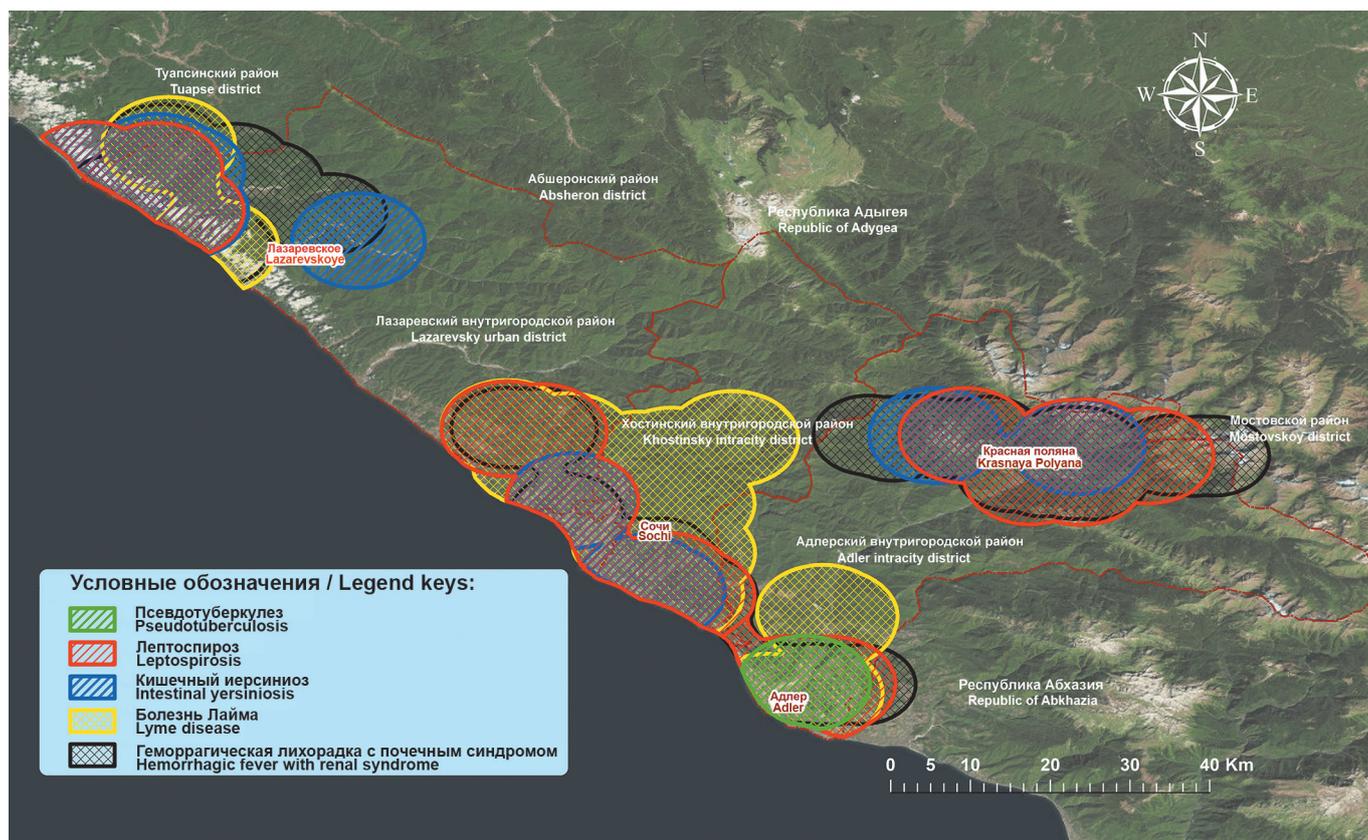


Рис. 2. Сочетанность природных очагов инфекционных болезней в г.-к. Сочи (контурами обозначены границы территорий, на которых зарегистрированы положительные эпизоотологические находки)

Fig. 2. Combination of natural foci of infectious diseases in the city of Sochi (contours mark the boundaries of the territories where positive epizootiological findings were registered)

ряда опасных инфекционных болезней, переносчиками возбудителей которых они являются, постоянно проводится комплекс мероприятий по регуляции численности комаров этих видов на черноморском побережье Краснодарского края (энтомологический мониторинг, инсектицидные обработки мест выявления и обитания комаров, подготовка кадров).

Таким образом, современная эпизоотолого-эпидемиологическая обстановка по ПОИ в г.-к. Сочи характеризуется сохранением активности природных очагов ГЛПС, лептоспироза, клещевого боррелиоза, кишечного иерсиниоза, псевдотуберкулеза, бешенства, а также их сочетанностью, средняя многолетняя динамика заболеваемости которыми характеризуется относительной стабильностью.

Среди первоочередных задач – совершенствование тактики эпидемиологического надзора за природно-очаговыми инфекциями в г.-к. Сочи, включающее внедрение современных методов эпидемиологического (эпизоотологического) анализа сочетанных очагов – ГИС-технологий, многопланового мониторинга, прогнозного моделирования эпидемической ситуации, продолжение работы по геномному профилированию микробных патогенов территории для расследования как вспышек, так и отдельных случаев инфекционных заболеваний.

Поддерживающими факторами существования очагов ПОИ в данном регионе являются достаточно

благоприятные климатогеографические условия, способствующие широкому распространению носителей и переносчиков. Высокая плотность населения (особенно в периоды летней оздоровительной кампании и проведения массовых мероприятий), сказывающаяся на интенсивности контакта человека с переносчиками, а также сочетанность природных очагов – важные факторы эпидемиологического риска, требующие проведения комплексных профилактических мероприятий (с учетом рекреационной значимости территории г.-к. Сочи), основными из которых являются:

- акарицидные, инсектицидные и дератизационные барьерные обработки эпидемиологически значимых объектов с соблюдением сроков, объемов с последующим контролем эффективности;
- благоустройство территорий населенных пунктов, парков, скверов, мест массового отдыха и пребывания населения;
- систематическая подготовка медицинских работников с целью повышения настороженности по ПОИ, актуальным для данной территории;
- информационно-разъяснительная работа среди населения, особенно в период летней оздоровительной кампании и проведения массовых мероприятий, в том числе международных.

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

## Список литературы

- Брико Н.И. Теоретические обобщения в современной отечественной эпидемиологии. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2018; 3:4–10. DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-5-5-16
- Громашевский Л.В. Общая эпидемиология. М.: Наркомздрав РСФСР; 1942. 344 с.
- Павловский Е.Н. Природная очаговость трансмиссивных болезней в связи с ландшафтной эпидемиологией зооантропонозов. М.–Л.: «Наука»; 1964. 211 с.
- Дейтер А.Б. Природно-очаговые инфекции в урбанизированных ландшафтах. *Паразитология*. 1985; 19(3):169–76.
- Василенко Н.Ф., Малецкая О.В., Манин Е.А., Прислегина Д.А., Дубянский В.М., Шапошникова Л.И., Волынкина А.С., Лисицкая Я.В., Котенев Е.С., Куличенко А.Н. Эпизоотологический мониторинг природно-очаговых инфекций на юге России в 2015 г. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017; 1:29–35.
- Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Прислегина Д.А., Василенко Н.Ф., Таран Т.В., Манин Е.А., Семенко А.В., Дубянский В.М. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням в Южном и Северо-Кавказском федеральных округах в 2017 г. (Аналитический обзор). Ставрополь: ООО «Литера», 2018. 112 с.
- Кузькин Б.П., Ежлова Е.Б., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Демина Ю.В., Таран Т.В., Пакскина Н.Д., Скударева О.Н., Василенко Н.Ф., Харченко Т.В., Манин Е.А., Грижебовский Г.М., Юничева Ю.В., Елдинова В.Е., Василенко Л.Е., Медяник И.М., Пиликова О.М., Клиндухов В.П., Гречаная Т.В., Тешева С.Ч., Оробей В.Г., Беланова Е.А. Актуальные вопросы обеспечения эпидемиологической безопасности по природно-очаговым инфекциям в период проведения XXII Олимпийских и XI Паралимпийских зимних игр в Сочи. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 1:54–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-1-54-57.
- Сочи – город-курорт в России [Электронный ресурс]. URL: <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%BE%D1%87%D0%B8> (дата обращения: 18.03.2019 г.).
- Малецкая О.В., Василенко Н.Ф., Манин Е.А., Таран Т.В. Особенности эпидемиологической обстановки по природно-очаговым инфекционным болезням на юге европейской части России в 2014 году. *Здоровье населения и среда обитания*. 2016; 2(275):28–31.
- Ткаченко Е.А., Окулова Н.М., Юничева Ю.В., Морзунов С.П., Хайбулина С.Ф., Рябова Т.Е., Василенко Л.Е., Башкирцев В.Н., Дзагурова Г.К., Горбачкова Е.А., Седова Н.С., Балакирев А.Е., Деконенко А.Е., Дроздов С.Г. Эпизоотологические и вирусологические характеристики природного очага хантавирусной инфекции в субтропической зоне Краснодарского края. *Вопросы вирусологии*. 2005; 50(3):14–9.
- Окулова Н.М., Василенко Л.Е., Рябова Т.Е. Многолетняя динамика численности и размножения лесных мышей (прод *Sylviaemus*, Muridae: Rodentia) Северо-Западного Кавказа. В кн.: Биоразнообразие и устойчивое развитие. Симферополь; 2012. С. 224–7. URL: [https://crimean-center.com/wp-content/uploads/books/biodiv\\_2012\\_simfer.pdf](https://crimean-center.com/wp-content/uploads/books/biodiv_2012_simfer.pdf) (дата обращения: 18.03.2019 г.).
- Ткаченко Е.А., Морозов В.Г., Дзагурова Т.К., Юничева Ю.В., Пиликова О.М., Завора Д.Л., Ишмухаметов А.А., Городин В.Н., Бахтина В.А., Загидуллин И.М., Соцкова С.Е. Этиологические и клинико-эпидемиологические особенности геморрагической лихорадки с почечным синдромом в Краснодарском крае. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2016; 1:22–30. DOI: 10.18821/1560-9529-2016-21-1-22-30.
- Малецкая О.В., Беляева А.И., Таран Т.В., Агапитов Д.С., Куличенко А.Н. Эпидемиологические риски опасных инфекционных болезней в Республике Абхазия. *Журнал эпидемиологии, микробиологии и иммунобиологии*. 2013; 5:43–47.
- Куличенко А.Н., Волынкина А.С., Лисицкая Я.В., Котенев Е.С., Кузнецова И.В., Подколзин А.Т., Зайцева Е.В., Паркина Н.В., Оробей В.Г. Генетическое профилирование актуальных для региона г.-к. Сочи возбудителей природно-очаговых и кишечных инфекций. *Бактериология*. 2016; 1(1):16–21. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-16-21.
- Gabriele Margos; Stephanie A Vollmer; Nicholas H Ogden; Durland Fish. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Infect. Genet. Evol.* 2011; 11(7):1545–63. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.07.022.
- Аншба Э.А., Теремков О.В., Герасимов В.Н., Меллин А.Е., Карбабаев Э.Б. Эпизоотическая обстановка в Республике Абхазия по сибирской язве, бешенству, ящуру и африканской чуме свиней. *Ветеринария Кубани*. 2010; 1:20–2.
- Брагина И.В., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Таран Т.В., Беляева А.И., Пакскина Н.Д., Скударева О.Н., Агапитов Д.С., Мезенцев В.М., Семенко О.В., Грижебовский Г.М., Клиндухов В.П., Оробей В.Г. Эпидемиологическая обстановка в Республике Абхазия в 2013–2014 г. Участие Роспотребнадзора в мероприятиях по ее стабилизации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2015; 2:109–13.
- Рябова Т.Е., Юничева Ю.В., Маркович Н.Я., Ганушкина Л.А., Оробей В.Г., Сергиев В.П. Обнаружение комаров *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. в г. Сочи. *Медицинская паразитология*. 2005; 3:3–5.
- Попова А.Ю., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Дубянский В.М., Демина Ю.В., Пакскина Н.Д., Тохов Ю.М., Манин Е.А., Лазаренко Е.В., Шаяхметов О.Х., Федорова М.В., Оробей В.Г., Юничева Ю.В., Комарова Н.С., Топорков А.В., Виктор Д.В., Гречаная Т.В., Николаевич П.Н., Куличенко А.Н., Пархоменко В.В. Мероприятия по регуляции численности комаров *Aedes aegypti* и *Aedes albopictus* в г. Сочи в 2016 г., результаты и пути совершенствования. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; (4):66–71. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-66-71.

## References

- Briko N.I. [Theoretical generalizations in the modern national epidemiology]. *Epidemiologia i Infekcionnye Bolezni. Aktual'nye Voprosy. [Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items]*. 2018; 3:4–10. DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-5-5-16
- Gromashevsky L.V. [General Epidemiology]. M.; 1942. 344 p.
- Pavlovsky E.N. [Natural Focality of Transmissible Diseases in Association with Landscape Epidemiology of Anthroozoonoses]. M.: "Nauka"; 1964. 211 p.
- Deyter A.B. [Natural-focal infections in urbanized landscapes]. *Parazitologiya [Parasitology]*. 1985; 19(3):169–76.
- Vasilenko N.F., Maletskaya O.V., Manin E.A., Prislegina D.A., Dubyansky V.M., Shaposhnikova L.I., Volynkina A.S., Lisitskaya Ya.V., Kotenev E.S., Kulichenko A.N. [Epizootiological monitoring of natural-focal infections in the south of Russia in 2015]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology]*. 2017; 1: 29–35.
- Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Prislegina D.A., Vasilenko N.F., Taran T.V., Manin E.A., Semenko A.V., Dubyansky V.M. [Epidemiological Situation on Natural-Focal Infections in the Southern and North-Caucasian Federal Districts in 2017 (Analytical review)]. Stavropol: «Litera» Ltd.; 2018. 112 p.
- Kuz'kin B.P., Ezhlova E.B., Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Demina Yu.V., Taran T.V., Paksina N.D., Skudareva O.N., Vasilenko N.F., Kharchenko T.V., Manin E.A., Grizhebovsky G.M., Yunicheva Yu.V., Eldinova V.E., Vasilenko L.E., Medyanik I.M., Piliikova O.M., Klindukhov V.P., Grechanaya T.V., Tesheva S.Ch., Orobey V.G., Belanova E.A. [Relevant Issues of Epidemiological Safety Provision as Regards Natural-Focal Infections during the XXII Olympic and XI Paralympic Winter Games in Sochi]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; 1:54–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-1-54-57.
- Sochi – resort city of Russia. (Cited 18 Mar 2019). [Internet]. Available from: <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A1%D0%BE%D1%87%D0%B8>.
- Maletskaya O.V., Vasilenko N.F., Manin E.A., Taran T.V. [Peculiarities of epidemiological situation on natural-focal infectious diseases in the south of the European part of Russia in 2014]. *Zdorov'e Naseeniya i Sreda Obitaniya [Public Health and Life Environment]*. 2016; 2(275):28–31.
- Tkachenko E.A., Okulova N.M., Yunicheva Yu.V., Morzunov S.P., Khaibulina S.F., Ryabova T.E., Vasilenko L.E., Bashkirtsev V.N., Dzagurova G.K., Gorbachkova E.A., Sedova N.S., Balakirev A.E., Dekonenko A.E., Drozdov S.G. [Epizootiological and virological characteristics of the natural focus of Hantavirus infection in subtropical zone of the Krasnodar Territory]. *Voprosy Virusologii [Problems of Virology]*. 2005; 50(3):14–9.
- Okulova N.M., Vasilenko L.E., Ryabova T.E. [Long-term dynamics of the changes in the number and reproduction of common field and wood mice (subgenus *Sylviaemus*, Muridae: Rodentia) in the North-Western Caucasus. In: [Biodiversity and Sustainable Development]. Simferopol; 2012. P. 224–7. (Cited 18 Mar 2019). Available from: [https://crimean-center.com/wp-content/uploads/books/biodiv\\_2012\\_simfer.pdf](https://crimean-center.com/wp-content/uploads/books/biodiv_2012_simfer.pdf).
- Tkachenko E.A., Morozov V.G., Dzagurova T.K., Yunicheva Yu.V., Piliikova O.M., Zavora D.L., Ishmukhametov A.A., Gorodin V.N., Bakhtina V.A., Zagidullin I.M., Sotskova S.E. [Etiological and clinical-epidemiological peculiarities of hemorrhagic fever with renal syndrome in the Krasnodar Territory]. *Epidemiologiya Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2016; 1: 22–30. DOI: 10.18821/1560-9529-2016-21-1-22-30.
- Maletskaya O.V., Belyaeva A.I., Taran T.V., Agapitov D.S., Kulichenko A.N. [Epidemiological risks of dangerous infectious diseases in the Republic of Abkhazia]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology]*. 2013; 5:43–7.
- Kulichenko A.N., Volynkina A.S., Lisitskaya Ya.V., Kotenev E.S., Kuznetsova I.V., Podkolzin A.T., Zaitseva E.V., Parkina N.V., Orobey V.G. [Genetic profiling of the relevant for the region of the resort city of Sochi agents of natural-focal and intestinal

infections]. *Bakteriologiya [Bacteriology]*. 2016; 1(1):16–21. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-16-21

15. Gabriele Margos; Stephanie A Vollmer; Nicholas H Ogden; Durland Fish. Population genetics, taxonomy, phylogeny and evolution of *Borrelia burgdorferi sensu lato*. *Infect. Genet. Evol.* 2011; 11(7):1545–63. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.07.022.

16. Anshba E.A., Teremkov O.V., Gerasimov V.N., Metlin A.E., Karbabaev E.B. [Epizootic situation on anthrax, rabies, foot-and-mouth disease, and African swine fever in the Republic of Abkhazia]. *Veterinariya Kubani [Veterinary Medicine of Kuban]*. 2010; 1:20–2.

17. Bragina I.V., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Taran T.V., Belyaeva A.I., Paksina N.D., Skudareva O.N., Agapitov D.S., Mezentsev V.M., Semenko O.V., Grizhebovsky G.M., Klindukhov V.P., Orobey V.G. [Epidemiological situation in the Republic of Abkhazia in 2013-2014. Participation of the Rospotrebnadzor in the activities aimed at its stabilization]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology]*. 2015; 2: 109–13.

18. Ryabova T.E., Yunicheva Yu.V., Markovich N.Ya., Ganushkina L.A., Orobey V.G., Sergiev V.P. [Detection of mosquitoes *Aedes (Stegomyia) aegypti* L. In the city of Sochi]. *Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni [Medical Parasitology and Parasitic Diseases]*. 2005; 3:3–5.

19. Popova A. Yu., Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Dubyansky V.M., Demina Yu. V., Paksina 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. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-4-66-71.

#### Authors:

*Chekhalova E.V.* Sochi Branch of the “Center of Hygiene and Epidemiology in the Krasnodar Territory”. 27, Roz St., Sochi, 354000, Russian Federation. E-mail: sochi\_fguz@mail.ru.

*Manin E.A., Kulichenko A.N.* Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

*Orobey V.G.* Territorial Department of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare in the Krasnodar Territory in the resort city of Sochi. 27, Roz St., Sochi, 354000, Russian Federation. E-mail: sochi@kubanrpn@ru.

*Shvets O.G.* Black Sea Plague Control Station. 90, Kunkova St., Novorossiysk, 353919, Russian Federation. E-mail: novppchs@rambler.ru.

#### Об авторах:

*Чехвалова Е.В.* Сочинский филиал ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае». Российская Федерация, 354000, Сочи, ул. Роз, 27. E-mail: sochi\_fguz@mail.ru.

*Манин Е.А., Куличенко А.Н.* Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

*Оробей В.Г.* Территориальный отдел Управления Роспотребнадзора по Краснодарскому краю в г.-к. Сочи. Российская Федерация, 354000, Краснодарский край, Сочи, ул. Роз, 27. E-mail: sochi@kubanrpn@ru.

*Швец О.Г.* Причерноморская противочумная станция. Российская Федерация, 353919, Новоросийск, ул. Куникова, 90 E-mail: novppchs@rambler.ru.

Поступила 28.03.19.

Отправлена на доработку 20.04.19.

Принята к публ. 28.08.19.

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-118-124

УДК 616.36-002+616.98:578.828Н1V

А.Н. Щемелев<sup>1</sup>, Ю.В. Останкова<sup>1</sup>, Е.Б. Зуева<sup>1</sup>, S. Boumbaly<sup>2,3</sup>, T.A.L. Balde<sup>2</sup>, A.V. Семенов<sup>1</sup>

## ХАРАКТЕРИСТИКА ВИРУСА ГЕПАТИТА В И ВИРУСА ИММУНОДЕФИЦИТА ЧЕЛОВЕКА СРЕДИ ПАЦИЕНТОВ С КОИНФЕКЦИЕЙ ВИЧ/ВГВ ИЗ ГВИНЕЙСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

<sup>1</sup>ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Российская Федерация;<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи, Киндия, Гвинейская Республика; <sup>3</sup>Международный исследовательский центр по тропическим инфекциям в Гвинеи, Н'Зерекоре, Гвинейская Республика

Целью нашей работы являлась молекулярно-генетическая характеристика вируса гепатита В и вируса иммунодефицита человека у пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГВ, проживающих в Гвинейской Республике. **Материалы и методы.** Материалом исследования служили 2168 образцов сыворотки крови, полученные от жителей Гвинейской Республики – доноров крови и условно здоровых людей без подозрения на болезнь, вызванную вирусом Эбола, в рамках плановой диспансеризации сотрудников ОК РУСАЛ и членов их семей. Проводили обследование на наличие серологических и молекулярно-биологических маркеров ВИЧ и ВГВ. При выявлении коинфекции ВИЧ/ВГВ секвенировали нуклеотидные последовательности полных геномов ВГВ и фрагмента гена *pol* ВИЧ. **Результаты и обсуждение.** Серологические маркеры ВИЧ выявлены у 239 человек, что составило 11,02 %. РНК ВИЧ удалось выявить у 31 человека, что составило 12,9 % пациентов серопозитивной группы (1,43 % от общей группы). Серологические маркеры ВГВ среди РНК ВИЧ-позитивных лиц выявлены у 29,03 % пациентов, в том числе 16,12 % HBsAg и 12,9 % anti-HBcore IgG. ДНК ВГВ выявили у всех HBsAg-позитивных и у двух anti-HBcore IgG-позитивных пациентов, а также у 12 человек, негативных по всем анализируемым в работе серологическим маркерам ВГВ. Таким образом, ДНК ВГВ обнаружили у 61,29 % РНК ВИЧ-позитивных лиц. На основании анализа нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *pol* 19 образцов ВИЧ показано, что в обследованной группе преобладает циркулирующая рекомбинантная форма ВИЧ CRF02\_AG (52,63 %) по сравнению с ВИЧ A1 (42,1 %), один образец представлял собой независимый рекомбинант генотипов A1 и G. При филогенетическом анализе ВГВ в исследуемых образцах показано, что в группе преобладает ВГВ генотипа E – 47,36 %, по сравнению с ВГВ D1 – 21,05 %, D2 – 15,78 %, D3 – 10,52 % и A2 – 5,26 %. Обнаружены образцы ВИЧ и ВГВ, несущие мутации лекарственной устойчивости, несмотря на отсутствие антиретровирусной терапии. Выявление мутаций лекарственной устойчивости как ВИЧ, так и ВГВ у АРВТ-наивных пациентов подчеркивают необходимость реализации программ эпиднадзора за ВИЧ-инфицированными, а также планового тестирования на ВГВ и лекарственную устойчивость ВИЧ и ВГВ перед началом антиретровирусной терапии при клиническом ведении пациентов в стране.

**Ключевые слова:** вирус иммунодефицита человека, ВИЧ, вирус гепатита В, ВГВ, скрытый гепатит В, Гвинейская Республика.

Корреспондирующий автор: Останкова Юлия Владимировна, e-mail: shenna1@yandex.ru.

Для цитирования: Щемелев А.Н., Останкова Ю.В., Зуева Е.Б., Boumbaly S., Balde T.A.L., Семенов А.В. Характеристика вируса гепатита В и вируса иммунодефицита человека среди пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГВ из Гвинейской Республики. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 3:118–124. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-118-124

A.N. Shchemelev<sup>1</sup>, Yu.V. Ostankova<sup>1</sup>, E.B. Zueva<sup>1</sup>, S. Boumbaly<sup>2,3</sup>, T.A.L. Balde<sup>2</sup>, A.V. Semenov<sup>1</sup>

## Characterization of Hepatitis B Virus and Human Immunodeficiency Virus among HIV/HBV Co-Infected Patients from the Republic of Guinea

<sup>1</sup>Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Russian Federation; <sup>2</sup>Research Institute of Applied Biology, Kindia, Republic of Guinea; <sup>3</sup>International Tropical Infections Research Center, N'Zerekore, Republic of Guinea

**Abstract. Aim.** Molecular genetic characterization of hepatitis B virus and human immunodeficiency virus in patients with HIV / HBV co-infection living in the Republic of Guinea. **Materials and methods.** 2168 blood serum samples obtained from the Republic of Guinea residents – blood donors and conditionally healthy people, without suspicion of Ebola virus disease, UK RUSAL employees and their families, as part of their routine medical examination. The presence of serological and molecular biological markers of HIV and HBV was examined. When HIV/HBV co-infection was detected, the nucleotide sequences of the complete HBV genomes and the HIV *pol* gene fragment were sequenced. **Results and discussion.** HIV serological markers were detected in 239 people (11.02 %). HIV RNA was detected in 31 people, which accounted for 12.9 % of patients in the seropositive group (1.43 % of the total group). HBV serological markers among HIV RNAs-positive individuals were detected in 29.03 % of patients, including 16.12 % HBsAg and 12.9 % anti-HBcore IgG. HBV DNA was detected in all HBsAg-positive and in two anti-HBcore IgG-positive patients, as well as in 12 people negative for all HBV serological markers analyzed in the work. Thus, HBV DNA was found in 61.29 % of HIV RNA-positive individuals. Based on the *pol* gene fragment nucleotide sequences analysis of 19 HIV samples, it was shown that the HIV circulating recombinant form CRF02\_AG prevails in the examined group (52.63 %) compared with HIV A1 (42.1 %), one sample was an independent recombinant of genotypes A1 and G. HBV phylogenetic analysis of the studied samples showed that genotype E prevails – 47.36 %, compared with HBV D1 – 21.05 %, D2 – 15.78 %, D3 – 10.52 % and A2 – 5.26 %. HIV and HBV samples have been detected that carry drug resistance mutations despite the antiretroviral therapy absence. HIV and HBV drug resistance mutations identification in ART-naive patients empha-

sizes the need for HIV surveillance programs as well as routine testing for HBV and HIV and HBV drug resistance before starting antiretroviral therapy in the clinical management of patients in the country.

**Keywords:** human immunodeficiency virus, HIV, hepatitis B virus, HBV, latent hepatitis B, Republic of Guinea.

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

**Corresponding author:** Yulia V. Ostankova, e-mail: shenna1@yandex.ru.

**Citation:** Shchemelev A.N., Ostankova Yu.V., Zueva E.B., Boumbaly S., Balde T.A.L., Semenov A.V. Characterization of Hepatitis B Virus and Human Immunodeficiency Virus among HIV/HBV Co-Infected Patients from the Republic of Guinea. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 3:118–124. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-3-118-124

Received 25.09.19. Accepted 26.09.19.

Schemelev A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3139-3674>

Ostankova Yu.V., ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-2270-8897>

Zueva E.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0579-110X>

Semenov A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) и возбудителей парентеральных вирусных гепатитов связывают общность механизмов и путей заражения, а также социально значимый характер вызываемых ими заболеваний [1, 2]. Вирус гепатита В (ВГВ) является одним из наиболее распространенных гепатотропных вирусов, способных приводить как к острым, так и к хроническим заболеваниям печени [3, 4]. Появление хронической инфекции, вызванной ВГВ, в контексте иммуносупрессии у ВИЧ-инфицированных пациентов остается проблемой общественного здравоохранения.

Около 10 % ВИЧ-инфицированных людей в мире коинфицированы HBsAg-положительным вирусом гепатита В. Распространенность коинфекции ВИЧ/ВГВ характеризуется географической вариабельностью и зависит, главным образом, от преобладающих путей заражения. Так, не менее 3 млн людей, коинфицированных ВИЧ/ВГВ, живут в Африке [5]. Работы, посвященные коинфекции ВИЧ/ВГВ, показали влияние ВИЧ-инфекции на течение гепатита В, приводящее к ускорению естественного течения хронического вирусного гепатита В (ХВГВ), увеличению частоты устойчивости инфекции, потере защитных антител против ВГВ, повышению риска прогрессирования поражения печени, заканчивающегося ранним развитием цирроза, и повышению риска летального исхода от заболевания печени [6].

Скрытый (HBsAg-негативный) гепатит В (СкГВ) представляет собой стадию ХВГВ, при которой ДНК ВГВ обнаруживается в ткани печени при неопределяемом уровне HBsAg в сыворотке периферической крови, не зависимо от того выявляется или нет ДНК ВГВ в периферической крови [7]. При этом репликация вируса и экспрессия генов могут быть подавлены настолько, что вирусная нагрузка в периферической крови больного крайне низка, вплоть до невозможности выявить ДНК ВГВ стандартными методами, но элиминации вируса не происходит. Сохранение кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК вируса в виде минихромосомы остается ключевым фактором, ответственным за невозможность полной элиминации вируса и за рецидивы вирусной репликации после прекращения противовирусной терапии [8]. Несмотря на отсутствие в периферической крови HBsAg, большинство пациентов с СкГВ являются серопозитивными по одному или нескольким

серологическим маркерам – в зависимости от фазы течения заболевания анти-HBs IgG, HBeAg, анти-HBe, анти-HBscore IgG, однако более 20 % больных серонегативны по всем маркерам ВГВ [9]. Развитие СкГВ обусловлено подавлением внутриядерной транскрипции субгеномных РНК ВГВ с матрицы ккз ДНК ВГВ, способной становиться матрицей для субгеномных и прегеномных копий РНК, на основе которых синтезируется вирусный геном и вирусные белки [10]. Подавление может быть следствием целого ряда не до конца изученных факторов, в том числе генетическими особенностями самого вируса и/или его хозяина или воздействием извне. Одним из таких факторов является коинфекция ВИЧ.

Особую значимость приобретает своевременное выявление ВГВ у ВИЧ-инфицированных лиц перед началом антиретровирусной терапии (АРВТ). Терапия с высокой активностью одновременно в отношении ВИЧ и ВГВ при коинфекции приводит к улучшению результатов лечения, однако неадекватное подавление репликации ВГВ противовирусными препаратами может привести к развитию устойчивых мутаций в консервативной области гена полимеразы, поскольку некоторые элементы АРВТ, применяемой против ВИЧ-инфекции, способны стать причиной развития фармакорезистентности как у ВИЧ, так и у ВГВ [11].

Данные о генетическом разнообразии ВИЧ и ВГВ также имеют значение для ведения пациентов с коинфекцией, учитывая, что различные геноварианты вирусов могут влиять на реакцию на противовирусную терапию и ее результаты [12, 13].

**Целью** работы являлась молекулярно-генетическая характеристика вируса гепатита В и вируса иммунодефицита человека у пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГВ, проживающих в Гвинейской Республике.

## Материалы и методы

Материалом исследования служили 2168 образцов сыворотки крови, полученные от жителей Гвинейской Республики – доноров крови и условно здоровых людей без подозрения на болезнь, вызванную вирусом Эбола, в рамках плановой диспансеризации сотрудников ОК РУСАЛ и членов их семей. Обследованные лица отрицали инфицирование ВГВ и ВИЧ в анамнезе.

Пациентов обследовали на наличие антигенов ВИЧ и антител к вирусу методом ИФА, а затем выявляли РНК ВИЧ. Обследование РНК ВИЧ-позитивных пациентов на наличие маркеров ВГВ методом ИФА заключалось в качественном определении HBsAg, анти-HBs IgG, анти-HBcore IgG. Для обнаружения ДНК ВГВ использовали разработанную во ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» методику, позволяющую выявлять ВГВ в биологическом материале при низкой вирусной нагрузке [14]. Амплификацию и последующее секвенирование ВГВ осуществляли с использованием nested-ПЦР. На первом этапе проводили ассиметричную ПЦР с протяженными олигонуклеотидами, а на втором этапе для повышения чувствительности проводили ПЦР с использованием продукта амплификации первой реакции и одной из пар внутренних (вложенных) перекрывающихся праймеров, совместно фланкирующих полный ген ВГВ (гены S, P, C, X).

Для обратной транскрипции и амплификации ВИЧ использовали коммерческие наборы «ОТ-ПЦР-комплект-Pro/Rev» и «ПЦР-комплект-Pro/Rev» (Россия), секвенирующую реакцию проводили согласно инструкции к набору «АмплиСенс® HIV-Resist-Seq» (Россия) и инструкции производителя. Генотипирование ВИЧ проводили на основе анализа нуклеотидных последовательностей участка гена полимеразы (*pol*) протяженностью 1377 нт., кодирующего протеазу (PR) и часть обратной транскриптазы (RT/OT) в области 2084–3460 нт., координаты даны для представленного в международной базе данных GenBank ВИЧ HXB2 (K03455.1).

Анализ продуктов секвенирующей реакции проводили с использованием генетического анализатора ABI Prism 3500 (США).

Первичный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы NCBI Blast в сравнении с нуклеотидными последовательностями, представленными в международной базе данных GenBank. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA v.7.0, используя алгоритм ClustalW [15]. Для построения филогенетических деревьев и последующего филогенетического анализа применяли алгоритм Neighbor-joining, позволяющий оптимизацию деревьев в соответствии с критерием «сбалансированной минимальной эволюции», при оценке достоверности филогенетических связей использовали многократную генерацию выборок методом Монте-Карло (bootstrap) для 1000 независимых построений каждого филогенетического древа.

Статистическая обработка данных производилась с помощью пакета программ MS Excel, Prizm 5.0 (GraphPad Software Inc.). Для оценки достоверности различий численных данных, полученных при парных сравнениях, использовали, в зависимости от характеристик выборок, точный критерий Фишера или критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса. В ка-

честве порога достоверности отличий определено значение вероятности  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Серологические маркеры ВИЧ выявлены у 239 человек, что составило 11,02 %. Отметим, что 69,45 % пациентов с выявленными маркерами ВИЧ являлись молодыми людьми в возрасте от 20 до 39 лет. РНК ВИЧ удалось выявить у 31 человека, что составило 12,9 % пациентов серопозитивной группы (1,43 % от общей группы).

Серологические маркеры ВГВ среди РНК ВИЧ-позитивных лиц выявлены у 29,03 % пациентов, в том числе 16,12 % HBsAg и 12,9 % анти-HBcore IgG. ДНК ВГВ выявили у всех HBsAg-позитивных и у двух анти-HBcore IgG-позитивных пациентов, а также у 12 человек, негативных по всем анализируемым в работе серологическим маркерам ВГВ. Таким образом, ДНК ВГВ обнаружили у 61,29 % РНК ВИЧ-позитивных лиц, то есть у 7,94 % пациентов с какими-либо маркерами ВИЧ-инфекции, что составило 0,87 % от всей обследованной группы. Следует отметить, что полученные нами высокие показатели распространенности СкГВ среди ВИЧ-инфицированных пациентов отражают предположение о наиболее высоких показателях встречаемости ВИЧ/ВГВ в странах Западной и Южной Африки [16]. Так, частота выявления коинфекции ВИЧ/ВГВ в Южной Африке достигала 30 % [17].

Учитывая то, что обследованная нами группа представлена донорами крови и пациентами, проходящими диспансеризацию, а также то, что у данных лиц ВИЧ выявлен впервые, можно предположить как значительно большую распространенность коинфекции ВИЧ/ВГВ в группах риска, так и высокую частоту встречаемости HBsAg-позитивного и HBsAg-негативного ВГВ среди лиц, живущих с ВИЧ на протяжении длительного периода.

Для всех 19 образцов ВИЧ/ВГВ получены нуклеотидные последовательности фрагмента генома ВИЧ, кодирующие протеазу и участок обратной транскриптазы.

Филогенетические отношения между исследованными образцами ВИЧ и референсными последовательностями из международной базы данных GenBank представлены на рис. 1.

Обращает на себя внимание образец 1170, отделившийся на филогенетическом древе от основной ветви CRF02\_AG. Мы сочли необходимым проанализировать этот изолят дополнительно с использованием программы REGA HIV-1 Subtyping Tool 3.0. (рис. 2).

Анализ нуклеотидной последовательности гена *pol* образца 1170 с помощью инструмента субтипирования REGA HIV-1 показал, что образец является рекомбинантом генотипов A1 и G, но не относится к CRF02\_AG.

Для выявления возможной рекомбинации об-

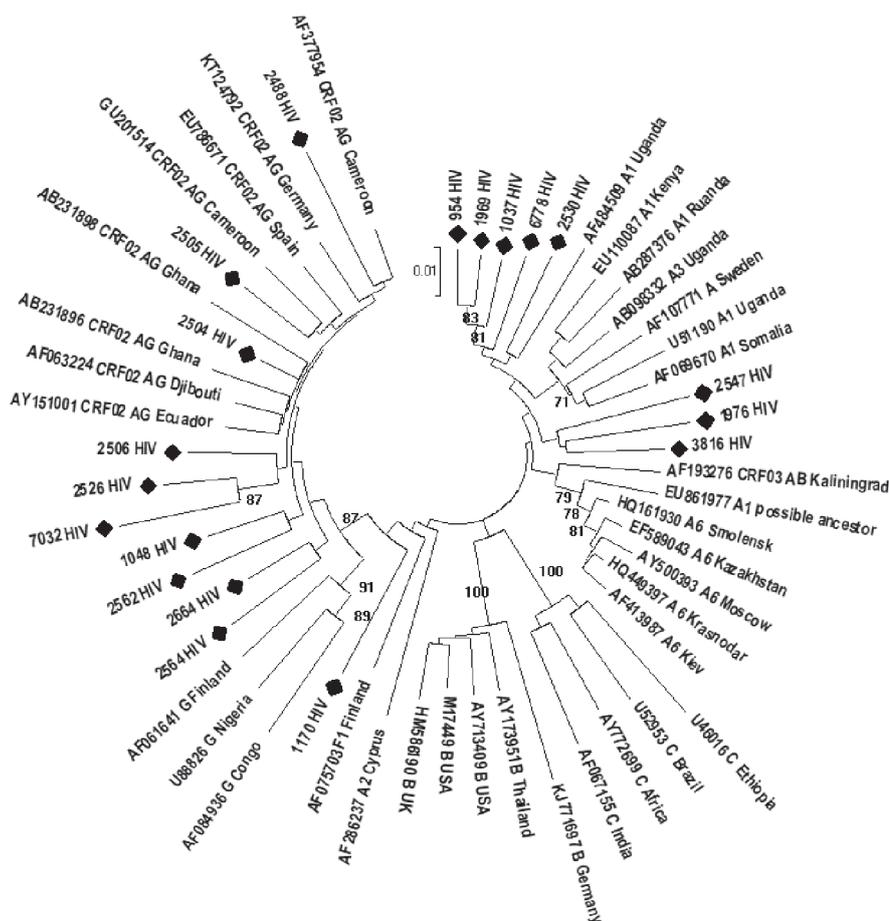


Рис. 1. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена pol ВИЧ, выделенных от ВИЧ/ВГВ-инфицированных пациентов, проживающих на территории Гвинейской Республики, в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank референсными последовательностями. Референсные последовательности обозначены кодами GenBank с указанием генотипа и региона происхождения образца. Ромбами обозначены образцы, исследованные в настоящей работе. Даны значения bootstrap  $\geq 70$

Fig. 1. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences of the HIV pol gene fragment isolated from HIV/HBV-infected patients living in the Republic of Guinea in comparison with reference sequences presented in the GenBank. Reference sequences are indicated by the GenBank codes indicating the genotype and origin of the sample. Diamonds indicate the samples studied in this work. Bootstrap values are  $\geq 70$

разцов 1976, 2547 и 3816 также выполняли анализ с использованием программы REGA HIV-1 Subtyping Tool 3.0, что позволило отнести указанные образцы к ВИЧ A1.

Таким образом, на основании анализа нуклеотидных последовательностей 19 образцов показано, что в обследованной группе преобладает циркулирующая рекомбинантная форма ВИЧ CRF02\_AG (52,63 %) по сравнению с ВИЧ A1 (42,1 %), один образец представлял собой независимый рекомбинант генотипов A1 и G.

При оценке встречаемости мутаций лекарственной устойчивости генетическая резистентность к каким-либо препаратам выявлена у 21,05 % пациентов, несмотря на отсутствие какой-либо терапии. Отметим, что в трех случаях выявлена только одна мутация фармакорезистентности к НеНИОТ. В двух случаях – мутация E138 (E138A в образце 1976-A1 и E138Q/G в образце 2562-CRF02\_AG), снижающая восприимчивость к этравирину, рилпивирину, невирапину. В одном случае – V106I (в образце 2547-A1), снижающая чувствительность к DOR, особенно в сочетании с другими DRM, ассоциированными с устойчивостью к НеНИОТ. В образце 7032, типированном как CRF02\_AG, выявлены шесть мутаций обратной транскриптазы, приводящих к лекарственной устойчивости, в том числе четыре к НИОТ (M41ML, A62AV, K65R, M184V) и две к НеНИОТ (K103N, V108I), за счет чего вирус устойчив к большинству

препаратов, кроме зидовудина, этравирин и рилпивирин. Крайне высокая встречаемость мутаций лекарственной устойчивости у АРВТ-наивных ВИЧ-инфицированных лиц показана в Сьерра-Леоне, что связывают с перебоями в работе служб по борьбе с ВИЧ во время эпидемия лихорадки Эбола в 2014–2016 гг., так как исследование, проводившееся в близком географическом регионе (Либерия) до эпидемии демонстрировало значительно более низкую встречаемость таких случаев [18].

Для всех 19 образцов ВИЧ/ВГВ получены нуклеотидные последовательности полного генома ВГВ. Нуклеотидные последовательности полных геномов исследованных в данной работе изолятов ВГВ депонированы в международную базу данных GenBank под номерами MN507835–MN507853.

При филогенетическом анализе ВГВ в исследуемых образцах показано, что в группе ВГВ генотипа E и генотипа D представлены в равных долях (47,36 %), в единичном случае обнаружен ВГВ генотипа A (5,26 %). При этом генотип A представлен субгенотипом A2, а генотип D субгенотипами D1, D2 и D3. Таким образом, в группе преобладает ВГВ генотипа E – 47,36 %, по сравнению с ВГВ D1 – 21,05 %, D2 – 15,78 %, D3 – 10,52 % и A2 – 5,26 %. Филогенетические отношения между исследованными изолятами ВГВ, полученными от ВИЧ-инфицированных пациентов из Гвинейской Республики, и референсными последовательностями

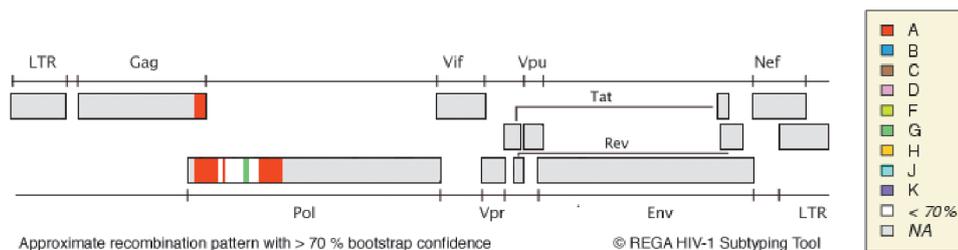
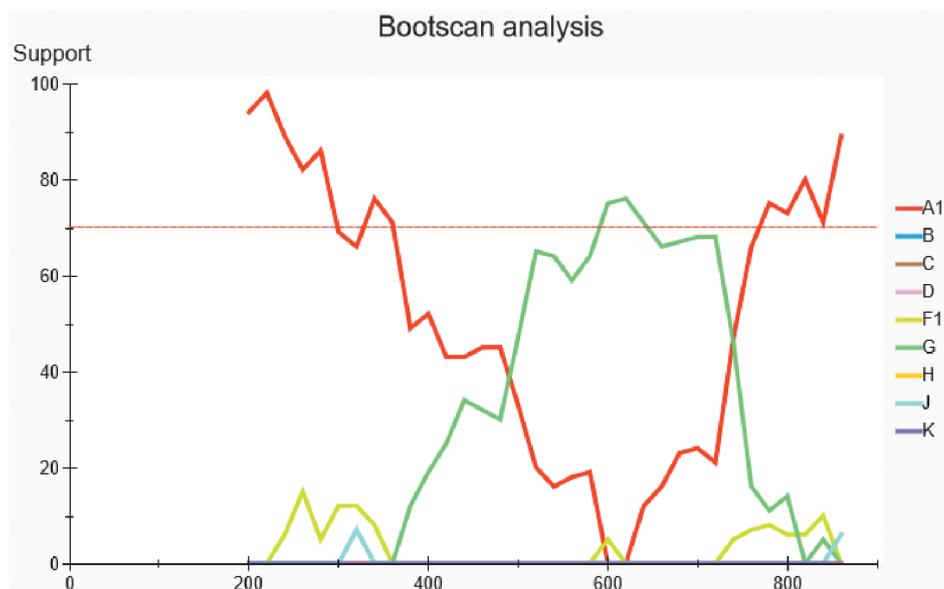


Рис. 2. Анализ рекомбинации последовательности гена *pol* образца 1170 с использованием инструмента генотипирования REGA HIV-1 Subtyping Tool 3.0. Графическое представление событий рекомбинации, разработанных REGA HIV-1 Subtyping Tool 3.0

Fig. 2. Analysis of recombination of the sample 1170 *pol* gene sequence using the REGA HIV-1 Subtyping Tool 3.0. Graphical representation of recombination events developed by REGA HIV-1 Subtyping Tool 3.0



ми из международной базы данных GenBank представлены на рис. 3.

Отметим, что и генотип E, и генотип D выявлялись как среди HBsAg-негативных, так и среди HBsAg-положительных образцов.

Серологический подтип ВГВ определяли на основе аминокислотной последовательности HBsAg. Серотип ауw2 представлен в 31,57 %, ауw3 – 15,78 %, ауw4 – 47,36 %, адw2 – 5,26 % случаев. В соответствии с генотипами ауw3 показан только для ВГВ D2, ауw4 только для ВГВ E, адw2 у единственного образца генотипа ВГВ A2, ауw2 у ВГВ D1 и D3.

Нуклеотидная последовательность ВГВ при скрытой форме течения заболевания, как правило, не отличается от нуклеотидной последовательности вируса так называемого «дикого типа» при HBsAg-положительной форме. В обследуемой нами группе среди образцов ВГВ выявлены мутации SHB у 84,21 %, мутации Core у 94,73 %, мутации PreCore у 15,78 % пациентов. Наиболее распространенной мутацией SHB являлась замена T127P (31,57%), причем встречалась мутация только среди ВГВ генотипа D. По данным исследователей из Ирана, T127P является так называемым escape-мутантом, приводящим к продукции поверхностного антигена, отличающегося от обычного [19]. Привлекают внимание два образца с сочетанием мутаций в регионе SHB – T127P S204R – ранее такое сочетание совместно с мутацией F170FL было описано у HBsAg-негативного

пациента с реактивацией ВГВ через 3 месяца после приостановки длительной профилактики ламивудином [20]. Высказано предположение, что эти мутации могут препятствовать распознаванию HBsAg в диагностическом анализе.

Мутация Core L116I выявлена у 94,73 % пациентов, T146N у всех ВГВ генотипа E. Следует отметить, что мутация Core L116I ассоциирована с прогрессированием заболевания, развитием цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы [21]. Мутация PreCore K21N обнаружена у HBsAg-негативного ВГВ D3, PreCore G29D у ВГВ генотипа E, PreCore H5D у HBsAg-негативного ВГВ генотипа E. Для PreCore G29D ассоциация с развитием гепатоцеллюлярной карциномы [21]. Ни один из пациентов не обладал первичными мутациями устойчивости к лекарственным препаратам против ВГВ, однако в двух образцах ВГВ генотипа E выявлены по одной мутации на установленных позициях лекарственной устойчивости обратной транскриптазы – 80F и 202R, которые предположительно могут нарушать восприимчивость к ламивудину, телбивудину и энтекавиру соответственно.

Генотипы ВИЧ и ВГВ не коррелировали друг с другом, не выявлено отличий между встречаемостью HBsAg-негативного ВГВ в тех или иных геновариантах ВИЧ в нашей группе. Только в одном случае (образец 7032) одновременно выявлены мутации лекарственной устойчивости ВИЧ и ВГВ.

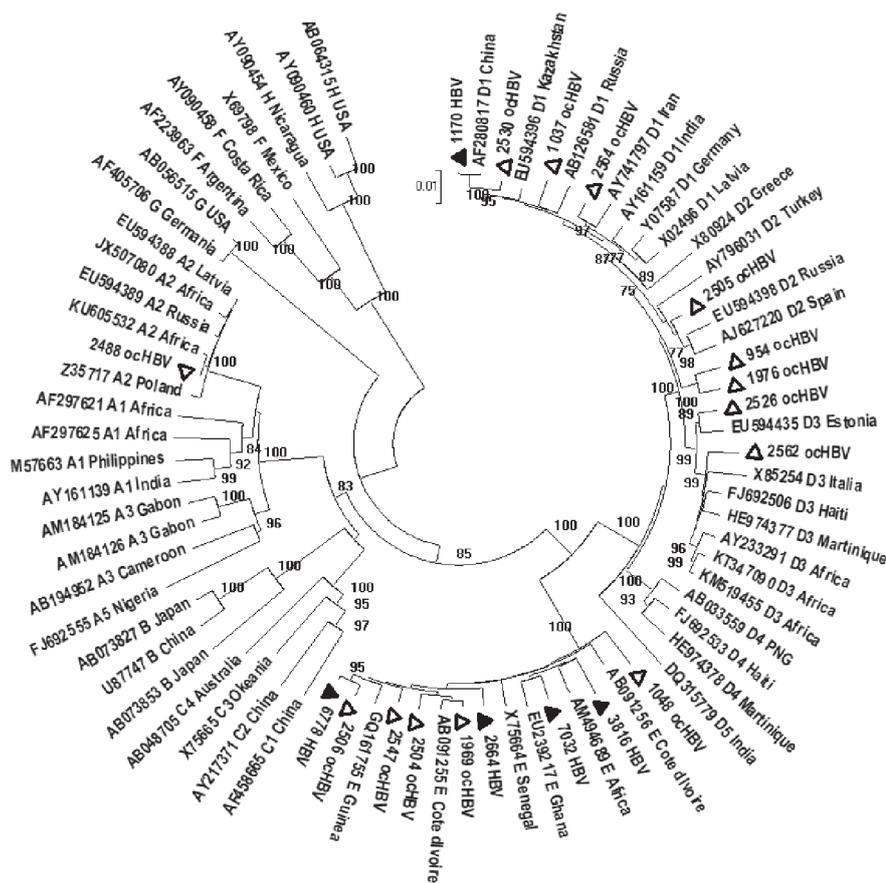


Рис. 3. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей полных геномов ВГВ, выделенных от ВИЧ/ВГВ-коинфицированных пациентов, проживающих на территории Гвинейской Республики в сравнении с представленными в международной базе данных GenBank референсными последовательностями. Референсные последовательности обозначены кодами GenBank с указанием генотипа и региона происхождения образца. Черными треугольниками обозначены HBsAg-положительные образцы, исследованные в настоящей работе, белыми треугольниками обозначены HBsAg-негативные образцы, исследованные в настоящей работе. Даны значения bootstrap  $\geq 70$

Fig. 3. Phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the complete HBV genomes isolated from HIV/HBV-infected patients residing in the Republic of Guinea in comparison with the reference sequences presented in the GenBank. Reference sequences are indicated by the GenBank codes indicating the genotype and origin of the sample. Black triangles denote HBsAg-positive samples, white triangles denote HBsAg-negative samples studied in this work. Bootstrap values are  $\geq 70$

Высокая распространенность HBsAg-негативного ВГВ среди ВИЧ-инфицированных пациентов является серьезной проблемой, поскольку повышает риск возможных осложнений при ВИЧ-инфекции, таких как острая печеночная недостаточность, цирроз, гепатоцеллюлярная карцинома. Выявление мутаций лекарственной устойчивости как ВИЧ, так и ВГВ у АРВТ-наивных пациентов подчеркивают необходимость реализации программ эпиднадзора за ВИЧ-инфицированными, а также планового тестирования на ВГВ и лекарственную устойчивость ВИЧ и ВГВ перед началом антиретровирусной терапии при клиническом ведении пациентов в стране.

Необходимы более масштабные исследования, чтобы помочь в разработке национальных руководств по АРВТ и клинического мониторинга ВГВ и ВИЧ-инфицированных пациентов в Гвинейской Республике.

Авторы подтверждают, что от всех участников исследования либо их законных представителей (для несовершеннолетних) было получено информированное согласие.

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

**Список литературы**

1. Покровский В.В. ВИЧ/СПИД в России: ситуация и прогноз. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2008; 3:4–7.
2. Alberti A., Pontisso P., Chemello L., Fattovich G., Benvegnù L., Belussi F., De Mitri M.S. The interaction between hepatitis B virus and hepatitis C virus in acute and chronic liver disease. *J. Hepatol.* 2005; 22:38–41. PMID: 7602074.

3. Schweitzer A., Horn J., Mikolajczyk R.T., Krause G., Ott J.J. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet*. 2015; 386(10003):1546–55. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)61412-X.
4. Мукомолов С.Л., Левакова И.А. Эпидемиологическая характеристика хронических вирусных гепатитов в Российской Федерации в 1999–2009 гг. *Инфекция и иммунитет*. 2011; 1(3):255–62. DOI: 10.15789/2220-7619-2011-3-255-262.
5. Modi A.A., Feld J.J. Viral hepatitis and HIV in Africa. *AIDS Rev*. 2007; 9:25–39. PMID: 17474311.
6. Squadrito G., Cacciola I., Alibrandi A., Pollicino T., Raimondo G. Impact of occult hepatitis B virus infection on the outcome of chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 2013; 59(4):696–700. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.05.043.
7. Raimondo G., Allain J. P., Brunetto M. R., Buendia M. A., Chen D. S., Colombo M., Craxi A., Donato F., Ferrari C., Gaeta G. B., Gerlich W. H., Levrero M., Locarnini S., Michalak T., Mondelli M. U., Pawlotsky J. M., Pollicino T., Prati D., Puoti M., Samuel D., Shouval D., Smedile A., Squadrito G., Trepo C., Villa E., Will H., Zanetti A. R., Zoulim F. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2008; 49:652–7. DOI: 10.1016/j.jhep.2008.07.014.
8. Dandri M., Locarnini S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. *Gut*. 2012; 61(Suppl 1):i6–17. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-302056.
9. Torbenson M., Thomas D.L. Occult hepatitis B. *Lancet Infect. Dis.* 2002; 2(8):479–86. DOI: 10.1016/S1473-3099(02)00345-6.
10. Guo J.T., Guo H. Metabolism and function of hepatitis B virus cccDNA: Implications for the development of cccDNA-targeting antiviral therapeutics. *Antiviral Res.* 2015; 122:91–100. DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.08.005.
11. Harrison T.J. Hepatitis B virus: molecular virology and common mutants. *Semin. Liver Dis.* 2006; 26(2):87–96. DOI: 10.1055/s-2006-939754.
12. Lin C.L., Kao J.H. Hepatitis B virus genotypes and variants. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2015; 5(5):a021436. DOI: 10.1101/cshperspect.a021436.
13. Leelawiwat W., Pattanasin S., Siriporn A., Wasinraapee P., Kongpechsatit O., Mueanpai F., Tongtoyai J., Holtz T.H., Curlin M.E. Association between HIV genotype, viral load and disease progression in a cohort of Thai men who have sex with men with estimated dates of HIV infection. *PLoS One*. 2018; 13(7):e0201386. DOI: 10.1371/journal.pone.0201386.

14. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Тотолян Арег А. Способ выявления в биологическом материале ДНК вируса гепатита В при низкой вирусной нагрузке на основе двухэтапной ПЦР. Патент РФ № 2633755, опублик. 17.10.2017 г. Бюл. № 29.

15. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7): 1870–4. DOI: 10.1093/molbev/msw054.

16. Singh K.P., Crane M., Audsley J., Avihingsanon A., Sasadeusz J., Lewin S.R. HIV-Hepatitis B virus co-infection: epidemiology, pathogenesis and treatment. *AIDS*. 2017; 31(15):2035–52. DOI: 10.1097/QAD.0000000000001574.

17. Powell E.A., Gededzha M.P., Rentz M., Rakgole N.J., Selabe S.G., Seleise T.A., Mphahlele M.J., Blackard J.T. Mutations associated with occult hepatitis B in HIV-positive South Africans. *J. Med. Virol.* 2015; 87(3):388–400. DOI: 10.1002/jmv.24057.

18. Yendewa G.A., Sahr F., Lakoh S., Ruiz M., Patiño L., Tabernilla A., Deen G.F., Sesay M., Salata R.A., Poveda E. Prevalence of drug resistance mutations among ART-naïve and -experienced HIV-infected patients in Sierra Leone. *J. Antimicrob. Chemother.* 2019; 74(7):2024–9. DOI: 10.1093/jac/dkz134.

19. Rastegarvand N., Makvandi M., Samarbafzadeh A., Rasti M., Neisi N., Pouremamali A., Teimoori A., Shabani A. Molecular Characterization of Pre-Core/Core and S Region of Hepatitis B Virus in Hemodialysis Patients With Occult Hepatitis B Infection. *Jundishapur. J. Microbiol.* 2015; 8(10):e23686. DOI: 10.5812/jjm.23686.

20. Cerva C., Maffongelli G., Svicher V., Salpini R., Colagrossi L., Battisti A., Mariotti B., Cerretti R., Cudillo L., Sarmati L. Hepatitis B reactivation characterized by HBsAg negativity and anti-HBsAg antibodies persistence in haematopoietic stem cell transplanted patient after lamivudine withdrawal. *BMC Infect. Dis.* 2017; 17:566. DOI: 10.1186/s12879-017-2672-6.

21. Al-Qahtani A.A., Al-Anazi M.R., Nazir N., Abdo A.A., Sanai F.M., Al-Hamoudi W.K., Alswat K.A., Al-Ashgar H.I., Khan M.Q., Albenmoussa A., El-Shamy A., Alanazi S.K., Dela Cruz D., Bohol M.F.F., Al-Ahdal M.N. The Correlation Between Hepatitis B Virus Precore/Core Mutations and the Progression of Severe Liver Disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018; 8:355. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00355.

## References

1. Pokrovsky V.V. HIV/AIDS in Russia: situation and prognosis. *Epidemiologiya i Infekcionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2008; 3:4–7.

2. Alberti A., Pontisso P., Chemello L., Fattovich G., Benvegno L., Belussi F., De Mitri M.S. The interaction between hepatitis B virus and hepatitis C virus in acute and chronic liver disease. *J. Hepatol.* 2005; 22:38–41. PMID: 7602074.

3. Schweitzer A., Horn J., Mikolajczyk R.T., Krause G., Ott J.J. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet.* 2015; 386(10003):1546–55. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)61412-X.

4. Mukomolov S.L., Levakova I.A. Epidemiological characteristics of chronic viral hepatitis in the Russian Federation in 1999–2009. *Infekciya i Immunitet [Russian Journal of Infection and Immunity]*. 2011; 1(3):255–62. DOI: 10.15789/2220-7619-2011-3-255-262.

5. Modi A.A., Feld J.J. Viral hepatitis and HIV in Africa. *AIDS Rev.* 2007; 9:25–39. PMID: 17474311.

6. Squadrito G., Cacciola I., Alibrandi A., Pollicino T., Raimondo G. Impact of occult hepatitis B virus infection on the outcome of chronic hepatitis C. *J. Hepatol.* 2013; 59(4):696–700. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.05.043.

7. Raimondo G., Allain J. P., Brunetto M. R., Buendia M. A., Chen D. S., Colombo M., Craxi A., Donato F., Ferrari C., Gaeta G. B., Gerlich W. H., Levrero M., Locarnini S., Michalak T., Mondelli M. U., Pawlotsky J. M., Pollicino T., Prati D., Puoti M., Samuel D., Shouval D., Smedile A., Squadrito G., Trepo C., Villa E., Will H., Zanetti A. R., Zoulim F. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2008; 49:652–7. DOI: 10.1016/j.jhep.2008.07.014.

8. Dandri M., Locarnini S. New insight in the pathobiology of hepatitis B virus infection. *Gut.* 2012; 61(Suppl 1):i6–17. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-302056.

9. Torbenson M., Thomas D.L. Occult hepatitis B. *Lancet Infect. Dis.* 2002; 2(8):479–86. DOI: 10.1016/S1473-3099(02)00345-6.

10. Guo J.T., Guo H. Metabolism and function of hepatitis B virus cccDNA: Implications for the development of cccDNA-tar-

geting antiviral therapeutics. *Antiviral Res.* 2015; 122:91–100. DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.08.005.

11. Harrison T.J. Hepatitis B virus: molecular virology and common mutants. *Semin. Liver Dis.* 2006; 26(2):87–96. DOI: 10.1055/s-2006-939754.

12. Lin C.L., Kao J.H. Hepatitis B virus genotypes and variants. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2015; 5(5):a021436. DOI: 10.1101/cshperspect.a021436.

13. Leelawiwat W., Pattanasin S., Sriporn A., Wasinrapee P., Kongpechsatit O., Mueanpai F., Tongtoyai J., Holtz T.H., Curlin M.E. Association between HIV genotype, viral load and disease progression in a cohort of Thai men who have sex with men with estimated dates of HIV infection. *PLoS One.* 2018; 13(7):e0201386. DOI: 10.1371/journal.pone.0201386.

14. Ostankova Yu.V., Semenov AV, Totolyan Areg A. A method for detecting hepatitis B virus in biological material with a low viral load based on a two-stage PCR. Patent 2633755 of the Russian Federation.

15. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7): 1870–4. DOI: 10.1093/molbev/msw054.

16. Singh K.P., Crane M., Audsley J., Avihingsanon A., Sasadeusz J., Lewin S.R. HIV-Hepatitis B virus co-infection: epidemiology, pathogenesis and treatment. *AIDS*. 2017; 31(15):2035–52. DOI: 10.1097/QAD.0000000000001574.

17. Powell E.A., Gededzha M.P., Rentz M., Rakgole N.J., Selabe S.G., Seleise T.A., Mphahlele M.J., Blackard J.T. Mutations associated with occult hepatitis B in HIV-positive South Africans. *J. Med. Virol.* 2015; 87(3):388–400. DOI: 10.1002/jmv.24057.

18. Yendewa G.A., Sahr F., Lakoh S., Ruiz M., Patiño L., Tabernilla A., Deen G.F., Sesay M., Salata R.A., Poveda E. Prevalence of drug resistance mutations among ART-naïve and -experienced HIV-infected patients in Sierra Leone. *J. Antimicrob. Chemother.* 2019; 74(7):2024–9. DOI: 10.1093/jac/dkz134.

19. Rastegarvand N., Makvandi M., Samarbafzadeh A., Rasti M., Neisi N., Pouremamali A., Teimoori A., Shabani A. Molecular Characterization of Pre-Core/Core and S Region of Hepatitis B Virus in Hemodialysis Patients With Occult Hepatitis B Infection. *Jundishapur. J. Microbiol.* 2015; 8(10):e23686. DOI: 10.5812/jjm.23686.

20. Cerva C., Maffongelli G., Svicher V., Salpini R., Colagrossi L., Battisti A., Mariotti B., Cerretti R., Cudillo L., Sarmati L. Hepatitis B reactivation characterized by HBsAg negativity and anti-HBsAg antibodies persistence in haematopoietic stem cell transplanted patient after lamivudine withdrawal. *BMC Infect. Dis.* 2017; 17:566. DOI: 10.1186/s12879-017-2672-6.

21. Al-Qahtani A.A., Al-Anazi M.R., Nazir N., Abdo A.A., Sanai F.M., Al-Hamoudi W.K., Alswat K.A., Al-Ashgar H.I., Khan M.Q., Albenmoussa A., El-Shamy A., Alanazi S.K., Dela Cruz D., Bohol M.F.F., Al-Ahdal M.N. The Correlation Between Hepatitis B Virus Precore/Core Mutations and the Progression of Severe Liver Disease. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2018; 8:355. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00355.

## Authors:

Shchemelev A.N., Ostankova Yu.V., Zueva E.B., Semenov A.V. Saint-Petersburg Pasteur Institute. 14, Mira St., Saint-Petersburg Pasteur Institute, 197101, Russian Federation.

Boumbaly S. Research Institute of Applied Biology; Kindia, Republic of Guinea. International Tropical Infections Research Center, N'Zerekore, Republic of Guinea. N'Zerekore, Republic of Guinea. BP 146 Kindia.

Balde T.A.L. Research Institute of Applied Biology. Kindia, Republic of Guinea. BP 146 Kindia.

## Об авторах:

Щемелев А.Н., Останкова Ю.В., Зуева Е.Б., Семенов А.В. Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Российская Федерация, 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14. E-mail: pasteur@pasteurorg.ru.

Boumbaly S. Научно-исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи; Гвинейская Республика, Киндия. Международный исследовательский центр по тропическим инфекциям в Гвинеи. Гвинейская Республика, Н'Зерекоре.

Balde T.A.L. Научно-исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи. Гвинейская Республика, Киндия. 146 Kindia.

Поступила 25.09.19.

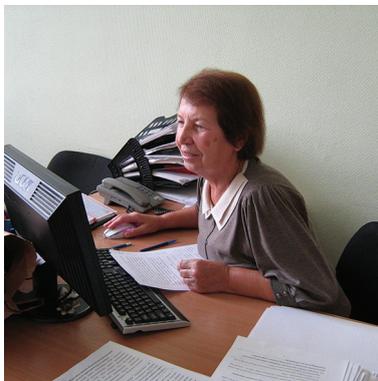
Принята к публ. 26.09.19.

## К 80-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ЛИДИИ СТЕПАНОВНЫ ПРОНИНОЙ

27 сентября 2019 г. исполнилось 80 лет Лидии Степановне Прониной, бывшей заведующей редакционно-издательским отделом РосНИПЧИ «Микроб».

Лидия Степановна проработала в институте 42 года. С 1994 по 2017 год она возглавляла редакционно-издательский отдел. Л.С. Пронина внесла большой вклад в развитие редакционно-издательской деятельности института.

При участии Лидии Степановны Прониной институтом издавались коллективные монографии, руководства и сборники материалов конференций. Их высокий издательский уровень во многом является заслугой Л.С. Прониной. Ее высокая квалификация и несомненный профессионализм позволили вывести журнал «Проблемы особо опасных инфекций», который институт выпускает



с 1968 г., на совершенно новый качественный уровень. Журнал вошел в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий Высшей аттестационной комиссии, индексируется в РИНЦ, а с апреля 2019 г. включен в Scopus.

Работа Лидии Степановны отмечена благодарностями, Почетными грамотами Министерства здравоохранения РФ, медалью «40 лет Госсанэпидслужбе России» и памятной медалью «100-летие Российского

научно-исследовательского противочумного института «Микроб».

*Редакционная коллегия и редакционный совет журнала «Проблемы особо опасных инфекций» сердечно поздравляют Лидию Степановну с замечательным юбилеем и желают ей крепкого здоровья, бодрости и благополучия.*

## К 60-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ИВАНА АЛЕКСЕЕВИЧА ДЯТЛОВА

18 августа 2019 г. исполнилось 60 лет Ивану Алексеевичу Дятлову, доктору медицинских наук, профессору, академику Российской академии наук, директору ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии».

Иван Алексеевич является известным ученым, ведущим специалистом в области создания и производства медицинских иммунобиологических препаратов. В числе его достижений – разработка и организация производства антирабического иммуноглобулина, совершенствование препаратов и технологий производства холерных вакцин, разработка химических вакцин против чумы, туляремии и сибирской язвы.

Под научным руководством И.А. Дятлова подготовлено 7 докторов и 13 кандидатов наук, он является деканом Центра нанобезопасности Пушкинского



государственного естественно-научного института, автором около 600 научных работ, в том числе 15 монографий.

Научно-общественная деятельность И.А. Дятлова многогранна: он является членом бюро секции профилактической медицины ОМН РАН, экспертом РАН, членом правления ВНОМЭиП, главным редактором журнала «Бактериология», членом редакционного совета журнала «Проблемы особо опасных инфекций», а также возглавляет Национальное научно-практическое общество бактериологов.

*Редакционная коллегия и редакционный совет журнала «Проблемы особо опасных инфекций» сердечно поздравляют Ивана Алексеевича Дятлова с 60-летием и желают ему больших успехов в работе, новых научных достижений, талантливых учеников, здоровья и благополучия.*

**ПАМЯТИ АНИСИМОВА ПАВЛА ИВАНОВИЧА**



20 июля 2019 г. на 91-м году жизни скончался крупный ученый, доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный деятель науки Анисимов Павел Иванович.

П.И. Анисимов родился 5 июля 1929 г. В 1953 г. окончил Саратовский государственный медицинский институт. Трудовую деятельность начал в 1953 г. врачом-бактериологом Небит-Дагского противочумного отделения Туркменской ПЧС. В 1961 г. Павел Иванович принят в институт «Микроб» на должность младшего научного сотрудника. В 1963 г. назначен на пост заведующего лабораторией генетики микроорганизмов. Кандидатскую диссертацию защитил в 1961 г., докторскую – в 1972 г. Ученое звание профессора присвоено П.И. Анисимову в 1976 г. В 1973 г. Павел Иванович назначен директором института «Микроб» МЗ СССР.

Под руководством профессора П.И. Анисимова осуществлялась большая организаторская, консультативная и методическая работа по совершенствованию планирования и повышению эффективности и научного уровня исследований, а также ускорению внедрения в практику здравоохранения научных достижений противочумных организаций страны.

Павел Иванович Анисимов – ученый и организатор науки мирового уровня. Он является одним

из основоположников генетики особо опасных инфекций в нашей стране. Он внес большой вклад в фундаментальные исследования по микробиологии, цитологии, чумного микроба и возбудителей других инфекционных заболеваний, иммунологии, диагностики и эпидемиологии чумы. На основе проведенных под его руководством разработок в практику противочумной работы внедрены многие эффективные диагностические и профилактические препараты. В период с 1973 по 1988 год П.И. Анисимов возглавлял научные исследования по изучению причин энзоотии чумы, которые явились теоретической основой для создания нормативно-методических документов по проведению эпидемиологического надзора за чумой в СССР.

Большое внимание П.И. Анисимов уделял подготовке научных кадров. Под его научным руководством подготовлено 9 докторских и 35 кандидатских диссертаций.

С 1988 г. П.И. Анисимов работал главным научным сотрудником лаборатории прикладной генетики, активно занимаясь воспитанием молодых научных сотрудников и участвуя в деятельности ученого и диссертационного советов.

За плодотворную деятельность Павел Иванович награжден орденом Трудового Красного знамени, ему присвоено звание «Заслуженный деятель науки».

Павел Иванович Анисимов навсегда останется в благодарной памяти сотрудников РосНИПЧИ «Микроб», его коллег и учеников.